

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 813527 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **813527**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **09.11.1981**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.11.1981**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.05.1982**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority
10.11.1980 US 205_539

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Baltz, Richard Henry, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Kirst, Herbert, Andrew, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Wild, Gene, Muriel, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Seno, Eugene, Thomas, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Parannetut makrolidiantibiootit.

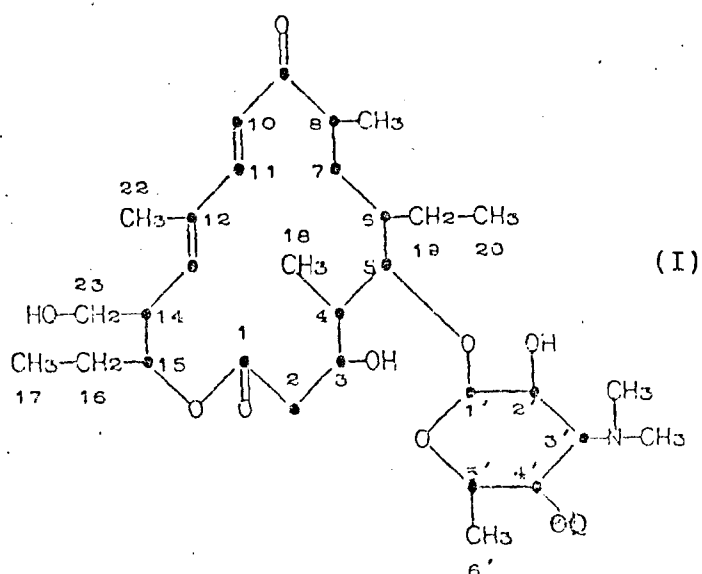
Förbättrade makrolidantibiotika.

Parannetut makrolidiantibiootit.

Tämä keksintö liittyy makrolidiantibiootteihin, erityisesti yhdisteisiin, jotka ovat samankaltaisia kuin hyvin tunnettu terapeutti aine tylosiini (ks. esim. Tetrahedron Letters, 2339 (1970)).

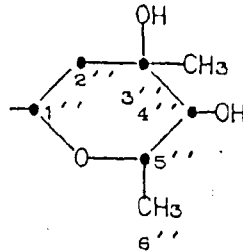
Huolimatta tylosiinin suuresta arvosta on olemassa jatkuva tarve kehittää uusia antibiootteja mm. huomioon ottaen mahdollisuuden resistenttien kantojen ilmaantumiseen. Edelleen, rakenteellinen muutos voi johtaa muutoksiin aineelle herkkien mikro-organismien valikoimassa. Valitettavasti tylosiininkaltaisten makrolidien rakenteen kemiallinen modifiointi on osoittautunut äärimmäisen vaikeaksi. Esimerkiksi artikkelissa J. Org. Chem. 44 (12), 2050-2 (1979) on osoitus ylitsepääsemättömistä ongelmista, jotka sisältyvät tylosiinin mykino-syyliglykosididoksen katkaisemiseen kemiallisin keinoin. Todellakin on valtava määrä tapauksia, joissa tämän alan tutkijat, jotka pyrkivät tutkimaan uusia rakenteita, ovat olleet pakotettuja etsimään uusia mikro-organismeja, joko luonnossa esiintyviä tai keinotekoisia, toivossa, että niiden kasvatus tuottaisi samankaltaisia rakenteita.

Käsiteltävänä olevan keksinnön mukaan nyt on havaittu, että makrolidit, joilla on kaava (I):



missä Q on yety tai

5

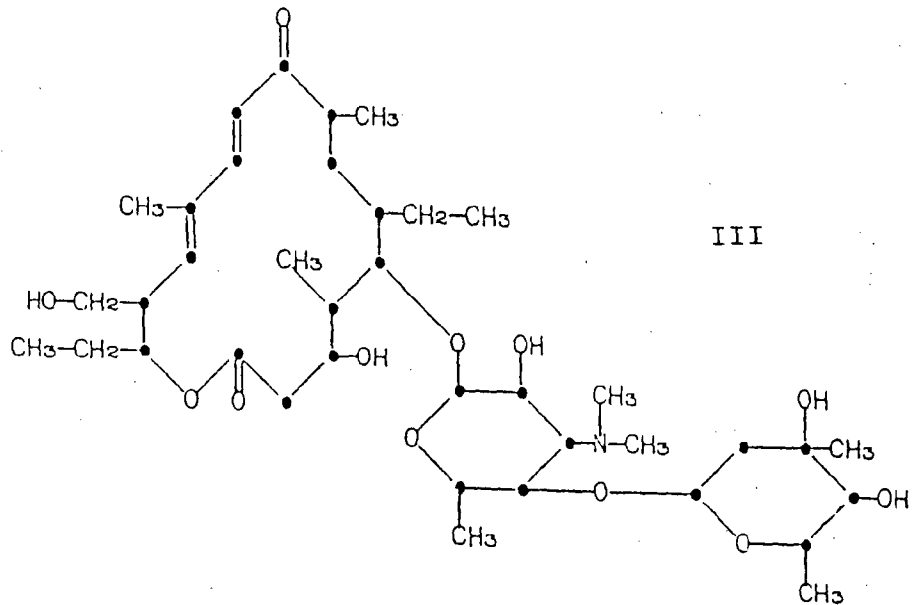


II

10 ja niistä johdetut farmaseuttisesti käyttökelpoiset este-
rit ja happoadditiosuolat inhiboivat patogeenisten
mikro-organismien kasvua.

Kun Q tarkoittaa mykaroosi-sokeriyksikköä,
kaavan (1) yhdiste on 20-dihydro-20-deoksi-23-demykino-
15 syylitylosiini (DH-DO-DMT):

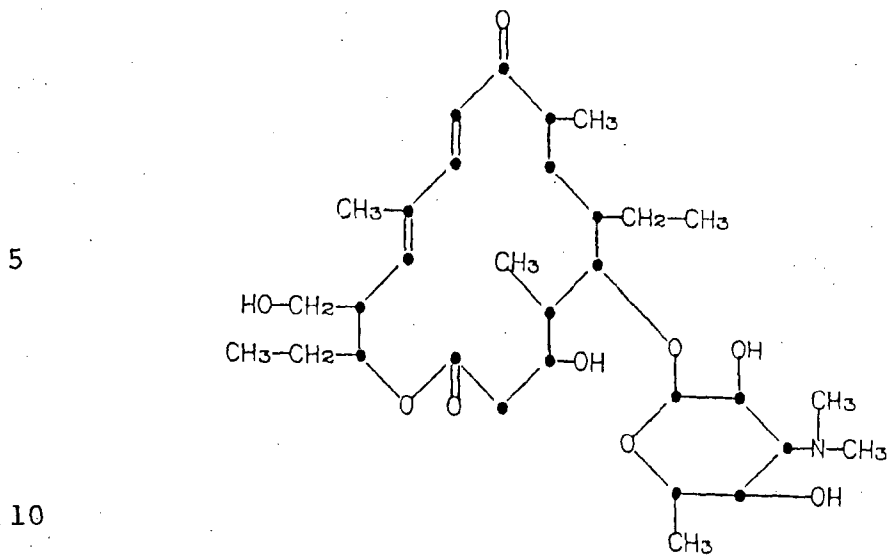
20



III

25

Kun Q tarkoittaa yetyä, kaavan (I) yhdiste on
20-dihydro-20-deoksi-5-O-mykaminosyylitylonolidi
(DH-DO-OMT):



Vaikka stereokemiallisia ominaisuuksia ei ole ilmaistu edellä esitetyille rakenteille, yhdisteiden stereokemia on identtinen tylosiinin stereokemiaan. Neutraali sokeri on mykaroosi ja aminosokeri on mykaminoosi.

