

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 812209 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 812209

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 19/62
C07H 17/08

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 14.07.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 14.07.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 25.01.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

24.07.1980 GB 8024211

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

3 •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

Makrolidiantibiootit.

Makrolidantibioter.

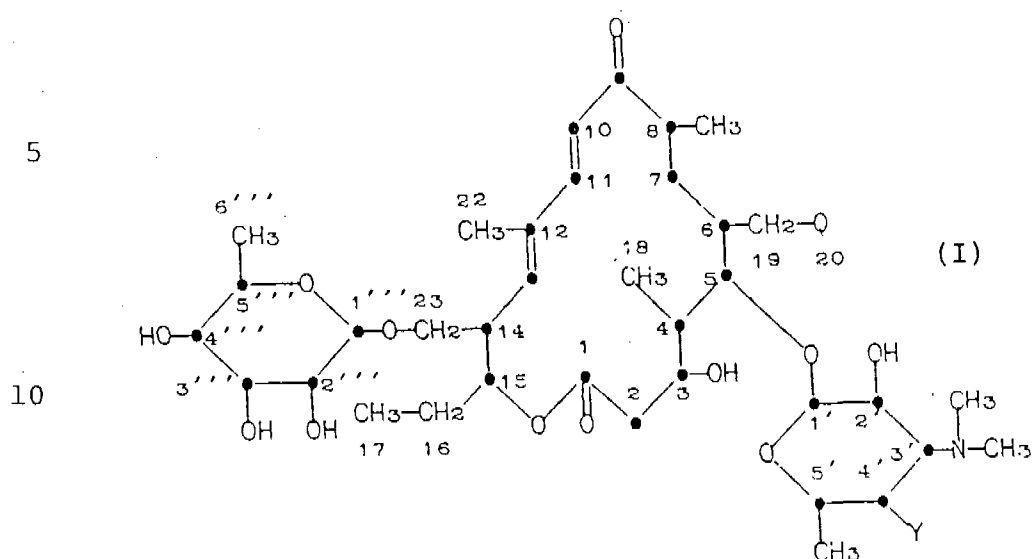
Makrolidiantibiootit

Tämä keksintö liittyy makrolidiantibiootteihin, erityisesti hyvin tunnetun terapeuttisen aineen tylo-
5 siinin kaltaisiin yhdisteisiin (ks. esim. Tetrahedron Letters, 2339 (1970)).

Huolimatta tylosiinin suuresta merkityksestä on kuitenkin olemassa jatkuva tarve kehittää uusia anti-
biootteja, inter alia, huomioonottaen mahdollisuus re-
10 sistanttien kantojen ilmaantumiseen. Edelleen, rakenteel-
linen muunnos voi johtaa muutoksiin herkkien mikro-orga-
nismien luettelossa. Valitettavasti tylosiinin kaltais-
ten makrolidien rakenteen kemiallinen muuttaminen on
osoittautunut äärimmäisen vaikeaksi. Esimerkiksi artik-
15 kelissa J. Org. Chem. 44(12), 2050-2 (1979) esitetään
ongelmia, jotka liittyvät tylosiinin mycinosyyli-glyko-
sidi-sidoksen katkaisemiseen kemiallisin menetelmin.
Todellakin, ylivoimaisessa enemmistössä esitetyistä ta-
pauksista ovat tämän alueen tutkijat selvittäessään
20 uusia rakenteita olleet pakotettuja tutkimaan uusia
mikro-organismeja, joko luonnossa esiintyviä tai syn-
teettisiä, toivossa, että niiden kasvatus tuottaisi lä-
hekkäisiä rakenteita.

Patentinhakijat ovat nyt keksineet, että tylosii-
25 nin kaltaisia yhdisteitä voidaan valmistaa viljelemällä
tiettyjä *Streptomyces fradiae* kantoja submersisti aero-
bisissa olosuhteissa.

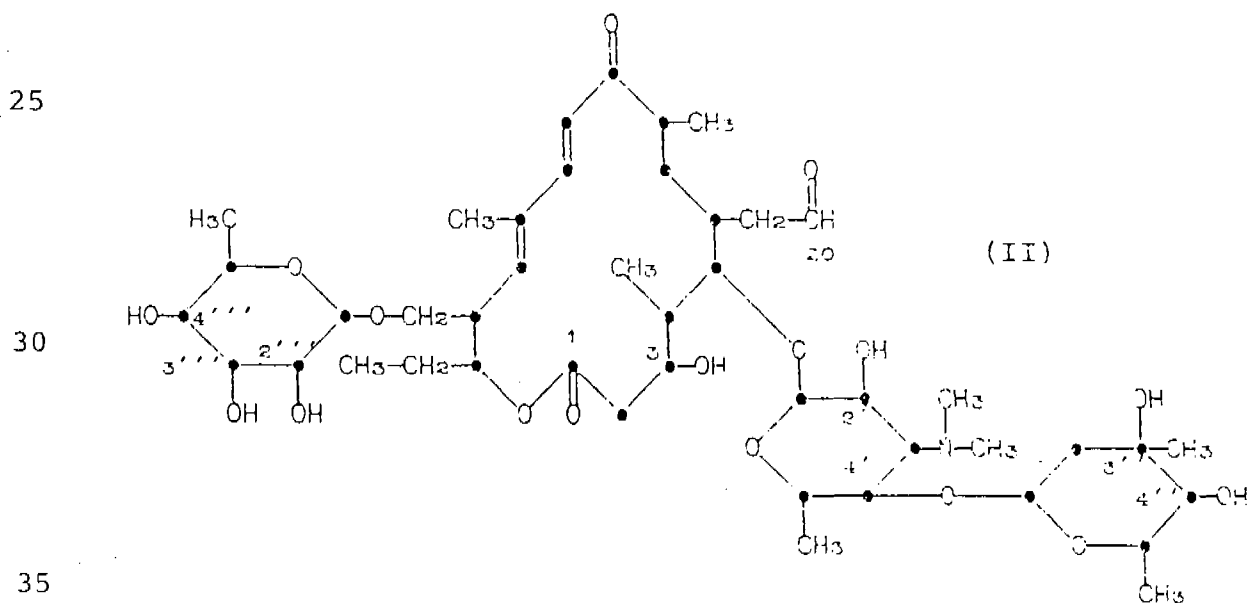
Käsiteltävänä olevan keksinnön mukaan kasvatukses-
sa muodostuu uusi makrolidiantibiootti, jolla on kaavan
30 (I) mukainen rakenne:



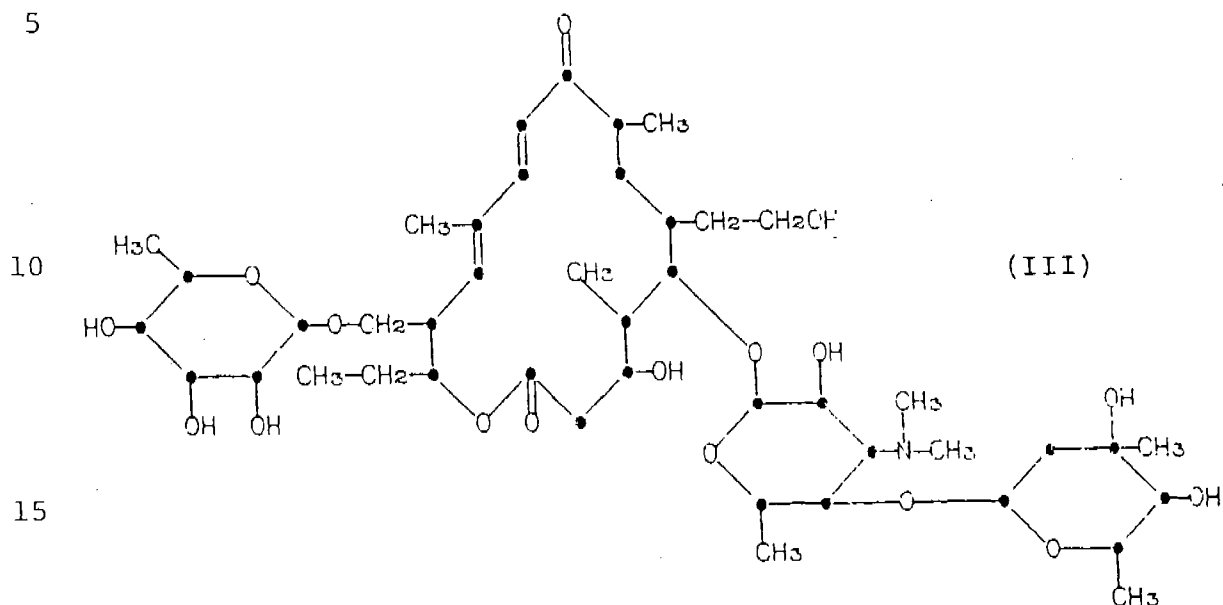
15 missä Q on $-\text{CHO}$ tai $-\text{CH}_2\text{OH}$ ja Y on hydroksyyli- tai mycarosyylioksiryhmä; tai siitä johdettu suola tai ester.

