



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

221839

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.³

C 12 P 17/08
C 12 R 1/54

(22) Přihlášeno 01 07 81
(21) (PV 5078-81)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 02 07 80
(162 977) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 15 09 82

(45) Vydáno 15 07 85

(72) Autor vynálezu

BALTZ RICHARD HENRY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

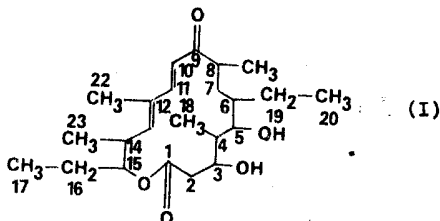
(73) Majitel patentu

SENO EUGENE THOMAS, NORWICH (Velká Británie)

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

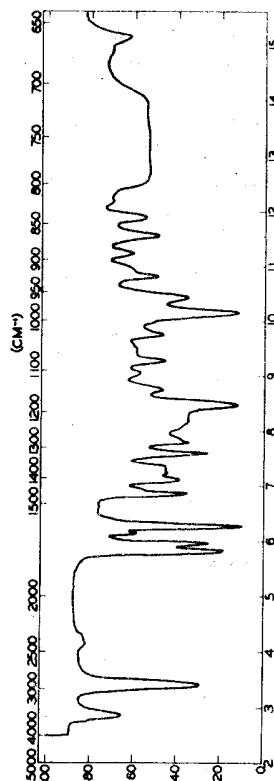
(54) Způsob výroby tylaktonu

Předmětem vynálezu je způsob výroby
tylaktonu vzorce I



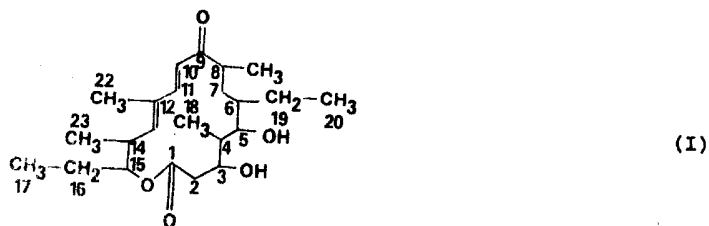
nebo jeho estern, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 produkující tylakton v živném prostředí, obsahujícím asimilovatelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli v submerzní kultuře při teplotě 10 až 40 stupňů Celsia za aerobních podmínek při nasycení živného prostředí vzduchu alespoň 30 % a takto získaný tylakton se popřípadě esterifikuje.

Tylakton je výhodným meziproduktem pro výrobu makrolidových antibiotik a pro výrobu značených sloučenin ke sledování metabolických pochodů.

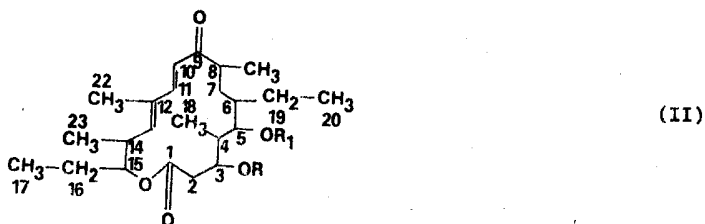


Vynález se týká způsobu výroby tylaktonu.

Tylakton je makrolidové antibiotikum, a to 20-dihydro-20,23-dideoxytylonolid, který je možno vyjádřit vzorcem I



Tato látka je vhodným meziproduktem pro výrobu acylderivátů obecného vzorce II



kde

R a R₁ znamenají acylové zbytky.

Sloučeniny vzorců I a II jsou cennými meziprodukty, z nichž je možno získat makrolidová antibiotika se 16člennou strukturou. Přestože ve vzorcích nejsou uvedeny žádné stereochemické údaje, je stereochemie těchto látek totožná se stereochemií tylosinu.

Tylakton je možno esterifikovat na hydroxylových skupinách v poloze 3 a 5 za vzniku acylesterů, reakce se provádí působením acylačních činidel známým způsobem. Acylestery tylaktonu jsou cennými meziprodukty při výrobě nových makrolidových antibiotik.