15 Kuten edellä on esitetty, DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT inhiboivat eläimille patogeenisten orgaanisten kasvua. Tarkemmin ilmaistuna DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT ovat bakteerikasvua estäviä aineita, jotka ovat aktiivisia gram-positiivisia mikro-organismeja ja Mycoplasma -lajeja vastaan.

20 DH-DO-DMT:n asemissa 2', 4'', 3'', 23 ja 3 olevat hydroksyyli-ryhmät ja DH-DO-OMT:n asemissa 2', 4', 23 ja 3 olevat hydroksyyli-ryhmät voidaan esteröidä, jolloin muodostuu käyttökelpoisia asyyliesterijohdannaisia. 2'-4'-asemissa olevien hydroksyyli-ryhmien esteröinti on helpointa. Tyypillisiä estereitä ovat monokarboksyylihappojen esterit ja 2 - 18 hiiliatomia sisältävien dikarboksyylihappojen hemiesterit.

25 DH-DO-DMT, DH-DO-OMT ja niiden asyyliesterijohdannaiset ovat emäksisiä yhdisteitä, jotka happokäsittelyssä muuttuvat happoadditiosuoloiksi. Nämä happoadditiosuolat ovat myös osa tätä keksintöä.

30

Tämä keksintö liittyy edelleen uuteen mikro-organismiin, joka on luokiteltu Streptomyces fradiae -kannaksi, ja menetelmään tuottaa DH-DO-DMT ja DT-DO-OMT kasvattamalla tätä mikrobikantaa nestemäisissä, aerobisissa kasvatusolosuhteissa, kunnes merkittävä määrä antibioottisia aktiivisuutta muodostuu. DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT voidaan uuttaa emäksiseksi tehdyn kasvuliuksen suodoksesta polaarisisilla orgaanisilla liuottimilla ja ne voidaan edelleen puhdistaa uutosto-, kromatografia- ja/tai kietytysmenetelmillä.

10 Tämä keksintö liittyy myös menetelmään valmistaa DH-DO-OMT miedolla DH-DO-DMT:n happohydrolyysillä.

DH-DO-DMT:n (vapaa emäs) ja DH-DO-OMT:n (vapaa emäs) infrapuna-absorptiospektrit kloroformissa mitattuina esitetään mukana olevissa seuraavissa liitteissä:

Kuva 1 - DH-DO-DMT

15 Kuva 2 - DH-DO-OMT.

Seuraavat luvut kuvaavat DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n ominaisuuksia.

DH-DO-DMT

DH-DO-DMT:n rakenne esitetään kaavassa (1).

20 DH-DO-DMT on valkoinen likimääräinen, suhteellinen alkuainekoostumus on seuraava: hiili, 63 %, vety, 9 %; typpi, 2 %; happi, 26 %. DH-DO-DMT:n empiirinen kaava on $C_{38}H_{65}NO_{12}$ ja sen molekyylipaino on noin 728 (727 määritettyä kenttä-desorptio massaspektrometrillä).

25 DH-DO-DMT:n, vapaana emäksenä kloroformissa, infrapuna-absorptiospektri esitetään mukana olevassa piirroksessa kuva 1. Havaittavat absorptiomaksimit esiintyvät seuraavilla taajuuksilla (cm^{-1}): 3676 (heikko), 3598 (heikko), 3470 (laaja, leveä), 3010 (voimakas), 2974 (voimakas), 2938 (voimakas), 2925 (olka), 2880 (voimakas), 30 2799 (heikko), 2457 (heikko, leveä), 1715 (voimakas), 1675 (keskivoimakas), 1629 (heikko), 1595 (hyvin voimakas),

1456 (voimakas), 1411 (voimakas), 1380 (voimakas),
 1363 (olka), 1315 (voimakas), 1273 (heikko), 1263 (olka),
 1220 (heikko, leveä), 1184 (voimakas), 1162 (voimakas),
 1144 (heikko), 1117 (keskivoimakas), 1096 (olka), 1076
 (voimakas/olka), 1050 (hyvin voimakas), 1015 (voimakas),
 5 997 (keskivoimakas), 986 (keskivoimakas), 958 (keskivoima-
 kas), 923 (keskivoimakas), 905 (keskivoimakas), 867 (heik-
 ko), 842 (keskivoimakas), 720 (leveä) ja 660 (heikko).

DH-DO-DMT:n ultraviolettiabsorptiospektri mitat-
 tuna 95 % neutraalissa etanolissa antaa absorptiomaksimin
 aallonpituudella 283 nm (ϵ 21.800).

10 DH-DO-DMT:n (vapaa emäs) ominaiskiertokyky on
 $[\alpha]_D^{25} -46,3^\circ$ (c 3,3, CH₃OH).

DH-DO-OMT

DH-DO-OMT on valkoinen, kiteinen, kiinteä aine,
 jonka sulamispiste on noin 214-217°C. DH-DO-OMT:n liki-
 15 määräinen, suhteellinen alkuainekoostumus on seuraava:
 hiili, 64 %; vety, 9 %; typpi, 2,5 %; happi, 24,5 %.
 DH-DO-OMT:n empiirinen kaava on C₃₁H₅₃NO₉ ja sen molekyyli-
 paino on noin 584 (583 määritettynä kenttä-desorptio
 massapektrometrilla).

20 DH-DO-OMT:n, vapaana emäksenä kloroformissa,
 infrapuna-absorptiospektri esitetään mukana olevassa
 piirroksessa, kuva 2. Havaittavat absorptiomaksimit
 esiintyvät seuraavilla taajuuksilla (cm⁻¹): 3677 (hy-
 vin heikko), 3601 (heikko), 3422 (leveä), 3006 (voi-
 25 makas), 2971 (voimakas), 2937 (voimakas), 2879 (voima-
 kas), 2798 (heikko), 1714 (voimakas), 1677 (voimakas),
 1627 (heikko), 1593 (hyvin voimakas), 1457 (voimakas),
 1407 (heikko), 1382 (keskivoimakas), 1362 (olka), 1315
 (keskivoimakas), 1269 (heikko), 1181 (hyvin voimakas),
 30 1141 (heikko), 115 (heikko), 1079 ja 1058 (voimakas,
 dupletti), 1008 (keskivoimakas), 983 (keskivoimakas), 923
 (heikko), 903 (heikko), 865 (heikko), 835 (heikko), 712
 (leveä), 658 (heikko) ja 629 (heikko).

35 DH-DO-OMT:n ultraviolettiabsorptiospektri mitattuna
 95 % neutraalissa etanolissa antaa absorptiomaksimin aal-
 lonpituudella 282 nm (ϵ 22,400).