Kaavan (I) mukaiset yhdisteet ovat 2'''-O-demetyylimacrosiini, josta jäljempänä käytetään merkintää "demetyylimacrosiini eli DOMM" ja jolla on kaavan (II) mukainen rakenne:

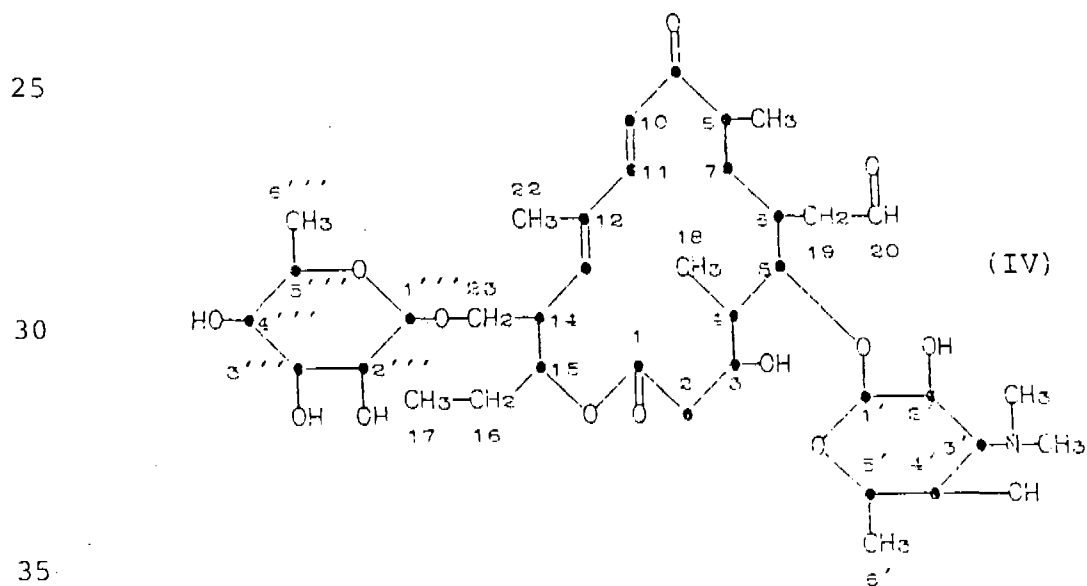
20



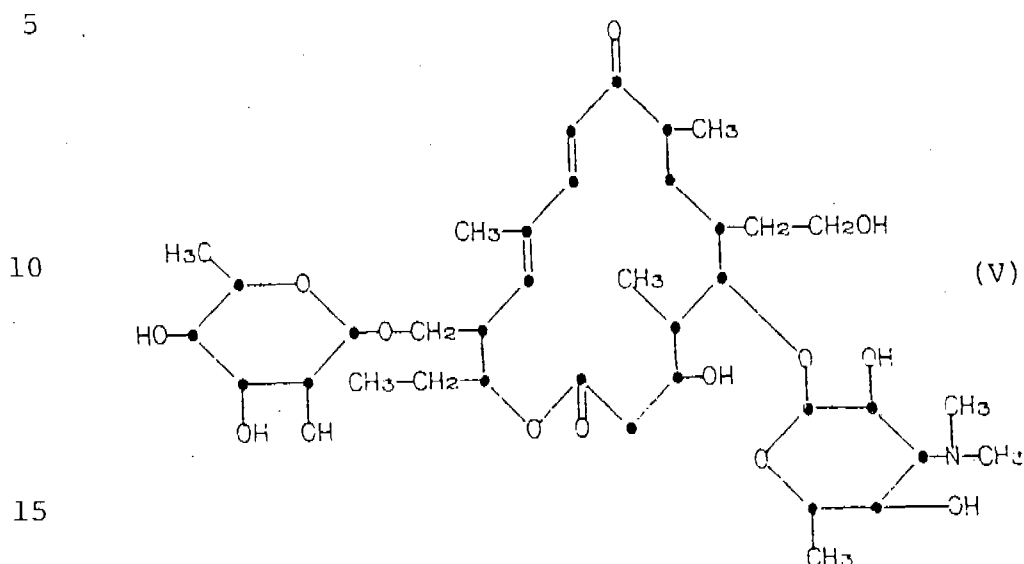
DOMM:in dihydrojohdannainen, ts. 20-dihydro-2''-0-demetyyli-macrosiini, josta jäljempänä käytetään merkintää "dihydro-DOMM" ja jolla on kaavan (III) mukainen rakenne:



20 2''-de-0-metyyliactenosiini, josta jäljempänä käytetään merkintää "DOML" ja jolla on kaavan (IV) mukainen rakenne:



ja 20-dihydro-2''-de-0-metyylilaktenosiini, josta jäljempänä käytetään merkintää "dihydro-DOML" ja jolla on kaavan (V) mukainen rakenne:



ja näistä johdetut suolat ja esterit.

20 Tämän keksinnön yhdisteiden ja hyvin tunnetun makrolidin, tylosiinin, stereokemialliset ominaisuudet ovat identtiset - ks. esim. Tetrahedron Letters, 4737, (1970). Aminosokeri on mycaminoosi, vasemmanpuoleinen neutraali sokeri on 6-deoksi-D-alloosi ja neutraali sokeri rakenteissa (II) ja (III) on mycaroosi.

25 DOMM:in ja dihydro-DOMM:in hydroksyylliryhmät asemissa 2',4'',3'',2'',3'',4'' ja 3 voidaan esteröidä muodostamaan käyttökelpoisia asyyliesterijohdannaisia. DOML:in ja dihydro-DOML:in hydroksyylliryhmät asemissa 2',4',2'',3'',4'' ja 3 voidaan esteröidä muodostamaan käyttökelpoisia asyyliesterijohdannaisia. Lisäksi dihydro-DOMM:in ja dihydro-DOML:in asemassa 20 oleva hydroksyylliryhmä voidaan esteröidä. DOMM:in ja dihydro-DOMM:in 2'-hydroksyylliryhmän esteröiminen on yksinkertaista. DOML:in ja

30

35 dihydro-DOML:in 2'- ja 4'-hydroksyylliryhmät esteröityvät

helposti. Tyypillisiä ovat 2-18 hiiliatomia sisältävien monokarboksyylihappojen ja dikarboksyylihappojen esterit ja hemi-esterit.

DOMM, dihydro-DOMM, DOML, dihydro-DOML ja niiden asyyliesterijohdannaiset ovat emäksisiä yhdisteitä, jotka happojen kanssa reagoiessaan muuttuvat happoadditiosuoloiksi. Nämä additiosuolat ovat myös osa tätä keksintöä. Käyttökelpoisuutta koskevan tarkastelun yksinkertaistamiseksi käytetään merkintää "DOMM yhdiste" ja sillä tarkoitetaan seuraavia yhdisteitä: DOMM, dihydro-DOMM, DOML, dihydro-DOML, näiden yhdisteiden määritelty asyyliesterijohdannainen, tai DOMM:in, dihydro-DOMM:in, DOML:in, dihydro-DOML:in tai näiden asyyliesterijohdannaisten farmaseuttisesti käyttökelpoinen happoadditiosuola.