Typickými acylačními činidly jsou anhydridy, halogenidy, a to obvykle v kombinaci se zásadou nebo jinou látkou, pohlcující kyselinu, jakož i aktivní estery organických kyselin. Acylaci je rovněž možno provádět při použití směsi organické kyseliny a dehydratačního činidla, například N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu. Acylaci je rovněž možno provést enzymaticky při použití postupů, které byly popsány například Okamotem a dalšími v US patentu č. 4 092 473. Takto získané acylované deriváty je možno izolovat a čistit známými způsoby.

Deriváty je možno připravit některým ze známých způsobů esterifikace, například tak, že se na sloučeninu působí stechiometrickým množstvím nebo malým přebytkem esterifikacího acylačního činidla, například anhydridu kyseliny v organickém rozpouštědle, například pyridinu při teplotě 0 °C až teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin do ukončení esterifikace. Estery je možno izolovat z reakční směsi běžnými postupy, například extrakcí, chromatografií a krystalizací.

Použitelnými estery jsou estery organických kyselin, a to kyselin alifatických, cykloalifatických, arylkarboxylových, aralkylkarboxylových, heterocyklických karboxylových kyselin, kyselin sulfonylových a alkoxykarboxylových o 1 až 18 atomech uhlíku a v případě anor-

ganických kyselin může jít zejména o kyselinu sírovou a kyselinu fosforečnou. Příkladem vhodných esterů jsou estery, odvozené například od kyseliny mravenčí, octové, chloroctové, propionové, máslé, isovalerové, glukoronové, alkoxykarboxylové, stearové, cyklopropankarboxylové, cyklohexanokarboxylové, beta-cyklohexylpropionové, 1-adamantanokarboxylové, benzoové, fenylacetové, fenoxycetové, mandlové a 2-thienylacetové, a kyseliny alkylsulfonové, arylsulfonové, aralkylsulfonové, přičemž kyseliny, substituované arylovými nebo aralkylovými zbytky popřípadě nesou substituenty ze skupiny atom halogenu, nitroskupina, nižší alkoxykupina a podobně na aromatickém kruhu. Vhodnými estery jsou také poloestery, odvozené od dikarboxylových kyselin, například od kyseliny jantarové, maleinové, fumarové, malonové a ftalové.

Tylakton je možno získat pěstováním kmene *Streptomyces fradiae*, který produkuje tuto sloučeninu v submerzní kultuře za aerobních podmínek ve vhodném živném prostředí. Fermentace se provádí až do nahromadění žádaného množství výsledné sloučeniny.

K pěstování kmene *Streptomyces fradiae* je možno užít celou řadu živných prostředí. Pro hospodárnost produkce, optimální výtěžek a snadnou izolaci výsledného produktu je však výhodné užít určitých živných prostředí. Je například možno jako výhodného zdroje uhlíku pro fermentaci ve velkém měřítku užít uhlohydráty, například dextrin, glukózu, škrob a kukuřičnou mouku, jakož i oleje, například sójový olej. Výhodným zdrojem dusíku je kukuřičná mouka, sójová mouka, rybí mouka, aminokyseliny a podobně. Pokud jde o anorganické soli, je možno včlenit do živného prostředí běžné rozpustné soli, které dodávají železo, draslík, sodík, hořčík, amonné ionty, chloridové ionty, ionty uhličitánové, síranové, dusičnanové a podobně.

Do živného prostředí patří rovněž základní stopové prvky, nutné pro růst a vývoj produkčního organismu. Tyto stopové prvky se však běžně vyskytují jako nečistoty jiných složek živného prostředí v množství, které je dostatečné pro růstové požadavky organismu. Někdy však může být zapotřebí přidat do živného prostředí při fermentaci ve větším měřítku malé množství protipěněního činidla, například 0,2 ml/l, tímto činidlem je například polypropylen glykol s molekulovou hmotností přibližně 2 000.