DH-DOOMT:n (vapaa emäs) ominaiskiertokyky on seuraava" $\frac{[\alpha]_D^{25}}{c} = 7,35$ (c 6, CH₃OH).

Taulukossa 1 esitetään ¹H ydinmagneettinen resonanssi (NMR) tulokset mitattuna CDCl₃:ssa 360 MHz käyttäen DH-DO-OMT:n vapaa emäs -muodolle.

5

Taulukko 1

360 MHz NMR tulokset DH-DO-OMT:lle

	<u>Asema</u>	<u>δ *</u>
10	2	2,0/2,5
	3	3,7-3,85
	4	1,64
	5	3,7-3,85
	6	NA**
	15	7
20	8	2,8
	10	6,27
	11	7,27
	13	5,78
	14	2,91
	15	4,96
	16	NA/1,64
	17	0,96
25	18	1,05
	19	1,49
	20	0,89
	21	1,18
	22	1,82
	23	3,7-3,85
30	1'	4,31
	2'	3,55
	3'	2,40
	4'	3,08
	5'	3,22
35	6'	1,31
	NMe ₂	2,51

^x ppm alakentässä sisäisestä tetrametyylisilaani-standardista

xx NA tarkoittaa ei-havaittu

DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT vapaina emäksinä liukenevat veteen ja useimpiin polaarisiin orgaanisiin liuottimiin, sellaisiin kuin asetoni, metanoli, etanoli, kloroformi, dimetyyliformamidi ja dimetyylisulfoksi. DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n happoadditiosuolat ovat vesiliukoisempia kuin vapaat emäkset.

DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT voidaan erottaa ohutkerroskromatografialla (TLC), DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n likimääräiset R_f -arvot eräässä TLC-systeemissä esitetään yhteenyetomuodossa Taulukossa 2. Havaitsemiseen käytettiin UV-absorptiota.

15

Taulukko 2

Ohutkerroskromatografiatulokset^{a,b}

	<u>Yhdiste</u>	<u>R_f-arvo</u>
	DH-DO-OMT	0,53
20	DH-DO-DMT	0,64

^aAdsorbenssi: E. Merck, Darmstadt - Silica Gel 60

^bAjoliuos: etyyliasetaatti: dietyyliamiini (95:5).

DH-DO-OMT:n valmistus

25

Tämä keksintö liittyy myös menetelmään valmistaa DH-DO-OMT:tä miedolla happohydrolyysillä DH-DO-DMT:stä. Miedon happohydrolyysin olosuhteet ovat tunnetut alan teollisuudessa. Tarkoituksenmukaisia liuoksia, joiden pH on noin tai sen alapuolella voidaan käyttää lämpötiloja alueella noin 20°C - noin 100°C. Tarvittava reaktioaika hydrolyysin suorittamiseksi vaihtelee riippuen reaktioseoksen pH:sta ja käytetystä lämpötilasta.

30

Korkeammilla pH-tasoilla reaktionopeus on hitaampi ja korkeammassa lämpötilassa reaktionopeus on nopeampi.

Reaktio suoritetaan käsittelemällä DH-DO-DMT:tä laimealla happoliuoksella ajan, joka on riittävä aikaansaamaan mykarosyyliiryhmän irtoamisen, jolloin DH-DO-OMT muodostuu.

5 Vaihtoehtoisesti, ja joskus edullisesti, DH-DO-OMT voidaan valmistaa käsittelemällä DH-DO-DMT:tä kasvuliuk-
sessa, jossa se on tuotettu, käyttäen lievästi happamia olosuhteita kuten edellä on kuvattu riittävän ajan
muuttamaan DH-DO-DMT:n DH-DO-OMT:ksi. Täten valmistettu
10 DH-DO-OMT voidaan eristää kasvuliuksesta tässä kuvatuilla tekniikoilla.

Esterijohdannaiset

DH-DO-DMT voidaan esteröidä asemissa 2', 4'', 3'',
23 ja 3 olevista hydroksyyliiryhmistä tuottamaan asyyli-
15 esterijohdannaisia käsittelemällä sitä asyloivilla reagensseilla käyttäen menetelmiä, jotka ovat tunnettuja alan teollisuudessa. DH-DO-OMT voidaan esteröidä asemissa
2', 4', 23 ja 3 olevista hydrolyysiryhmistä. Tyypillisiin asylointireagensseihin kuuluvat anhydridit, halidit (taval-
20 lisesti emäksen tai muun happoa sitoavan aineen läsnäollessa) ja aktiiviset orgaanisten happojen esterit. Asylointi voidaan myös suorittaa käyttämällä seosta, jossa on orgaanista happoa ja dehydratoivaa reagenssia kuten N,N'-disyloheksyylikarbodiimidiä. Asyloinnit voidaan myös
25 suorittaa entsymaattisesti, kuten Okamuoto et al. ovat kuvanneet U.S. patentissa 4,092,473. Sen jälkeen, kun asylikohdannaiset on muodostettu, ne voidaan erottaa ja puhdistaa tunnetuilla tekniikoilla.

Esteröinti asemissa 2' ja 4' olevissa hydroksyyli-
30 ryhmissä on helppoista. Täten 2'-monoesterijohdannaisia muodostuu DH-DO-DMT:n esteröinnissä selektiivisillä esteröintimenetelmillä, jotka ovat yleisesti tunnettuja alan teollisuudessa, sellaisilla kuin esim. antibiootin
35 käsittely stökiometrisellä määrällä (tai lievällä ylimäärällä) asyloivaa reagenssia kuten asylianhydridi, suun-

nilleen huoneenlämpötilassa noin 1 ~ noin 24 tunnin ajan, kunnes esteröinti on käytännöllisesti katsoen täydellinen. Nämä johdannaiset voidaan eristää reaktioseoksesta käyttäen vakiomenetelmiä kuten uutosto, kromatografia ja kiteytys. DH-DO-OMT:n esteröinti samanlaisissa olosuhteissa tuottaa 2',4'-diesterijohdannaisia. DH-DO-OMT:n 2'-monoestereitä valmistetaan hydrolysoimalla vastaavia DH-DO-DMT:n 2'-monoestereitä käyttäen edellä kuvatunlaisia lievästi happamia olosuhteita. DH-DO-OMT:n 2',4'-diesterioseoksia valmistetaan sitten esteröimällä DH-DO-OMT:n 2'-monoestereitä edellä kuvatulla tavalla.

Käyttökelpoisia estereitä muodostaviin orgaanisiin happoihin kuuluvat alifaattiset, sykloalifaattiset, aryyli-, aralkyyli-, heterosykliset karboksyyli-, sulfoni- ja alkoksikarbonihapot, joissa on 2-18 hiiliatomia, ja vastaaviin epäorgaanisiin happoihin kuuluvat sellaiset kuin rikki- ja fosforihapot.

Sopivia edistajia estereitä ovat ne, joita muodostetaan hapoista, kuten etikka-, kloorietikka-, propioni-, voi-, isovaleriaani-, alkoksikarboni-, steariini-, syklopropanikarboksyyli-, sykloheksaanikarboksyyli-, beta-sykloheksyylipropioni-, 1-adamantaanikarboksyyli-, bentsoe-, fenyylietikka-, fenoksietikka- manteli- ja 2-tienyylietikkahapoista ja alkyyli-, aryyli- ja aralkyyli-sulfonihapoista. Aryyli- ja aralkyylihapot voivat vaihtoehtoisesti sisältää sellaisia substituentteja kuten halogeeni, nitro, alempi alkoksi ja sen kaltaisia aromaattisia yksiköitä. Sopiviin estereihin kuuluvat myös hemiesterit, jotka on muodostettu dikarboksyylihapoista kuten meripihka-, omena-, fumaari-, maloni- ja ftaalihapot.