Tämän keksinnön myöhemmässä tarkastelussa esitetään kaavan (I) mukaisen uuden makrolidin valmistusmenetelmä, mikä sisältää *Streptomyces fradiae* kannan kasvatuksen ilmastoiduissa aerobisissa olosuhteissa, kunnes merkittävä antibioottiaktiivisuustaso muodostuu huomioonottaen, että haluttaessa tuottaa kaavan (IV) tai (V) mukaista yhdistettä, kasvatukseen vaikutetaan käyttämällä lievästi happamia olosuhteita.

Valittua *Streptomyces fradiae* mikro-organismia säilytetään varustettuna tunnuksella ATCC 31 669.

DOMM liukenee veteen ja useimpiin polaarisiin orgaanisiin liuottimiin, sellaisiin kuin asetoni, metanoli, etanoli, kloroformi, dimetyyliformamidi ja dimetyylisulfoksidi. DOMM:in happoadditiosuolat liukenevat veteen paremmin kuin DOMM-emäs.

DOMM voidaan erottaa tylosiinista paperi- ja ohutkerroskromatografialla. DOMM:in ja tylosiinin likimääräiset R_f ja R_x -arvot esitetään yhteenvetona taulukoissa 1 ja 2. Taulukossa 2 R_x -arvolla tarkoitetaan yhdisteen suhteellista liikkuvuutta verrattuna tylosiiniin, jolle

annettiin arvo 1,0. Bioautografiaa *Bacillus subtilis*:
ta käyttäen sovellettiin detektointiin.

Taulukko 1

DOMM:in ohutkerroskromatografia^a

5	Yhdiste	R _f -arvo		
		A ^b	B	C
	Tylosiini	0,53	0,53	0,67
	DOMM	0,05	0,44	0,44

^aAdsorbenssi: Merck, Darmstadt-Silica Gel 60

^bAjoliuos: A= etyyliasetaatti:dietyyliamiini (96:4)
B= asetoni:etanoli (2:1)
C= kloroformi:metanoli (3:1)

15 Taulukko 2

DOMM:in paperikromatografia^a

20	Yhdiste	R _x	
		D ^b	E
	Tylosiini	1,0	1,0
	DOMM	0,17	0,88

^aPaperi: Whatman nro 1, joka oli käsitelty 0,75 M
KH₂PO₄ puskuriliuoksella pH 4,0 ja sen
jälkeen kuivattu

25 ^bAjoliuos: D= vedellä kyllästetty etyyliasetaatti
E= vedellä kyllästetty n-butanoli

DOMM:in dihydrojohdannainen voidaan valmistaa ke-
miallisella pelkistyksellä tai mikrobikasvatuksella.
Valmistettaessa dihydro-DOMM:ia kemiallisella pelkis-
tyksellä voidaan käyttää tunnettuja menetelmiä kuten
30 esim. DOMM:in käsittely likimäärin stökiometrisella
määrällä natriumboorihydridia alkoholiliuoksessa. Di-
hydro-DOMM:ia voidaan myös tuottaa kasvattamalla tämän
keksinnön *S. fradiae* kantaa ATCC 31669 kontrolloiduis-
35 sa kasvatusolosuhteissa.

Tämä keksintö liittyy edelleen menetelmiin valmistaa DOML ja dihydro-DOML miedon happohydrolyysin avulla DOMM:ista ja dihydro-DOMM:ista, vastaavassa järjestyksessä. Dihydro-DOML voidaan myös valmistaa

5 1) tuottamalla DOML miedolla happohydrolyysillä DOMM:ista ja edelleen

2) pelkistämällä DOML tuottamaan dihydro-DOML. Olosuhteet miedon happohydrolyysin suorittamiseksi tunnetaan teollisuudessa. Tarkoituksenmukaisia vesiliuoksia, joiden pH on noin 4 tai alempi, voidaan käyttää hydrolyysia suoritettaessa. Tässä menetelmässä voidaan käyttää lämpötiloja noin 20°C:sta noin 100°C:een. Reaktioaika, joka tarvitaan hydrolyysin suorittamiseen, vaihtelee riippuen reaktioseoksen pH:sta ja käytetystä lämpötilasta. Korkeammilla pH-arvoilla reaktionopeus on hitaampi ja korkeammissa lämpötiloissa reaktionopeus on suurempi. Reaktioaika, joka tarvitaan käytettäessä pH-arvoa noin 2 ja huoneenlämpötilaa, on noin 6 tunnista noin 24 tuntiin. Reaktio suoritetaan käsittelemällä joko DOMM:ia tai dihydro-DOMM:ia laimealla happoliuoksella ajan, joka riittää irrottamaan mycarosyyli-ryhmän ja tuottaa DOML tai dihydro-DOML, vastaavassa järjestyksessä.

Vaihtoehtoisesti, ja joskus edullisemmin, DOML ja dihydro-DOML voidaan valmistaa käsittelemällä DOMM:ia tai dihydro-DOMM:ia kasvuliuoksessa, jossa ne on tuotettu, edellä kuvatulla tavalla käyttäen lievästi happamia olosuhteita ja riittävää aikaa muuttamaan DOMM tai dihydro-DOMM DOML:ksi tai dihydro-DOML:ksi, vastaavasti. Täten valmistettu DOML tai dihydro-DOML voidaan eristää kasvuliuoksesta käyttäen teollisuudessa tunnettuja menetelmiä.

Hydroksyyli-ryhmät DOMM:in ja dihydro-DOMM:in asemassa 2',4",3:,2"',4"' ja 3 voidaan esteröidä asyloivilla reagensseilla asyyliesterijohdannaisien tuottamiseksi käyttäen teollisuudessa tunnettuja menetelmiä. DOML ja dihyd-

ro-DOML voidaan esteröidä samalla tavalla asemissa 2',4',2'',3'',4'' ja 3 olevissa hydroksyyli-ryhmissä.

Lisäksi dihydro-DOMM ja dihydro-DOML voidaan esteröidä asemasta 20. DOMM:in ja dihydro-DOMM:in 2'-hydroksyyli-ryhmän esteröinti on yksinkertaista. DOML:in ja dihydro-DOML:in 2'- ja 4'-hydroksyyli-ryhmät esteröityvät helposti. Tyypillisiin asyloiviin reagensseihin kuuluvat anhydridit, halidit (tavallisesti yhdessä emäksen tai muun hapon kanssa reagoivan yhdisteen kanssa) ja orgaanisten happojen aktiiviset esterit. Asylointi voidaan suorittaa myös käyttämällä orgaanisen hapon ja dehydra-toivan aineen kuten N,N'-disykloheksyylikarbidi-imidin seosta. Asyloinnit voidaan suorittaa myös entsyymaattisesti kuten Okamoto et al. ovat kuvanneet US-patentissa 4 092 473. Muodostetut asyyl johdannaiset voidaan erottaa ja puhdistaa tunnetuilla menetelmillä.

DOMM:in ja dihydro-DOMM:in 2'-monoesteri johdannaiset voidaan valmistaa teollisuudessa yleisesti tunnetuilla selektiivisillä esteröintimenetelmillä, sellaisilla kuin esim. antibiootin käsittely tökiömetrisellä määrällä (tai vähäisellä ylimäärällä) asylointireagenssia, sellaista kuin asyylianhydridi, lämpötiloissa noin 0°C:sta noin huoneenlämpötilaan noin 1 - noin 24 tunnin ajan kunnes esteröityminen on käytännöllisesti katsoen täydellistä. 2'-monoesteri voidaan eristää reaktioseoksesta tavanomaisin menetelmin kuten uuttamalla, kromatografisesti ja kiteyttämällä.

Käyttökelpoisia estereitä muodostaviin orgaanisiin happoihin kuuluvat alifaattiset, sykloalifaattiset, aryyli-, aralkyyli-, heterosykliset karboksyyli-, sulfoni- ja alkoksikarbonihapot, joissa on 2-18 hiiliatomia, ja epäorgaaniset hapot kuten rikki- ja fosforihappo.