Pro výrobu větších množství tylaktonu v submerzní kultuře za aerobních podmínek je výhodná fermentace v tancích. Menší množství této sloučeniny je možno získat i ve třepací kultuře. Protože při přímém naočkování velkých tanků sporami organismu je nutno nejprve vyčkat po celé období lag, je výhodnější užít vegetativní očkovací materiál. Tento vegetativní očkovací materiál se připravuje tak, že se malé množství živného prostředí naočkuje sporami nebo zlonky mycelia uvedeného organismu, čímž se získá čerstvá, aktivně rostoucí kultura organismu. Vegetativní očkovací materiál se pak užije k naočkování prostředí ve velkém tanku.

Živné prostředí užité k získání vegetativního očkovacího materiálu může být totéž prostředí, jakého se užívá při fermentaci ve větších nádobách, je však možno užít i jiného prostředí.

Způsob podle vynálezu spočívá v tom, že se pěstuje nový mikroorganismus, který byl získán chemickou mutagenézou. Jde o kmen *Streptomyces fradiae*, který produkuje tylosin. Nový mikroorganismus však produkuje pouze velmi malé množství tylosinu, avšak jako hlavní složku produkuje tylakton.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby tylaktonu vzorce I nebo jeho esteru, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 produkující tylakton v živném prostředí, obsahujícím asimilovatelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli v submerzní kultuře při teplotě 10 až 40 °C za aerobních podmínek při provzdušnění alespoň 30 % a takto získaný tylakton se popřípadě esterifikuje.

Nový mikroorganismus, který produkuje tylakton je možno klasifikovat jako kmen *Streptomyces fradiae*. Kultura tohoto mikroorganismu byla natrvalo uložena do veřejné sbírky mikroorganismů Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, odkud je možno ji kdykoli získat pod číslem NRRL 12188.

Jako je tomu i v případě jiných mikroorganismů, vlastnosti *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 se poněkud mění. Je například možno získat rekombinanty, mutanty nebo varianty kmene NRRL 12188 působením různých známých fyzikálních a chemických mutagenních činitelů, jako ultrafialového světla, paprsků X, paprsků gama nebo N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu. Všechny přírodní i vyvolané varianty, mutanty a rekombinanty kmene *Streptomyces fradiae* NRRL 12188, které se uchovávají svou základní vlastností produkce tylaktonu spadají do oboru vynálezu.

S. fradiae NRRL 12188 je možno pěstovat v teplotním rozmezí 10 až 40 °C. K optimální produkci tylaktonu dochází při teplotě přibližně 28 °C.

Jak je to obvyklé v submerzní kultuře za aerobních podmínek, nechá se živným prostředím procházet sterilní vzduch. Pro účinnou produkci antibiotika má být nasycený vzduchem při fermentaci v tanku 30 % nebo větší při teplotě 28 °C a atmosferického tlaku.

Produkce tylaktonu je možno v průběhu fermentace sledovat tak, že se ze živného prostředí odeberou vzorky a ty se pak analyzují vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použití ultrafialového světla jako detekčního systému, jak bylo popsáno například v publikaci Kennedy v *J. Chromatographic Science*, 16, 492 až 495 (1978).

Po ukončení submerzní fermentace za aerobních podmínek je možno izolovat tylakton z fermentačního prostředí některým ze známých způsobů. Protože je tylakton jen omezeně rozpustný ve vodě, nemusí se rozpouštět v prostředí, v němž došlo k jeho výrobě. Z tohoto důvodu je možno tylakton izolovat buď

1. extrakcí z fermentačního prostředí nebo
2. filtrací fermentačního prostředí s následnou extrakcí zfiltrovaného prostředí i myceliálního koláče.

Extrakci je možno provádět různým způsobem. S výhodou se zfiltrované živné prostředí extrahuje obvykle bez předchozí úpravy pH vhodným rozpouštědlem, například amylacetátem nebo petroleterem, organická fáze se odpaří ve vakuu, čímž se získají krystaly nebo olejovitá kapalina. V případě, že se získá olejovitá kapalina, je možno ji dále čistit adsorpční chromatografií.