Farmaseuttisesti käyttökelpoiset esterijohdannaiset ovat valittu ryhmä. Muut esterijohdannaiset ovat kuitenkin käyttökelpoisia väliyhdisteenä.

30

Suolat

DH-DO-DMT, DH-DO-OMT ja niiden tietyt johdannaiset muodostavat happoadditiosuoloja. DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n ja niiden asyylijohdannaisten happoadditiosuolat ovat myös osa tätä keksintöä. Sellaiset suolat ovat käyttökelpoisia

esimerkiksi eristettäessä, puhdistettaessa ja kiteytettäessä DH-DO-DMT:tä, DH-DO-OMT:tä ja niiden asyylijohdannaisia. Lisäksi suoloilla on parempi vesiliukoisuus.

Sopivia edustajia suoloista ovat ne, joita muodostetaan tavanomaisilla rektioilla sekä orgaanisten happojen että epäorgaanisten happojen kanssa, sellaisen kuin esim. rikki-, suola-, fosfori-, etikka-, meripihka-, sitruuna-, maito-, omena-, fumaari-, palmitiini-, koliini-, pamoliini-, lima-, D-glutamiini-, d-kamfori- glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, muurahais-, lauriini-, stea-
 10 riini, salisyyl-, metaanisulfo-, bentseeni-sulfo-, sorbiini-, pikriini-, bentsoe-, kaneli- ja vastaavan kaltaiset hapot.

Farmaseuttisesti käyttökelpoiset happoadditiosuolat ovat erityisen valittu ryhmä tämän keksinnön suoloja. Farmaseuttisesti käyttökelpoisia suoloja ovat ne, joita
 15 voidaan käyttää turvallisesti ja tehokkaasti lämminveristen eläinten lääkitykseen.

DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n valmistus S.fradiae:n ayulla

DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT valmistetaan kasvattamalla
 20 Streptomyces fradiae antaa, sellaista kuin S. fradie ATCC 31733, joka tuottaa näitä yhdisteitä nestemäisissä aerobisissa olosuhteissa sopivassa kasvatusliuoksessa, kunnes huomattava antibioottinen aktiivisuus saavutetaan. Streptomyces fradiae ATCC 31733 kannan kasvattamiseen
 25 käytetty kasvuliuos voi olla mikä tahansa lukuisista kasvuliuoksista. Tuotantotaloudelliselta kannalta, optimaalinen tuotto ja tuotteen eristämisen helppous, kuitenkin tietyt kasvuliukset ovat suositumpia. Täten esimerkiksi valittuihin hiililähteisiin tehdasmittakaavai-
 30 sessa kasvatuksessa kuuluvat hiilihydraatit kuten dekstriini, glukoosi, tärkkelys ja maissijauho, ja öljyt kuten soijaöljy.

Valittuihin tyypilähteisiin kuuluvat maissijauho, soijajauho, kalajauho, aminohapot ja näiden kaltaiset aineet. Ravinteisiin kuuluvina epäorgaanisina suoloina, joita voidaan kasvuliukseen sisällyttää, käytetään tavanomaisia liukoisia suoloja, jotka voivat tuottaa rautaa, kaliumia, 5 natriumia, magnesiumia, kalsiumia, ammonium-ioneja, klooria, karbonaattia, sulfaattia, nitraattia ja näiden kaltaisia ioneja.

Välttämättömiä hiyenaineita, jotka ovat tarpeellisia organismin kasvulle ja kehittymiselle pitää myös sisällyttää kasvuliukseen. Sellaisia hiyenaineita tavallisesti esiintyy epäpuhtautena muissa kasvuliuksen rakenneosissa, sellaisia määriä, jotka ovat riittäviä tyydyttämään organismin kasvuvaatimukset. Voi olla välttämätöntä lisätä 10 pieniä määriä (ts. 0,2 ml/L) vaahdonestoainetta kuten polypropyleeniglykolia (M.p. noin 2000) tehdasmittakaavaisen kasvatuliukseen, jos vaahtoaminen muodostuu ongelmaksi. 15

Tuotettaessa huomattavia määriä DH-DO-DMT tai DH-DO-OMT liuksessa tapahtuva aerobinen tankkikasvatus 20 on edullista. Pieniä määriä DH-DO-DMT tai DH-DO-OMT voidaan saada ravistelupullokasvatuksella. Johtuen lagajasta antibioottituotannossa, joka tavallisesti liittyy suurten tankkien ympärykseen itiömuotoisella organismilla, on edullista käyttää kasvuvaiheessa olevaa ymppeä. Kasvuvaiheessa 25 oleva ymppe valmistetaan ymppeämällä pieni kasvuliuostilavuus organismin itiömuodolla tai rihmamaisilla fragmenteilla, jolloin muodostuu nuori, aktiivisesti kasvava organismiviljelmä. Kasvuvaiheessa oleva ymppe sitten siirretään suurempaan tankkiin. Kasvuvaiheessa olevan ympin 30 muodostamiseen käytetty kasvuliuos voi olla sama kuin mitä käytetään suurempiin kasvatuksiin, mutta myös muita kasvuliuksia voidaan käyttää.

S. fradiae ATCC 31733 kantaa voidaan kasvattaa lämpötiloissa välillä noin 10°C - noin 40°C. Optimiantibiottituotanto osoittautuu tapahtuvan lämpötiloissa noin 28°C.

5 Kuten on tavanomaista aerobisille, nestemäisille kasvatusprosesseille, steriiliä ilmaa kuplitetaan kasvuliuksen läpi. Tehokkaan antibiottituotannon saamiseksi ilman prosentuaalisen kyllästysasteen tankkituotannossa tulisi olla noin 30 % tai sen yläpuolella (28°C:ssa ja 1 atm paineessa).

10 Antibiottituotantoa voidaan seurata kasvatuksen aikana testaamalla kasvuliuosnäytteitä organismeilla, joiden tunnetaan olevan herkkiä näille antibiooteille. Eräs käyttökelpoinen koeorganismi on Staphylococcus aureus ATCC 9144. Koe suoritetaan käyttökelpoisesti soveltaen automaattista turbidometrasta menetelmää.

15 Lisäksi voidaan antibiottituotantoa seurata helposti korkean suorituskyvyn nestekromatografialla (HPLC) käyttäen UV-detektoria.