Edustaviin, käyttökelpoisiin estereihin kuuluvat ne, jotka muodostetaan sellaisista hapoista kuin etikka-, kloorietikka-, propioni-, voi-, isovaleriaana-, alkoksikarboni-, steariini-, syklopropanikarboksyyli-, syklo-

heksaanikarboksyyli-, beta-sykloheksyyli-
 1-Adamantaanikarboksyyli-, bentsoe-, fenyyli-, etik-
 ka-, fenoksietikka-, manteli- ja 2-tioenyylietikka-
 happo, ja alkyyli-, aryyli- ja aralkyyli-sulfonihappo,
 5 aryyli- ja aralkyylihapot, joiden aromaattisessa osas-
 sa on vaihtoehtoisesti sellaisia substituentteja kuin
 halogeeni, nitro ja alempi alkoksi. Käyttökelpoisiin
 estereihin kuuluvat myös dikarboksyylihappojen kuten
 meripihkahapon, omenahapon, fumaarinapon, malonihapon
 10 ja ftaalihapon hemiesterit.

Farmaseuttisesti käyttökelpoiset esterijohdannai-
 set muodostavat suositumman ryhmän, sellaiset esterit
 eivät aiheuta mitään merkittäviä toksisia vaikutuksia
 hoidettavissa lämmänverisissä eläimissä. Muut esterijoh-
 15 dannaist ovat kuitenkin käyttökelpoisia väliyhdisteinä.

DOMM, dihydro-DOMM, DOML, dihydro-DOML ja niiden
 määritellyt johdannaiset muodostavat happoadditiosuoloja.
 DOMM:in, dihydro-DOMM:in, DOML:in, dihydro-DOML:in ja
 niiden asyylijohdannaisten happoadditiosuolat ovat myös
 20 osa tätä keksintöä. Sellaiset suolat ovat käyttökelpoi-
 sia esimerkiksi erotettaessa, puhdistettaessa ja kitey-
 tettäessä DOMM, dihydro-DOMM, DOML, dihydro-DOML ja nii-
 den asyylijohdannaisia. Lisäksi suoloilla on parempi liu-
 kenevuus veteen.

25 Edustaviin, käyttökelpoisiin suoloihin kuuluvat ne,
 jotka muodostetaan tavanomaisilla reaktioilla sekä orgaa-
 nisista että epäorgaanisista hapoista, kuten esim. rikki-,
 suola-, fosfori-, etikka-, meripihka-, sitruuna-, maito-,
 omena-, fumaari-, palmitiini-, koli-, pamoiini-, lima-,
 30 D-glutamiini-, d-kamferi-, glutaari-, glykoli-, ftaali-,
 viini-, muurahais-, lauriini-, steariini-, salisyyl-,
 metaanisulfony-, bentseenisulfony-, sorbiini-, pikriini-,
 bentsoe- ja kanelihaposta.

Farmaseuttisesti käyttökelpoisia happoadditiosuo-
 35 loja ovat erikoisesti tämän keksinnön valikoitu suolaryhmä.

"Farmaseuttisesti käyttökelpoisilla" suoloilla tarkoitetaan suoloja, jotka eivät aiheuta mitään merkittäviä toksisia vaikutuksia hoidettaville lämminversille eläimille.

5 Tämän keksinnön yhdisteet tavallisesti annetaan eläinlääkintäformulaatioina, jotka sisältävät tavanomaisia side- ja kantaja-aineita, ts. farmaseuttisesti käyttökelpoisia orgaanisia ja epäorgaanisia kantaja-aineita, jotka soveltuvat enteraaliseen, parenteraaliseen tai ulkonaiseen käyttöön ja jotka eivät haitallisesti reagoi
10 aktiivisten yhdisteiden kanssa.

Sopivia, farmaseuttisesti käyttökelpoisia kantaja-aineita ovat muiden muassa vesi, suolaliuokset, alkoholit, kasvisöljyt, polyetyleeniglykolit, gelatiini, laktoosi, amyloosi, magnesiumstearaatti, talkki, piihappo, paraffiinit, hajusteöljy, rasvahappomonoglyseridit ja diglyseridit sekä hydroksimetyyliselluloosa. Farmaseuttiset preparaattit voidaan steriloida ja haluttaessa sekoittaa lisäaineisiin, joita ovat esim. voiteluaineet,
15 säilöntäaineet, stabilointiaineet, kosteutusaineet, emulgaattorit, puskuriliuokset, väri- ja flavoriaineet, jotka eivät haitallisesti reagoi aktiivisten yhdisteiden kanssa.

Tämän keksinnön yhdisteitä voidaan myös käyttää
25 rehulisäaineina kuten rehupremixeinä tavanomaisissa formulaatiomenetelmissä.

Tämän keksinnön myöhemmässä tarkastelussa esitetään eläinlääkintäformulaatio, joka sisältää 0,1-90 % painosta kaavan (I) mukaista yhdistettä tai siitä johdettua farmaseuttisesti käyttökelpoista suolaa tai esteriä liittyneenä yhteen tai useampaan tarkoituksenmukaiseen farmaseuttisesti käyttökelpoiseen kantaja- tai lisäaineeseen.
30

Tämä keksintö esittää myös uusia menetelmiä 5-0-mycaminosyylitylonolidin (OMT) ja 20-dihydro-5-0-mycaminosyylitylonolin (dihydro-OMT) valmistamiseksi. Gorman et al.
35

kuvaavat OMT:n ja dihydro-OMT:n US-patentissa 3 459 853. US-patentissa 3 459 853 OMT ja dihydro-OMT valmistetaan poistamalla neutraalisokerit tylosiinin, desmyosiinin, macrosiinin ja laktenosiinin ja niiden dihydro-

5 johdannaisten kontrolloidussa happohydrolyysissa. Tämä keksintö esittää uusia lähtöaineita, joista OMT ja dihydro-OMT voidaan valmistaa. Täten, käyttämällä US-patentissa 3 459 853 kuvattua menetelmää, DOMM ja DOML voidaan käyttää valmistettaessa OMT:ta; ja dihydro-DOMM ja

10 dihydro-DOML voidaan käyttää dihydro-OMT:n valmistamiseksi.

DOMM:ia ja dihydro-DOMM:ia voidaan valmistaa kasvattamalla *Streptomyces fradiae* kantaa, joka tuottaa näitä yhdisteitä ilmastoiduissa aerobisissa olosuhteissa

15 sopivassa kasvuliuksessa, kunnes merkittävä antibioottinen aktiivisuus muodostuu. Tehokkaassa teollisessa tuotannossa pyritään DOMM:in tuottamiseen kasvatusprosessin ensimmäisessä vaiheessa. Dihydro-DOMM muodostuu, kun kasvatusta jatketaan pidemmän ajan, mikä tekee mahdolliseksi muodostuneen DOMM:in entsymaattisen pelkistymisen.

20

Kasvuliuos, jota käytetään kasvatettaessa *Streptomyces fradiae* kantaa ATCC 31 669, voi olla mikä tahansa lukuisista kasvuliuksista. Johtuen tuotantotaloudellisista syistä, optimaalisesta tuotoksesta ja tuotteen eristämisen helppoudesta tiettyjä kasvuliuksia kuitenkin suositaan. Täten esimerkiksi laajamittaiseen kasvatukseen valittuihin hiililähteisiin kuuluvat hiilihydraatit, esim. dekstriini, glukoosi, tärkkelys ja maissijauho, ja öljyt

25 kuten soijaöljy. Valittuihin typpilähteisiin kuuluvat maissijauho, soijajauho, kalajauho, aminohapot ja näiden kaltaiset yhdisteet. Ravitsemuksellisesti merkittäviin epäorgaanisiin suoloihin, joita voidaan käyttää kasvuliuksessa, kuuluvat tavanomaiset liukoiset suolat, jotka

30 ka tuottavat rauta-, kalium-, natrium-, magnesium-, kal-

35

sium-, ammonium-, kloridi-, kloridi-, karbonaatti-, sulfaatti- ja nitraatti-ioneja.