Sloučeniny vzorců I a II jsou cennými meziprodukty, z nichž je možno získat makrolidová antibiotika o 16 členech ve struktuře. Například tylakton vzorce I je možno biologicky převést na tylosin tak, že se tato látka přidá k rostoucí kultuře mikroorganismu, který je schopen biologickou přeměnu provést. Tímto mikroorganismem může být kmen *Streptomyces fradiae*, který produkuje tylosin nebo je schopen produkovat tylosin s tou výjimkou, že se blokuje tvorba tylaktonu.

Kmen, který je schopen produkovat tylosin a je blokován pokud jde o produkci tylaktonu je možno získat tak, že se působí na kmen, který produkuje tylosin mutagenem a přežívající kmeny se sledují na neschopnost produkce tylosinu. Ty kmeny, které neprodukují tylosin se dále sledují ke stanovení kmenů, které jsou také neschopné produkovat tylakton. Tyto kmeny se pak uloží do malých třepacích lahví a přidává se tylakton, aby bylo možno stanovit, zda jej mění na tylosin.

Streptomyces fradiae kmeny NRRL 2702 a NRRL 2703 mohou být příkladem kmenů *Streptomyces*, které jsou schopné produkovat tylosin. Typickými mutageny, kterých je možno užít k selekci kmenů jsou například deriváty N-metyl-N'-nitronitrosoguanidinu.

Sloučenina vzorce I je zvláště cenná pro výrobu značených sloučenin pro metabolické pokusy. Značit se může buď tylaktonová část nebo cukr, čímž je možno sledovat metabolické pochody tylosinu.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

A. Fermentace tylaktonu v třepací kultuře

Lyofilizované pelety *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 se dispergují v 1 až 2 ml sterilizované vody. 0,5 ml tohoto roztoku se užije k naočkování 150 ml vegetativního živného prostředí následujícího složení.

Složka	Množství v %
kukuřičný výluh	1,0
extrakt z kvasnic	0,5
drť ze sójových bobů	0,5
CaCO ₃	0,3
surový sójový olej	0,45
deionizovaná voda	97,25

Je také možno postupovat tak, že se vegetativní kultura *S. fradiae* NRRL 12188 uložena po objemech 1 ml v kapalném dusíku rychle rozmrazí a užije k naočkování vegetativního prostředí. Naočkované vegetativní prostředí se inkubuje v Erlenmeyerových bankách o obsahu 500 ml při teplotě 29 °C po dobu 48 hodin v uzavřené třepačce při 300 otáčkách za minutu.

Takto naočkované živné prostředí se v množství 0,5 ml užije k naočkování 7 ml produkčního živného prostředí následujícího složení.

Složka	Množství v %
řepná melasa	2,0
kukuřičná mouka	1,5
rybí mouka	0,9
kukuřičný gluten	0,9
NaCl	0,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
CaCO ₃	0,2
surový sójový olej	3,0
deionizovaná voda	91,36

Naočkované fermentační prostředí se inkubuje v baňce o objemu 50 ml při teplotě 29 °C po dobu 6 dnů v uzavřené třepačce při 300 otáčkách za minutu.

B. Fermentace tylaktonu v tanku

Aby bylo možno získat větší objem očkovacího materiálu, užije se 60 ml inkubovaného vegetativního prostředí, připraveného tak, jak bylo popsáno v odstavci A. k naočkování 38 litrů vegetativního růstového prostředí druhého stupně s následujícím složením:

Složka	Množství v %
kukuřičný výluh	1,0
sójová mouka	0,5
extrakt z kvasnic	0,5
CaCO ₃	0,3
surový sójový olej	0,5
surový lecitin	0,015
voda	97,185

Živné prostředí se upraví na pH 8,5 přidáním 50% roztoku hydroxidu sodného.

Toto vegetativní živné prostředí z druhého stupně se inkubuje v tanku o objemu 68 litrů po dobu 47 hodin při teplotě 29 °C.

4 litry takto získaného inkubovaného živného prostředí ze druhého stupně se užije k naočkování 40 litrů sterilního produkčního prostředí následujícího složení.

Složka	Množství v %
rybí mouka	0,92
kukuřičná mouka	1,57
kukuřičný gluten	0,92
CaCO ₃	0,21
NaCl	0,10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
řepná melasa	2,10
surový sójový olej	3,15
lecitin	0,09
voda	90,90

Živné prostředí se upraví na pH 7,2 přidáním 50% roztoku hydroxidu sodného.