DH-DO-DMT tai DH-DO-OMT tuotannon jälkeen nestemäisissä aerobisissa kasvatusolosuhteissa, ne voidaan erottaa kasvuliuksesta teollisuudessa tunnetuilla menetelmillä. DH-DO-DMT:n tai DH-DO-OMT:n erottaminen suoritetaan alkuvaiheessa kasvuliuksen suodatuksella. Suodatettu kasvuliuos voidaan sitten edelleen puhdistaa tuottamaan halutun antibiootin. Lukuisia eri menetelmiä voidaan käyttää tässä puhdistuksessa. Valittu menetelmä suodatetun kasvuliuksen puhdistamiseksi sisältää liuoksen pH:n säätämisen noin arvoon 9; kasvuliuksen uuttamisen sopivalla liuottimella kuten etyyliasettaatti, amyliasettaatti tai metyyli-isobutyryliketoni; orgaanisen faasin uuttamisen happamalla vesiliuoksella; ja antibiootin saostamisen tekemällä vesiuute emäksiseksi. Jatkopuhdistus sisältää uutoksen sekä kromatografisten ja/tai saostamis-
30 menetelmien käytön.

Uusi-mikro-organismi, joka tuottaa SH-DO-DMT ja DH-DO-OMT, saatiin tylosiinia tuottavasta Streptomyces fradiae kannasta kemiallisella mutageneesilla. Uusi mikro-organismi tuottaa vain minimaalisia määriä tylosiinia, mutta tuottaa pääkomponentteina DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT
5 suunnilleen yhtä suurissa määrin.

Uusi DH-DO-DMT:ta ja DH-DO-OMT:ta tuottava mikro-organismi luokitellaan myös Streptomyces fradiae kannaksi. Uuden mikro-organismien viljelmä annettiin ja liitettiin osaksi varastoviljelmäkokonaisuutta The American
10 Type Culture Collection, 1230 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, lokakuun 16. p:nä 1980, josta se on yleisön saatavissa määritysnumerolla ATCC 31733.

Kuten tapahtuu muillakin organismeilla. Streptomyces fradiae ATCC 31733 kannan ominaisuudet ovat alttiita
15 vaihteluille. Esimerkiksi keinotekoisia variaatioita ja mutanteja ATCC 31733 kannasta voidaan saada käsittelemällä sitä erilaisilla tunnetuilla fysikaalisilla ja kemiallisilla mutageneesilla kuten ultraviolettisäteillä, X-säteillä, gamma-säteillä ja N-metyyli-N'-nitro-N-nitroguanidiinilla. Kaikkia luonnollisia ja keinotekoisia variaatioita,
20 mutanteja, ja rekombinaatteja Streptomyces fradiae ATCC 31733 kannasta, joilla on jäljellä ominaisuus tuottaa DH-DO-OMT ja/tai DH-DO-DMT, voidaan käyttää tässä keksinnössä.

DH-DO -DMT ja DH-DO-OMT inhiboivat patogeenisten bakteerien kasvua, erityisesti gram-positiivisia bakteereja
25 ja Mycoplasma lajeja. Taulukossa 3 esitetään yhteenvetona pienimmät inhiboivat pitoisuudet (Minimal Inhibitory Concentrations, MIC) määritettyinä vakio agar-laimennuskokeilla, joissa DH-DO-DMT ja DH-DO-OMT (vapaina emäksinä) inhiboivat tiettyjä bakteereja.

Taulukko 3

5

DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n in vitro aktiivisuus.

	<u>Organismi:</u>	<u>MIC (ug/ml)</u>	
		<u>DH-DO-DMT</u>	<u>DH-DO-OMT</u>
10	<u>Staphylococcus aureus</u> NRRL B313	128	4
	<u>Staphylococcus aureus</u> V41	128	4
	<u>Staphylococcus aureus</u> X400	>128	8
	<u>Staphylococcus aureus</u> S13E	64	4
	<u>Staphylococcus epidermidis</u> EPI1	128	8
15	<u>Staphylococcus epidermidis</u> EPI2	64	8
	<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	>128	8
	<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park 1	>128	8
	<u>Streptococcus faecium</u> ATCC 9790	>128	16
20	<u>Streptococcus sp. ryhmä D</u> 9960	>128	16
	<u>Haemophilus influenzae</u> C.L.	>128	16
	<u>Haemophilus influenzae</u> 76	>128	16
	<u>Shigella sonnei</u> N9	>128	>128
25	<u>Escherichia coli</u> N10	>128	>128
	<u>Escherichia coli</u> EC14	>128	>128
	<u>Escherichia coli</u> TEM	>128	64
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> X26	>128	4
30	<u>Klebsiella pneumoniae</u> KAE	>128	>128

DH-DO-OMT inhiboi myös tiettyjä anerobisia bakteereja. Taulukossa 4 esitetään yhteenyetona MIC-pitoisuudet, joissa DH-DO-OMT inhiboi näitä bakteereja. MIC-pitoisuudet määritettiin käyttäen vakio agar-laimennuskoetta ja lukemalla loppupiste 24 tunnin kuluttua.

Taulukko 4

5

DH-DO-OMT:N in vitro aktiivisuus anaerobisten bakteerien suhteen

	<u>Organismi</u>	<u>MIC (µg/ml)</u>
	<u>Clostridium difficile</u> 2994	2
10	<u>Clostridium perfringens</u> 81	2
	<u>Clostridium septicum</u> 1128	2
	<u>Eubacterium aerofaciens</u> 1235	2
	<u>Peptococcus asaccharolyticus</u> 1302	>8
	<u>Peptococcus prevoti</u> 1281	>8
15	<u>Peptostreptococcus anaerobius</u> 1428	>8
	<u>Peptostreptococcus intermedius</u> 1264	>8
	<u>Propionibacterium acnes</u> 79	2
	<u>Bacteroides fragilis</u> 111	>8
20	<u>Bacteroides fragilis</u> 1877	>8
	<u>Bacteroides fragilis</u> 1936B	>8
	<u>Bacteroides thetaiotaomicron</u> 1438	>8
	<u>Bacteroides melaninogenicus</u> 1856/28	>8
25	<u>Bacteroides melaninogenicus</u> 2736	>8
	<u>Bacteroides vulgatis</u> 1211	>8
	<u>Bacteroides corrodens</u> 1874	>8
	<u>Fusobacterium symbiosum</u> 1470	>8
	<u>Fusobacterium necrophorum</u> 6054A	8

DH-DO-OMT inhiboi myös Chlamydia trachomatis mikrobia, joka on kasvatettu soluyiljelmässä, MIC-pitoisuuden ollessa 0,5 µg/ml. Lisäksi DH-DO-OMT inhiboi Mycoplasma lajeja. Esimerkiksi DH-DO-OMT:n MIC-pitoisuus oli 12,5 µg/ml sekä M. gallisepticum'in että M. synoviae'n suhteen.

- 5 DH-DO-OMT om osoittanut in vivo mikrobikasvua estävää aktiivisuutta kokeellisten bakteeri-infektioiden suhteen. Annettaessa kaksi annosta testiyhdistettä hiirille, joille oli aiheutettu kokeellisia infektoita, määritettiin havaittu aktiivisuus ED₅₀-arvona (Effective Dose, tehokas annostus mg/kg, joka parantaa 50 % koe-eläimistä: ks. Warren Wick et al., J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)). Havaitut ED₅₀-arvot DH-DO-OMT:lle (vapaa emäs) esitetään Taulukossa 5.