Organismin kasvulle ja kehittymiselle tarpeellisia ns. välttämättömiä hivenaineita tulee myös lisätä kasvuliuokseen. Tällaisia hivenaineita tavallisesti esiintyy epäpuhtauksina muissa kasvuliuoksen aineosissa riittävässä määrin tyydyttämään organismin kasvuvä-
 5 timukset. Saattaa olla välttämätöntä lisätä pieniä määriä (ts. 0,2 ml/L) vaahdonestoainetta kuten polypropyleeniglykolia (mp. noin 2000) laajamittaisessa kasvatuk-
 10 sessa, mikäli vaahtoaminen tulee ongelmaksi.

Huomattavien määrien DOMM:ia tai dihydro-DOMM:ia tuottamiseksi, ilmastoitu aerobinen kasvatus tankeissa on suositeltavaa. Pieniä määriä DOMM:ia tai dihydro-DOMM:
 15 ia voidaan saada ravistelupulloviljelmällä. Johtuen antibioottituotannossa esiintyvistä lag-vaiheesta, joka yleensä liittyy suurten tankkien ympäykseen itiömuotoisella organismilla, on suositeltavaa käyttää kasvuvaiheessa olevaa ymppeä. Kasvuvaiheessa oleva ymppe saadaan siir-
 20 tämällä organismi itiömuodossa tai rihmastofragmenttina pieneen tilavuuteen kasvuliuosta tuottamaan tuoreen, aktiivisesti kasvavan organismiviljelmän. Kasvuvaiheessa oleva ymppe sitten siirretään suurempaan tankkiin. Kas-
 vavan ympin tuottamiseen käytetty kasvuliuos voi olla
 25 sama, jota käytetään suurempiin kasvatuksiin, mutta myös muita kasvuliuoksia voidaan käyttää.

S. fradiae kantaa ATCC 31 669 voidaan kasvattaa lämpötiloissa noin 10°C - noin 37°C. Optimaalinen anti-
 bioottituotanto näyttää esiintyvän lämpötiloissa noin
 30 28°C.

Kuten on tavanomaista ilmastoiduissa aerobisissa kasvatusprosesseissa, steriiliä ilmaa kuplitetaan kas-
 vuliuoksen läpi. Tehokasta antibioottituotantoa varten ilman prosenttisen kyllästysasteen tankkikasvatuksessa
 35 tulisi olla noin 30 % tai sitä suurempi (28°C, 1 atm).

Antibioottituotantoa voidaan seurata kasvatuksen aikana testaamalla kasvatusliuosnäytteitä organismeilla, jotka tiedetään herkiksi näiden antibioottien suhteen. Yksi käyttökelpoinen testausorganismi on *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Biotesti suoritetaan perinteisesti automaattisella turbidometrisella menetelmällä. Lisäksi voidaan antibioottituotantoa helposti seurata uutetun kasvuliuksen ultraviolettiaabsorption avulla. Korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa UV-detektoria käyttäen voidaan myös soveltaa tuotannon seuraamiseen (ks. esim. J.H.Kennedy, *J.Chromatographic Science*, 16, 492-495 (1978)).

Ilmastoiduissa aerobisissa kasvatusolosuhteissa tuotettu DOMM ja dihydro-DOMM voidaan erottaa kasvuliuksesta menetelmillä, joita käytetään fermentaatioteollisuudessa. DOMM:in ja dihydro-DOMM:in talteenotto tapahtuu aluksi kasvuliuksen suodatuksella. Suodatettu liuos voidaan sitten edelleen puhdistaa tuottamaan halutun antibiootin. Lukuisia menetelmiä voidaan käyttää tähän puhdistukseen. Valittu menetelmä suodatetun liuksen puhdistamiseksi sisältää liuksen pH:n säätämisen noin arvoon 9; liuksen uuttamisen sopivalla liuottimella, sellaisella kuin etyyliasettaatti, amyliasettaatti tai metyyli-isobutyryliketoni; orgaanisen faasin uuttamisen happamalla vesiliuksella; ja antibiootin saostuksen säätämällä vesiuute emäksiseksi. Jatkopuhdistus sisältää uutos-, adsorptio- ja/tai kiteytysmenetelmiä.

Kuten tapahtuu myös muilla organismeilla, *Streptomyces fradiae* kannan ATCC 31669 ominaisuudet ovat alttiita vaihteluille. Esimerkiksi keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja ATCC 31669 kannasta voidaan saada käsittelemällä sitä lukuisilla tunnetuilla fysikaalisilla ja kemiallisilla mutageeneilla, sellaisilla kuin ultraviolettisäteily, X-säteily, gammasäteily, ja N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiini. Kaikkia *Streptomyces fradiae* kannan ATCC 31669 luonnollisia ja keinotekoisia muunnok-

sia, mutantteja ja yhdistelmiä, joissa ominaisuudet tuottaa DOMM:ia säilyvät, voidaan käyttää tässä keksinnössä.

DOMM yhdisteet inhiboivat patogeenisten bakteerien kasvua, erityisesti gram-positiivisia bakteereja ja Mycoplasma-lajeja.

Esitetyn mukaisesti eräänä tämän keksinnön osana esitetään menetelmä erityisesti gram-positiivisten bakteerien ja Mycoplasma:n aiheuttamien mikrobi-infektioiden estämiseksi, kontrolloimiseksi ja hoitamiseksi tämän keksinnön uusilla yhdisteillä.

Taulukossa 3 esitetään yhteenvetona minimi inhibitooriset pitoisuudet (minimal inhibitory concentrations, MIC) mitattuina standardi agar-laimennusmenetelmillä, joissa DOMM (vapaana emäksenä) inhiboi tiettyjä bakteereja.

Taulukko 3

DOMM:in in vitro aktiivisuus vapaana emäksenä

	Organismi	MIC (μ g/ml)
20	Streptococcus pyogenes C203	0,25
	Streptococcus pneumoniae Park I	0,25
	Streptococcus sp. (ryhmä D) 282	4,0
	Pasteurella multocidia	12,5
	Pasteurella hemolytica	50,0
25	Mycoplasma gallisepticum	0,78
	Mycoplasma hyopneumoniae	0,78
	Mycoplasma hyorhinis	3,12

DOMM-yhdisteillä on osoitettu olevan in vivo anti-mikrobisidista aktiivisuutta kokeellisissa bakteeri-infektioissa. Kun kaksi annosta testiyhdistettä annettiin hiirille kokeellisissa infektioissa, havaittu aktiivisuus mitattiin ED₅₀-arvona (tehokas annos ilmaistuna mg/kg, joka tarvitaan suojaamaan 50 % koe-eläimistä: ks. Warren Wick et al., J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)). DOMM:ille havaitut ED₅₀ arvot esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4

DOMM:in ED₅₀-arvot (mg/kg x 2) ihonalaisesti annettuna

	Yhdiste	Streptococcus pyogenes C203	Streptococcus pneumoniae Park I	Staphylococcus aureus 3055
5				
	DOMM	1,1	37,5	3,8
10	Bakteerivai- kutus (Bacte- rial Challen- ge) (x LD ₅₀)	133	41,2	139

Seuraavat ei-rajoittavat esimerkit esitetään tämän keksinnön täydellisemmäksi kuvaamiseksi.

Esimerkki 1A. DOMM:in ravistelupullokasvatut

Lyofilisoitu pelletti *Streptomyces fradiae* kantaa ATCC 31669 dispersoitiin 1-2 ml:aan striloitua vettä. Osa tästä liuoksesta (0,5 ml) käytettiin ympppäämään kasvuliuos (150 ml), jonka koostumus oli seuraava:

	Valmistusaine	Määrä (%)
	Maissiviina (corn steep liquor)	1,0
	Hiivauute	0,5
25	Kuorittu soijapapuruhe	0,5
	CaCO ₃	0,3
	Soijaöljy (puhdistamaton)	0,45
	Deionisoitu vesi	97,25

Vaihtoehtoisesti 1 ml tilavuuksina nestemäisessä tyypessä säilytetty vegetatiivisessa kasvuvaiheessa oleva *S. fradiae* ATCC 31669 viljelmä sulatettiin nopeasti ja käytettiin kasvuliuoksen ympppäämiseen. Ympättyä kasvuliuosta inkuboitiin 500 ml erlenmeyer pullossa 29°C:ssa noin 48 tuntia laatikkoravistelijassa, jonka nopeus oli 300 rpm.