Naočkované produkční prostředí se fermentuje v tanku o objemu 68 litrů po dobu 5 dnů při teplotě 28 °C. Fermentační prostředí se provzdušňuje sterilním vzduchem tak, aby bylo nasyceno rozpuštěným kyslíkem na 30 až 60 % a míchá se běžnými míchadly při 300 otáčkách za minutu.

Příklad 2

Izolace tylaktonu

1 600 litrů fermentačního prostředí, získaného způsobem podle příkladu 1 se zfiltruje při použití pomocného prostředku pro filtraci (3 % Hyflo Supercel, infusoriová hlinka, Johns Manville Corp.). Filtrát se upraví na pH 9, přidáním 2% hydroxidu sodného. Filtrát se extrahuje 400 litry amylacetátu. Amylacetátový extrakt, který má vysokou optickou hustotu při 282 nm, avšak žádnou antimikrobiální účinnost se zahustí ve vakuu na olejovitou kapalinu. Tato kapalina se rozpustí v 5 litrech benzenu. Benzenový roztok se chromatografuje na sloupci silikagelu (Grace, grade 62, Davison Chemical Co.) v benzenu, sloupec má rozměry 5,25 x 36. Sloupec se vymývá směsí benzenu a etylacetátu v poměru 3:2, aluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě silikagelu, detekce se provádí kyselinou sírovou. Benzenem se odstraní zbytky tukovitých látek a pak se směsí benzenu a etylacetátu v poměru 9:1 oddělí a izoluje tylakton. Frakce s obsahem tylaktonu se slijí a odpaří ve vakuu. Tylakton se nechá krystalizovat ze směsi benzenu a hexanu nebo horkého hexanu, čímž se získají 2 g této sloučeniny o teplotě tání 162 až 163 °C.

Spektrum tylaktonu v infračerveném světle v chloroformu je znázorněno na přiloženém výkresu.

Tylakton je bílá pevná látka, která krystaluje z hexanu nebo ze směsi etylacetátu a hexanu a taje při teplotě 162 až 163 °C. Skládá se přibližně ze 70 % uhlíku, 9,7 % vodíku a 20,3 % kyslíku. Má empirický vzorec $C_{23}H_{38}O_5$ a molekulovou hmotnost přibližně 394.

Absorpční spektrum tylaktonu v infračerveném světle v chloroformu je znázorněno na přiloženém výkresu. Pozorovatelná absorpční maxima se vyskytují při následujících frekvencích: (cm^{-1}):

3 534 (střední), 2 924 (silné), 2 398 (slabé), 2 353 (slabé), 1 709 (velmi silné), 1 678 (velmi silné), 1 626 (malé), 1 592 (velmi silné), 1 458 (silné), 1 441 (hrb), 1 404 (silné), 1 379 (malé), 1 316 (silné), 1 284 (střední), 1 181 (velmi silné), 1 143 (silné), 1 103 (střední), 1 078 (střední), 1 049 (velmi malé), 1 025 (střední), 984 (velmi silné), 958 (silné), 923 (střední), 911 (hrb), 859 (malé), 868 (střední), 840 (střední), 820 (velmi malé) a 661 (malé).

Spektrum tylaktonu v ultrafialovém světle v neutrálním etanolu má absorpční maximum při 282 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 560$).

Tylakton má následující specifickou otáčivost: $[\alpha]_D^{25} -55,23^\circ$ ($c = 1$, CH_3OH).

Tylakton nemá podle elektrometrické titrace v 66% vodném dimethylformamidu žádné titrovatelné skupiny.

Tylakton je téměř nerozpustný ve vodě, avšak rozpouští se v organických rozpouštědlech, jako acetonu, metanolu, etanolu, dimethylformamidu, chloroformu, dietyléteru, petroléteru, benzenu a dimetylsulfoxidu.