Taulukko 5

DH-DO-OMT:n in vivo aktiivisuus kokeellisten infektioiden suhteen hiirillä

<u>Organismi</u>	<u>Annostelu-</u> <u>tapa</u>	<u>Bakteerivaikutus</u> <u>(LD₅₀)</u>	<u>ED₅₀</u> <u>-arvo</u> <u>(mg/kg x 2)</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	suun kautta	100	44
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	ihonalaisesti	221	37.3
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	suun kautta	64	75.3
<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	suun kautta	20.4	223.6

Tämän keksinnön makrolidit käytetään tavallisesti terapeuttisiin tarkoituksiin lääkeaineseosten muodossa. joissa aktiivinen aineosa sidotaan yhteen tai useampaan ei-toksiseen kantajaan. Sellaisten formulaatioiden ja kantajien luonne on tavanomainen ja on hyvin tunnettu edistyksellisessä alan teollisuudessa.

Vaikka DH-DO-DMT:llä ja sen johdannaisilla on jonkin verran bakteerikasvua estävää aktiivisuutta, käytetään näitä yhdisteitä parhaiten vastaavien DH-DO-OMT-yhdisteiden väliyhdisteinä.

DH-DO-OMT:tä, sen asyyliesterijohdannaisia ja niiden happoadditiosuoloja voidaan myös käyttää pinta-desinfiointiaineina. Liuokset, joissa on niin vähän kuin 0,01 % painostaan näitä yhdisteitä, ovat käyttökelpoisia desinfektiointitarkoituksiin. Sellaiset liuokset, jotka haluttaessa sisältävät myös detergenttiä tai muita puhdistusaineita, ovat käyttökelpoisia desinfektoitaessa kohteita ja pintoja, joissa steriiliolosuhteiden ylläpito on tärkeää.

Tämän keksinnön sisällön täydellisemmäksi kuvaamiseksi esitetään seuraavat esimerkit:

Esimerkki 1

A.DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n ravistelupullokasvatus

Lyofilisoitu Streptomyces fradiae ATCC 31733 pelletti dispersoitiin 1-2 Ml:aan steriloitua vettä. Osa tästä liuksesta (0,5 ml) käytettiin ympäämään kasvuliuos (150 ml), jonka koostumus oli seuraava:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
Fermentoitua maissiliuosta (corn steep liquor)	1,0
Hiivauute	0,5
Soijarouhe	0,5
CaCO ₃	0,3
Soijäöljy (raakaöljy)	0,45
Deionisoitu vesi	97,25

Vaihtoehtoisesti kasvuyvaiheessa oleva viljelmä S. fradiae ATCC 31 733 kantaa, joka oli varastoitu 1 ml tilavuuksina nestemäisessä työssä, sulatettiin nopeasti ja käytettiin ymppäämään kasvuliuos. Ympättyä kasvuliuosta inkuboitiin 500 ml Erlenmeyer-pullossa 29°C:ssa noin 48 tunnin ajan suljetussa laatikkoravistelijassa käyttäen kierroslukua 300 rpm.

Tätä inkuboitua kasvuliuosta (0,5 ml) käytettiin ymppäämään 7 ml tuotantokasvuliuosta, jonka koostumus oli seuraava:

Aineosa	Määrä (%)
Juurikasmelassi	2,0
Maissijauho	1,5
Kalajauho	0,9
Maissigluteeni	0,9
NaCl	0,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
CaCO ₃	0,2
Soijäöljy (raakaöljy)	3,0
Deionisoitu vesi	91,36

Ympättyä kasvuliuosta inkuboitiin 50 ml pullossa 29°C:ssa noin 6 päivää suljetussa laatikkoravistelijassa käyttäen kierrosnopeutta 300 rpm.

30 B. DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n tankkikasvatus

Suurten yppitilavuuksien saamiseksi 1200 ml inkuboitua kasvuliuosta, joka oli valmistettu samankaltaisesti kuin mitä sektiossa A kuvattiin, käytettiin ymppäämään 250 gallonaa (946 litraa)^x toisen vaiheen vegetatiivista kasvuliuosta, jonka koostumus oli seuraava:

Aineosa	Määrä (%)
Fermentoitu maissiliuos	1,0
Soijajauho	0,5
Hiiuvauute	0,5
CaCO ₃	0,3
Soijäöljy (raakaöljy)	0,5
Lesitiini (raakalesitiini)	0,015
Vesi	97,185

pH säädettiin 8,5 :ksi 50 % NaOH-liuoksella.

x) 1 U.S. gallona = 3.785 litraa
1 Imp gallona = 4.5435 litraa

Täten toisen vaiheen kasvuliuosta inkuboitiin 350 gallonan (1325 litraa)^x tankissa noin 48 tuntia (1590 litraa) 28°C:ssa käyttäen asiammukaista ilmastusta ja ravistelua.

Täten valmistettu, inkuboitu toisen vaiheen kasvuliuos (144 gallonaa, 545 litraa)^x käytettiin ymppäämään 5 1000 gallonaa (3785 litraa)^x steriiliä tuotantokasvuliuosta, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
	Kalajauho	0,875
10	Maissijauho	1,5
	Maissigluteeni	0,875
	CaCO ₃	0,2
	NaCl ³	0,1
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
	Juurikasmelassi	2,0
	Soijaöljy (raakaöljy)	3,0
	Lesitiini	0,09

15 pH säädettiin 7.2:ksi 50 % NaOH-liuoksella.

Ympätyn kasvuliuksen annettiin kasvaa 1600 gallonan (6056 litraa)^x tankissa 8 - 9 päivää 28°C:n lämpötilassa. (7270 litraa) Kasvuliuosta ilmastettiin steriilillä ilmalla liuenneen happitason pitämiseksi välillä noin 30-50 % ja kasvutasoa sekoitettiin tavanomaisilla sekoittimilla noin 250 rpm.

20 Esimerkki 2

DH-DO-DMT:n ja DH-DO-OMT:n erottaminen

Koko kasvuliuos (38 L), joka oli valmistettu E i-merkissä 1, sektio B, kuvatulla tavalla, suodatettiin käyttäen suodatuspesuainetta. Huovastomainen kakku pestiin vedellä ja suodos ja pesuliuos (30 L) säädettiin pH-arvoon 25 9,1 10 % NaOH-liuoksella. Saatua liuosta uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla (15 L ja 5,5 L). Etyyliasetaatit-uutteet yhdistettiin ja yhdistettyä liuosta uutettiin 9 L:lla ja sitten 3 L:lla laimeaa fosforihappoliuosta (vesiliuos, jonka pH oli säädetty arvoon 4,1 lisäämällä 28 % H₃PO₄). Yhdistettyjä vesiuutteita (8,8 L), joiden 30 pH oli säädetty arvoon 9,2 NaOH:lla, uutettiin kahdesti

kloroformilla (2 L kummallakin kerralla). Kloroformi-
utteet kuivattiin ja 32 g kiinteää ainetta saatiin,

Osa tästä materiaalista (5 g) liuotettiin etyyli-
asetattiin ja käsiteltiin käyttäen kuusivaiheista
vastavirtahajontamenetelmää etyyliasetaatilla ja 0,5 M
5 fosfaattipuskurilla, pH 6,1, tuottamaan 2,5 g DH-DO-OMT.
Toinen kuusivaiheinen menetelmä pH:ssa 5,5 tuotti lisäksi
0,1 g DH-DO-OMT. DH-DO-OMT kiteytettiin kuivasta ase-
tonista.