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

	<u>Valmistusaine</u>	<u>Määrä (%)</u>
5	Juurikasmelassi	2,0
	Maissijauho	1,5
	Kalajauho	0,9
	Maissigluteeni	0,9
	NaCl	0,1
10	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,04
	CaCO_3	0,2
	Soijaöljy (puhdistamaton)	3,0
	Deionisoitu vesi	91,36

Ympättyä kasvuliuosta inkuboitiin 50 ml pullossa 29°C:ssa noin 6 päivää laatikkoravistelijassa, jonka nopeus oli 300 rpm.

B. DOMM:in tankkikasvatus

Suuremman ympin saamiseksi 60 ml inkuboitua kasvuliuosta, joka oli valmistettu kohdassa A kuvatun tavan mukaisesti, käytettiin ymppäämään 40 l toisen vaiheen vegetatiivista kasvuliuosta, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Valmistusaine</u>	<u>Määrä (%)</u>
	Maissiviina (corn steep liquor)	1,0
25	Soijapapuöljy-rouhe	0,5
	Hiivauute	0,5
	CaCO_3	0,3
	Soijaöljy (puhdistamaton)	0,5
	Lesitiini (puhdistamaton)	0,015
30	Vesi	97,185

Kasvuliuoksen pH säädettiin arvoon 8,5 50 % NaOH-liuoksella.

Tätä toisen vaiheen vegetatiivista kasvuliuosta inkuboitiin 68 l tankissa noin 40 tuntia 29°C:ssa riittävällä ilmastuksella ja ravistuksella.

Inkuboitua toisen vaiheen kasvuliuosta (4 l) käytettiin ymppeämään 44 litraa steriiliä tuotantokasvuliuosta, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Valmistusaine</u>	<u>Määrä (%)</u>
5	Kalajauho	0,875
	Maissijauho	1,5
	Maissigluteeni	0,875
	CaCO ₃	0,2
	NaCl	0,1
10	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
	Juurikasmelassi	2,0
	Soijaöljy (puhdistamaton)	3,0
	Lesitiini	0,09
	Vesi	91,32

15 Kasvuliuoksen pH säädettiin 7,2:ksi 50 % NaOH-liuoksella.

Ympätyn kasvuliuoksen annettiin kasvaa 68 l tankissa noin 4 päivän ajan lämpötilassa 28°C. Kasvuliuosta ilmastettiin steriilillä ilmalla liuenneen happitason pitämiseksi välillä noin 30-50 % ja sekoitettiin tavanomaisilla sekoittimilla kierrosnopeudella noin 250 rpm.

Esimerkki 2

DOMM:in eristäminen

25 Koko talteenotettu liuos (38 l), joka saatiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, suodatettiin suodatinapua-ainetta käyttäen. Huokoinen kakku pestiin vedellä; tämä pesuun käytetty vesi yhdistettiin sitten suodokseen.

30 Suodoksen pH säädettiin arvoon 9,1 käyttäen 25 % natriumhydroksidin vesiliuosta. Suodosta uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla (9 ja 5 l). Deionisoitua vettä (3500 ml) lisättiin etyyliasetaattiuutteeseen. Tämän liuoksen pH säädettiin arvoon noin 4,1 käyttäen 28 % fosforihappoliuosta (2 osaa vettä yhtä osaa väkevää fosforihappoa kohti). Uuttamisen jälkeen erotettiin vesifaasi.

Etyyliasetattiliuosta uutettiin toistamiseen vedellä (3500 ml) käyttäen tätä menetelmää. Saadut kaksi vesi-uutetta yhdistettiin.

Yhdistetyn vesiuutteen pH säädettiin 8,5:ksi natriumhydroksidilla ja sitä uutettiin kahdesti kloroformilla (3000 ja 1200 ml erät). Kloroformiuutteet kuivatettiin vakuuissa, mikä tuotti noin 40 g puhdistamatonta DOMM-emästä. Tämä DOMM-emäs puhdistettiin kiteyttämällä vesi-asetoniliuoksesta, mikä tuotti noin 30 g DOMM-emästä.

DOMM on valkoinen kiinteä aine, joka kiteytyy asetoni-vesiliuoksesta. DOMM pehmenee noin 135-140°C:ssa ja sulaa täydellisesti nostettaessa lämpötilaa noin 160°C:een. DOMM:in alkuaineanalyysi osoitti, että sen likimääräinen prosenttinen koostumus on seuraava: C 59,5 %; H 8 %; N 2 %; O 30,5 %. DOMM:in empiirinen kaava on $C_{44}H_{73}NO_{17}$ ja molekyylipaino on noin 888 (887 määritettynä massaspektrometrisesti).

DOMM:in infrapuna-absorptiospektrissä havaittavissa olevat absorptiomaksimit esiintyvät seuraavilla frekvensseillä (cm^{-1}):

3679 (heikko), 3604 (olkapää), 3486 (leveä), 3012 (olkapää), 2979 (voimakas), 2938 (voimakas), 2880 (olkapää), 2821 (olkapää), 2794 (hyvin heikko), 2735 (hyvin heikko), 1723 (voimakas), 1678 (keskivoimakas), 1627 (heikko), 1593 (voimakas), 1477 (olkapää), 1459 (keskivoimakas), 1409 (keskivoimakas), 1373 (keskivoimakas), 1333 (olkapää), 1316 (keskivoimakas), 1273 (heikko), 1183 (olkapää), 1161 (voimakas), 1114 (keskivoimakas), 1080 (voimakas), 1048 (voimakas), 1013 (keskivoimakas), 996 (keskivoimakas), 984 (olkapää), 960 (olkapää), 924 (hyvin heikko), 902 (heikko), 865 (hyvin heikko) ja 841 (heikko).

DOMM:in ultraviolettiaabsorptiospektri neutraalissa etanoliliuoksessa mitattuna osoittaa absorptiomaksimin aallonpituudella 283 nm (epsilon 22550).

DOMM:in (vapaa emäs) spesifinen rotaatio on seuraava:

$$[\alpha]_D^{25} -39,69^{\circ} \text{ (c 1, CH}_3\text{OH)}.$$

5

DOMM:in elektrometrinen titraus 66 % dimetyyli-formamidin vesiliuoksessa osoittaa, että molekyylissä on titrattava ryhmä, jonka pK_a arvo on noin 7,14.

Esimerkki 3

10

DOML:in valmistaminen

Esimerkissä 2 kuvatulla tavalla valmistettu DOMM liuotettiin laimeaan suolahappoliuokseen (veteen lisättiin suolahappoa kunnes liuoksen pH oli 1,8).

Tuloksena saadun liuoksen annettiin seistä noin 8 tuntia huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sen pH säädettiin 9,0:ksi natriumhydroksidin avulla. Tätä emäksistä liuosta uutettiin etyyliasetaatilla, dikloorimetanilla ja kloroformilla. Uute kuivattiin vakuuissa ja se tuotti DOML emäksen (pehmenee 115-120°C:ssa ja sulaa noin 134-140°C:ssa).

20

Esimerkki 4

Dihydro-DOMM:in valmistaminen

DOMM (50 mg), joka oli valmistettu esimerkin 2 kuvaamalla tavalla, liuotettiin isopropyylialkoholin vesiliuokseen (noin 40 %; 25 ml). Natriumboorihydridia (20 mg) liuotettiin 30 % isopropyylialkoholi-vesiliuokseen (10 ml). NaBH_4 -liuosta (1 ml) lisättiin DOMM:ia sisältävään liuokseen. Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin 5 min ajan, pH säädettiin 7,5:ksi fosforihapolla, ja konsentroitiin vakuuissa isopropyylialkoholin poistamiseksi. Tuloksena olevaan vesikonsentraattiin lisättiin vettä niin, että sen tilavuudeksi tuli 25 ml, sen jälkeen lisättiin kloroformia (50 ml). Vesifaasin pH säädettiin 7,5:ksi. Uuttamisen jälkeen kloroformi erotettiin ja haihdutettiin kuivaksi vakuuissa tuotta-

35

maan dihydro-DOMM:in.