Tylakton je možno odlišit od tylosinu chromatografií na tenké vrstvě silikagelu. K detekci je možno užít kyselinu sírovou, a to koncentrovanou nebo zředěnou na 50 %. Při tomto způsobu detekce vytváří tylakton nejprve žlutohnědou skvrnu. V případě, že silikagelové plotny s fluorescenčním pozadím se užívají pro tento typ chromatografie, je možno provést detekci ultrafialovým světlem. Hodnoty R_f pro tylakton jsou uvedeny v následující tabulce I.

T a b u l k a I

Chromatografie tylaktonu na tenké vrstvě silikagelu

Sloučenina	Hodnoty R _f	
	A ^{a)}	B
tylakton	0,50	0,62
tylosin	0,0	0,0

^{a)} rozpouštědlo: A = směs benzenu a etylacetátu v poměru 4:1

B = směs benzenu a etylacetátu v poměru 3:2

P ř í k l a d 3

3,5-di-O-Acetyl-tylakton

200 mg tylaktonu, připraveného způsobem podle příkladu 2 se rozpustí ve 4 ml pyridinu. Přidají se 4 ml anhydridu kyseliny octové. Výsledná směs se nechá stát 16 hodin při teplotě místnosti a pak se odpaří ve vakuu dosucha. K odparku se přidá 5 ml metanolu a roztok se zahřívá 1/2 hodiny na teplotu 60 °C a pak se odpaří ve vakuu, čímž se získá 3,5-di-O-acetyltylakton. Tato sloučenina má R_f 0,59 při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi benzenu a etylacetátu v poměru 4:1 jako rozpouštědla. Hodnota R_f pro tylakton v tomto systému je 0,3.

P ř í k l a d 4

3,5-di-O-propionyltylakton je možno získat způsobem podle příkladu 3 při použití anhydridu kyseliny propionové.

P ř í k l a d 5

3,5-di-O-isovaleryltylakton je možno získat způsobem podle příkladu 3 při použití anhydridu kyseliny isovalerové.

P ř í k l a d 6

3,5-di-O-benzoyltylakton je možno získat způsobem podle příkladu 3 při použití anhydridu kyseliny benzoové.

P ř í k l a d 7

3,5-di-O-(n-butyryl)tylakton je možno získat způsobem podle příkladu 3 při použití anhydridu kyseliny n-máslé.

P ř í k l a d 8

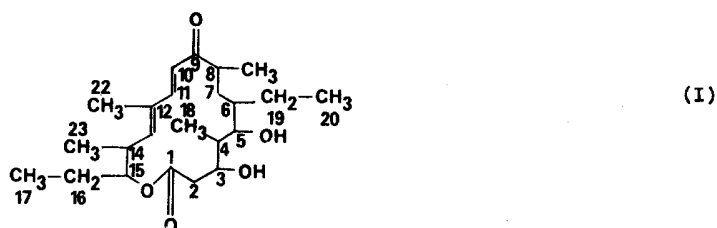
Výroba tylosinu z tylaktonu

Kmen *Streptomyces fradiae*, který původně produkoval tylosin, ale byl blokován pokud jde o uzavření makrolidového kruhu se pěstuje způsobem podle příkladu 1, odstavec A. s tím

rozdílem, že teplota při testování je 28 °C. Tylakton se přidá k fermentačnímu prostředí 48 hodin po naočkování. Fermentace se provádí tak dlouho, až se nahromadí větší množství tylosinu, to jest obvykle 3 dny. Přítomnosti tylosinu je možno prokázat odebráním vzorků živného prostředí a testováním proti mikroorganismům citlivým na tylosin. K tomuto účelu je možno užít například *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Biologická zkouška se obvykle provádí automaticky turbidimetrickou metodou chromatografií na tenké vrstvě nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií, detekce se provádí ultrafialovým světlem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby tylaktonu vzorce I



nebo jeho farmaceuticky přijatelného esteru, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 produkující tylakton v živném prostředí, obsahujícím asimilovatelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli v submerzní kultuře při teplotě 10 až 40 °C za aerobních podmínek při nasycení živného prostředí vzduchu alespoň 30 % a takto získaný tylakton se popřípadě převede na farmaceuticky přijatelný ester.

1 list výkresů

221839