Nömä menetelmät tuottivat myös 1,42 g epäpuhdasta
DH-DO-DMT. DH-DO-DMT:n puhdistamiseksi käytettiin vasta-
10 virtasysteemiä, joka muodostui etyyliasetatti:heptaani
(1:2) orgaanisesta faasista ja 0,5 M fosfaattipusku-
rista pH 6,2, vesifaasina. Kuusi vaihetta aikaansaivat
osittaisen DH-DO-DMT:n erottumisen. DH-DO-DMT kitey-
tettiin metanolin vesiluoksesta. Puhdistettuna DH-DO-
DMT:tä saatiin 400 mg 1 g:sta raakamateriaalia.

15 Esimerkki 3

DH-DO-OMT:n valmistaminen DH-DO-DMT:stä

DH-DO-DMT, joka oli valmistettu esimerkissä 2 ku-
vatulla tavalla, liuotettiin laimeaan suolahappoliuok-
seen (suolahappoa lisättiin vesiliuokseen kunnes pH oli 1,8).
20 uloksena olevan liuoksen annettiin seistä 24 tuntia
huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sen pH säädettiin
9,0:ksi NaOH-lisäksellä. Tätä emäksistä liuosta uutettiin
etyyliasetaatilla, dikloorimetaanilla tai kloroformilla.
Uute kuivattiin ja haihdutettiin vakuuissa tuottamaan
DH-DO-OMT.

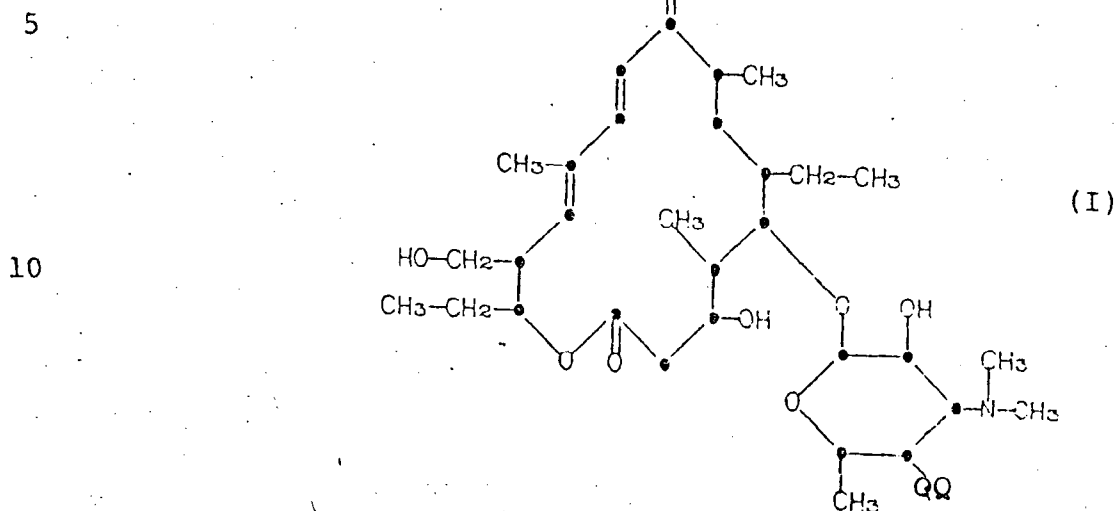
25 Esimerkki 4

Vaihtoehtoinen DH-DO-OMT:n valmistus

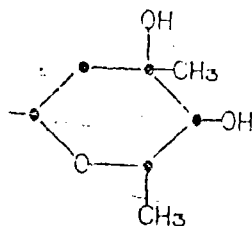
DH-DO-OMT valmistettiin DH-DO-DMT:stä käsittelemällä
DH-DO-DMT:tä kasvuliukoksessa, jossa se tuotettiin, laime-
alla hapolla kuten on kuvattu esimerkissä 3. DH-DO-OMT:n
eristäminen suoritettiin menetelmällä, joka oli samanlainen
kuin esimerkissä 2 kuvattu menetelmä.

Patenttivaatimukset:

1. Lääkeaineseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aktiivisena aineosana makrolidin, jolla on kaava (1):



15 jossa Q on vety tai



20 tai siitä johdetun farmaseuttisesti käyttökelpoisen esterin tai happoaditiosuolan, liitettynä yhteen tai useampaan ei-toksiseen kantajaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen lääkeaineseos, t u n n e t t u siitä, että aktiivisena aineosana on 20-dihydro-20-deoksi-23-demykinosyylytylosiini.

25 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen lääkeaineseos, t u n n e t t u siitä, että aktiivisena aineosana on 20-dihydro-20-deoksi-5-O-mykaminosyylytylonolidi.

4. Missä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 3 määritellyn kaavan (i) muotoisen makrolidin valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmään sisältyy

30 (a) bakteerin Streptomyces fradiae ATCC 31 733 tai siitä johdetun mutantin tai rekombinantin kasvatus kasvuliuoksessa, joka sisältää imeytymiskykyisiä hiili-, typpi-

ja epäorgaanisia suolalähteitä, nestemäisissä aerobisissa kasvuolosuhteissa kunnes huomattava määrä antibiottista aktiivisuutta muodostuu; tai

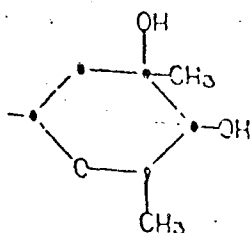
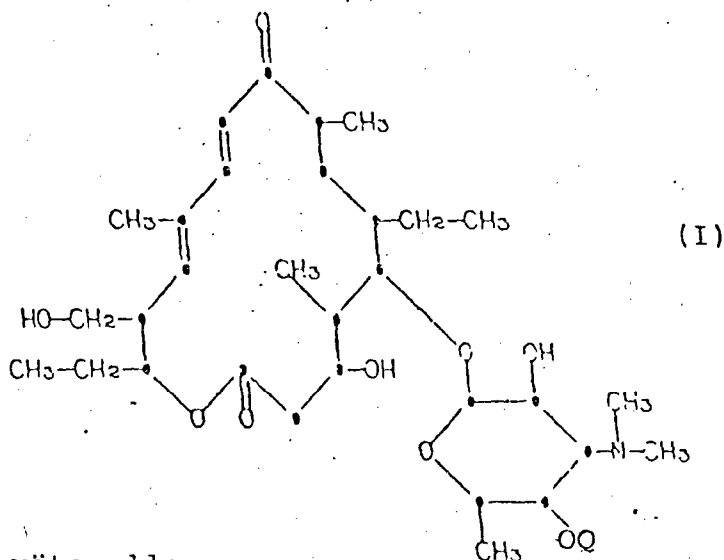
(b) mykarosyyliiryhmän irrottaminen kaavan (i) mukaisesta, patenttivaatimuksessa 1 määritellystä makrolidista, jossa Q ei ole vety, käyttäen mietoa hydrolyysia, kaavan (1) mukaisen makrolidin tuottamiseksi, jossa Q on vety; ja (c) vaihtoehtoisesti esterin tai suolan muodostaminen mistä tahansa kaavan (1) mukaisesta makrolidista, joka on muodostettu edellä kohdan (a) tai (b) mukaisella menetelmällä.