Esimerkki 5Dihydro-DOML:in valmistaminen

Dihydro-DOMM:ia, joka oli valmistettu esimerkin
4 mukaisella tavalla, käsiteltiin esimerkissä 3 kuva-
5 tulla tavalla, mikä tuotti dihydro-DOML:in.

Esimerkki 6Vaihtoehtoinen DOML:in valmistustapa

DOML valmistetaan DOMM:ista käsittelemällä DOMM:ia
kasvuliuoksessa, jossa se tuotettiin, laimealla hapolla
10 kuten on kuvattu esimerkissä 3. DOML:in eristäminen teh-
tiin samanlaisella menetelmällä kuin esimerkissä 2 ku-
vattu DOMM:in eristäminen.

Esimerkki 7Vaihtoehtoinen dihydro-DOML:in valmistustapa

15 Esimerkissä 3 kuvatulla tavalla saatu DOML pel-
kistettiin käyttäen esimerkissä 4 kuvattua menetelmää
tuottamaan dihydro-DOML:ia.

Esimerkki 82'-O-propionyyli-DOMM

20 DOMM liuotetaan asetoniin ja käsitellään 1,2 ekvi-
valentilla propionyylianhydridia huoneenlämpötilassa noin
6 tunnin ajan tuottamaan 2'-O-propionyyli-DOMM:ia.

Esimerkit 9-11

25 2'-O-isovaleryyli-DOMM valmistettiin esimerkissä
8 kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen isovale-
ryyllianhydridia.

2'-O-bentsoyyli-DOMM valmistettiin esimerkissä 8
kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen bentsoyyli-
anhydridia.

30 2'-O-(n-butyryyli)-DOMM valmistettiin esimerkissä
8 kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen n-buty-
ryyllianhydridia.

Esimerkki 122',4'-di-O-propionyyli-DOML

35 DOML liuotettiin asetoniin ja käsiteltiin vähän

yli kaksinkertaisella ekvivalenttimäärällä propionyyli-anhydridia huoneenlämpötilassa noin 6 tunnin ajan tuottamaan 2',4'-di-O-propionyyli-DOML:in.

Esimerkit 13-15

- 5 2',4'-di-O-isovaleryyli-DOML valmistettiin esimerkissä 12 kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen isovaleryyli-anhydridia.

- 2',4'-di-O-bentsoyyli-DOML valmistettiin esimerkissä 12 kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen
10 bentsoyyli-anhydridia.

 2',4'-di-O-(n-butyryyli)-DOML valmistettiin esimerkissä 12 kuvatun menetelmän mukaisesti mutta käyttäen n-butyryyli-anhydridia.

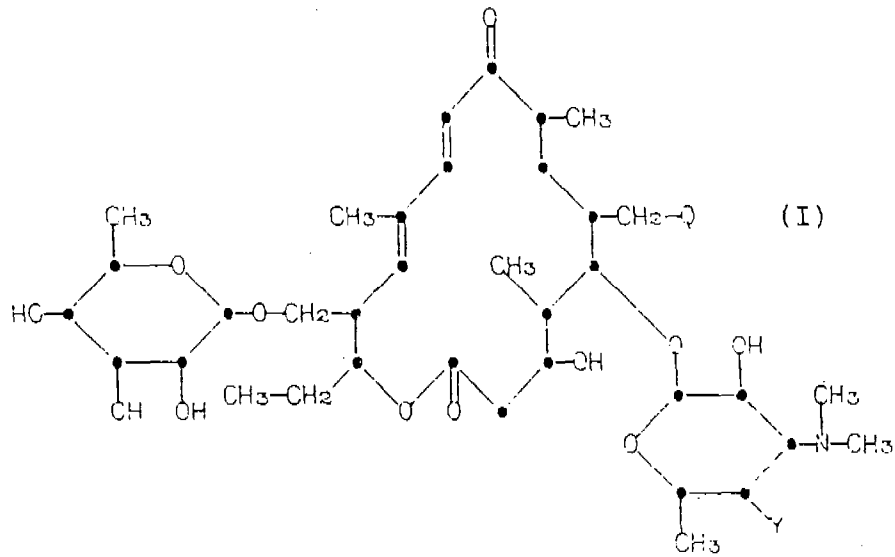
Patenttivaatimukset:

1. Uusi makrolidi, t u n n e t t u siitä, että sillä on kaava (I):

5

10

15



20

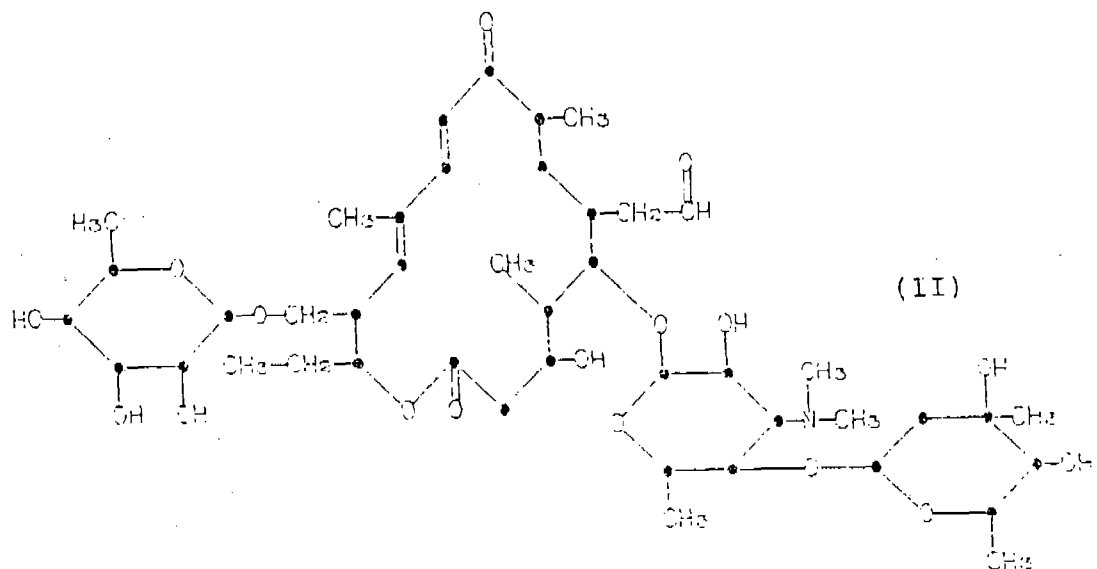
jossa Q on -CHO tai -CH₂OH ja Y on hydroksyyli- tai mykarosyylioksi-ryhmä: tai siitä johdettu suola tai esteri.

25

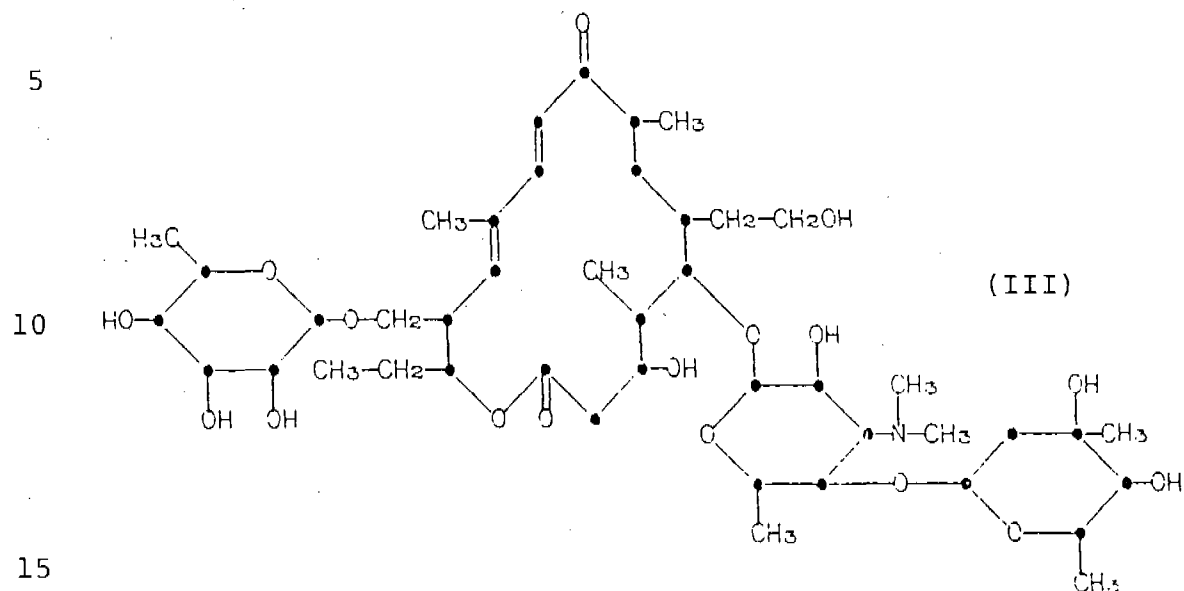
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen uusi makrolidi, t u n n e t t u siitä, että sillä on kaava (II):