5. Stereptomyces fradiae ATCC 31 733.

6. Kasvuliuos, t u n n e t t u siitä, että siihen sisältyy Streptomyces fradiae ATCC 31 733 ja imeytymiskykyiset hiili-, typpi- ja epäorgaaniset suolalähteet.

Patentkrav:

1. Läkemedelskomposition, k ä n n e t e c k n a d därav att den som aktiv ingrediens omfattar en makrolid med formeln (I)



eller en farmaceutiskt godtagbar ester eller ett dito syraadditionssalt därav, i förening med en eller flera giftfria bärare.

2. Läkemedelskomposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav att den aktiva ingrediensen är 20-dihydro-20-deoxi-23-demycinosyltylosin.

20

3. Läkemedelskomposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d att den aktiva ingrediensen är 20-dihydro-20-deoxi-5-O-mycaminosyltylonolid.

4. Förfarande för framställning av en makrolid med formeln (I) enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a d därav, att det omfattar (a) odlande av *Streptomyces fradiae* ATCC 31 733, eller en mutant eller en rekombination därav, i ett kulturmedium som innehåller assimilerbara källor för kol, kväve och oorganiska salt

25

under indränkta aerobiska jäsningsförhållanden till en väsentlig mängd av antibiotisk aktivitet producerats, eller (b) spjälkande av mycarosylgruppen från en makrolid med den i patentkravet 1 definierade formeln (I), vari Q ej är väte, genom svag hydrolys, för erhållande av en 5 makrolid med formeln (I), vari Q är väte; och (c) eventuellt förestrande eller salifierande av någon makrolid med formeln (I), vilken bildats genom förfarandet i steg (a) eller (b).

5. *Streptomyces fradiae* ATCC 31 733.

6. Kluturmedium, k ä n n e t e c k n a d, att 10 det omfattar *Streptomyces fradiae* ATCC 31 733 och assimilerbara källor för kol, kväve och oorganiska salt.

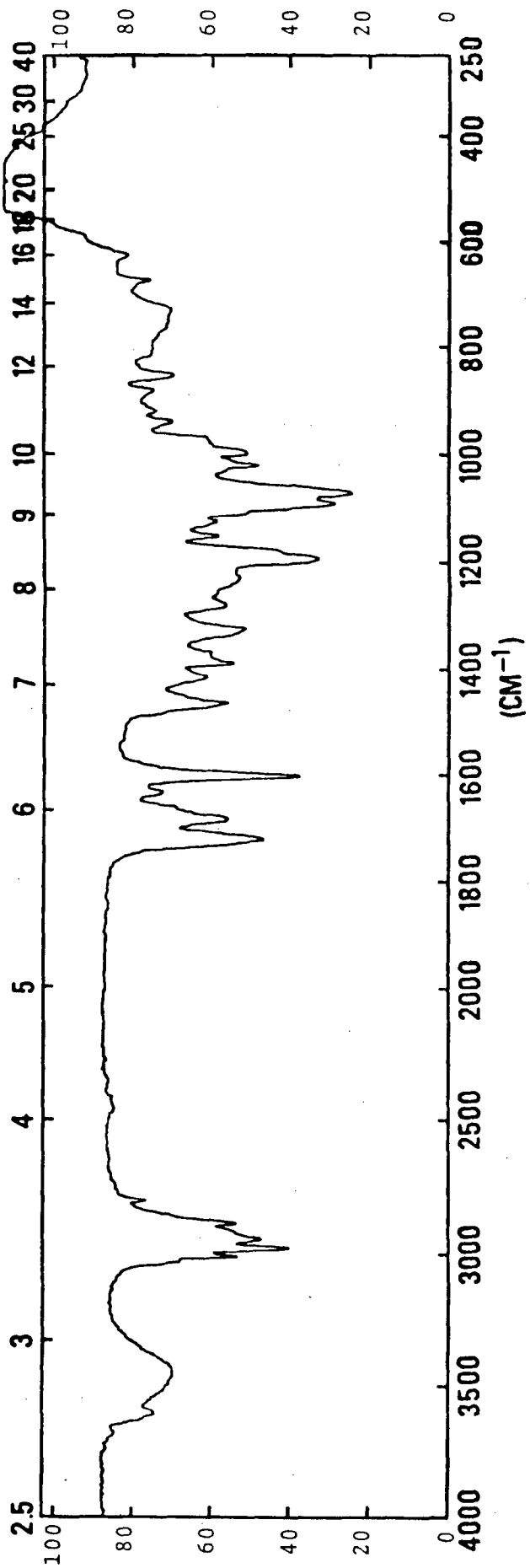


FIG. 7

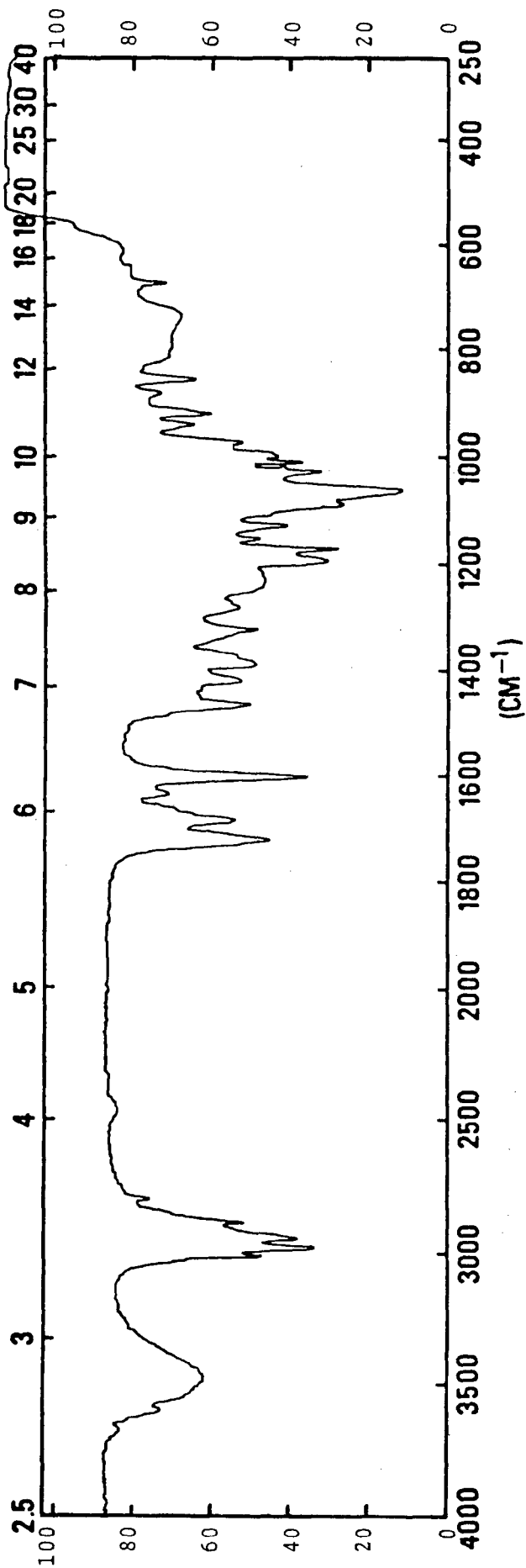


FIG. 2