30

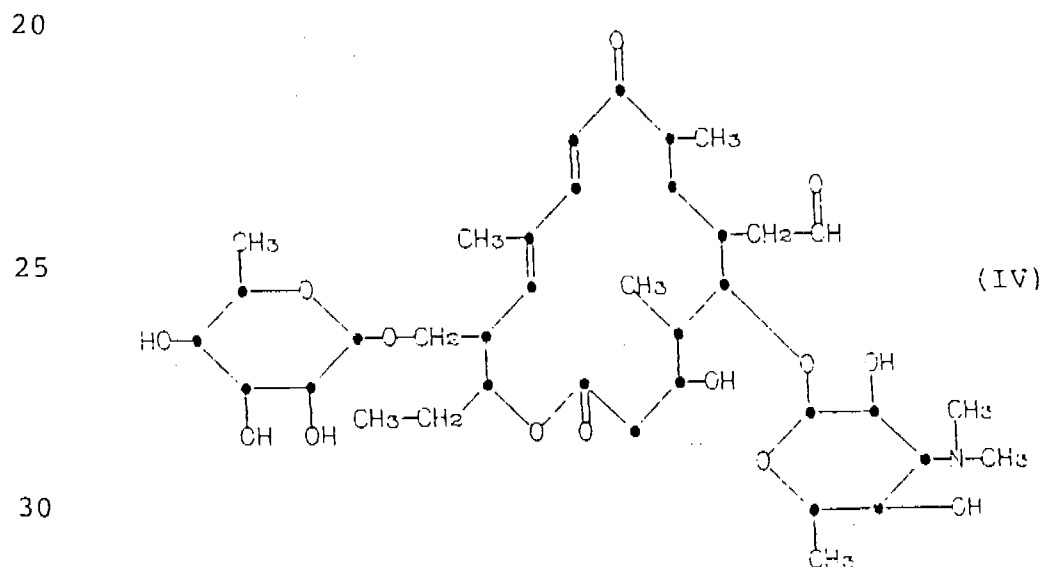
35



3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen uusi makrolidi,
tunnettu siitä, että sillä on kaava (III):

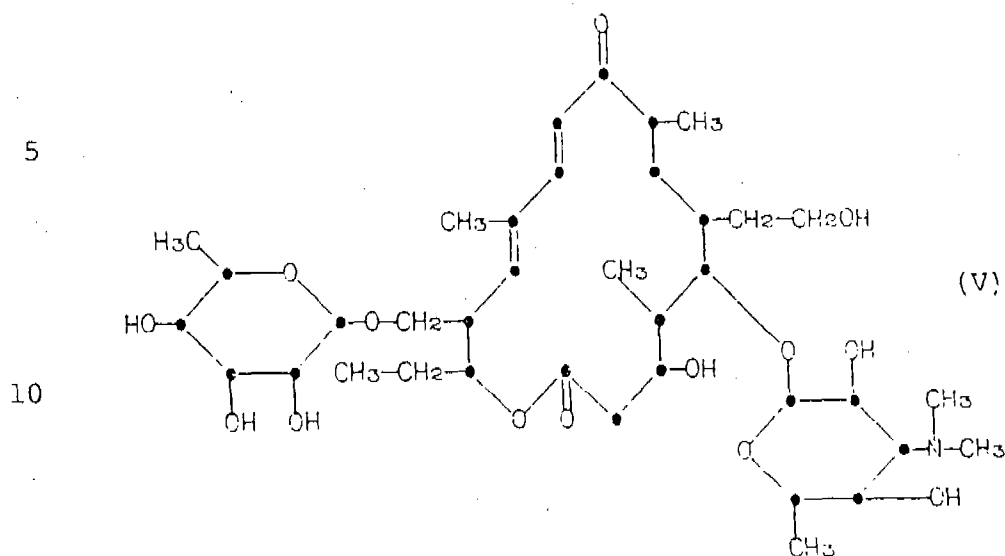


4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen uusi makrolidi,
tunnettu siitä, että sillä on kaava (IV):



5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen makrolidi, tun-
nettu siitä, että sillä on kaava (V):

35



6. Menetelmä patenttivaatimusten 1-5 mukaisten makrolidien valmistamiseksi, joilla on kaava (I), t u n n e t t u siitä, että *Streptomyces fradiae* kantaa viljellään submersisti aerobisissa olosuhteissa kunnes huomattava määrä antibioottista aktiivisuutta on muodostunut, haluttaessa tuottaa patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen yhdiste viljelys tulisi suorittaa käyttämällä lievästi happamia olosuhteita.

7. Menetelmä patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava (I), t u n n e t t u siitä, että vastaavasti patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen yhdiste lievästi happonydrolysoidaan.

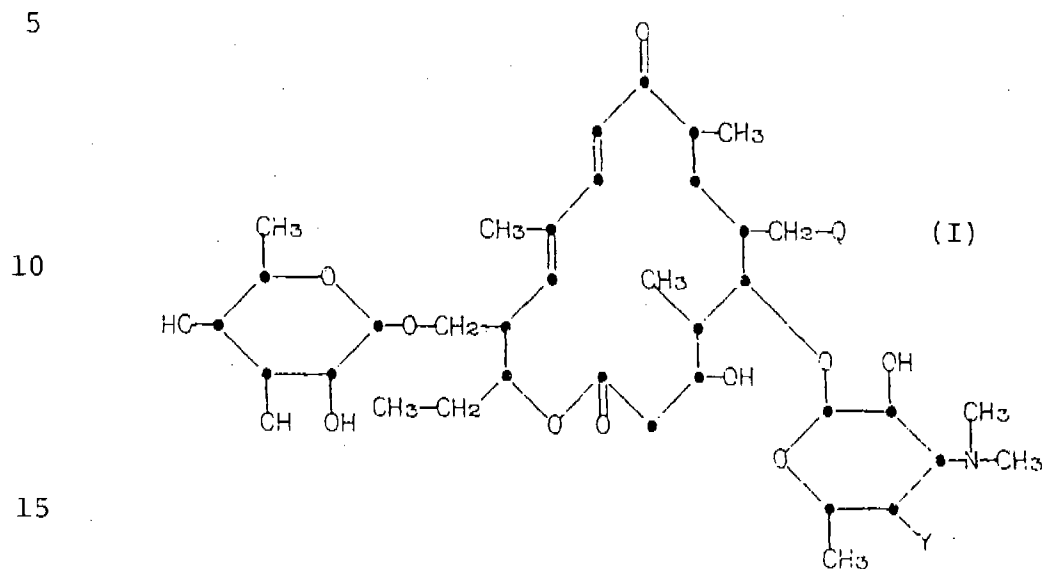
8. Menetelmä 5-O-mykaminosyylitylonolidin tai 20-dihydro-5-O-mykaminosyylitylonolidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen yhdiste, jolla on kaava (IV) tai (V) happohydrolysoidaan kontrolloidusti.

9. *Streptomyces fradiae* ATCC 31669.

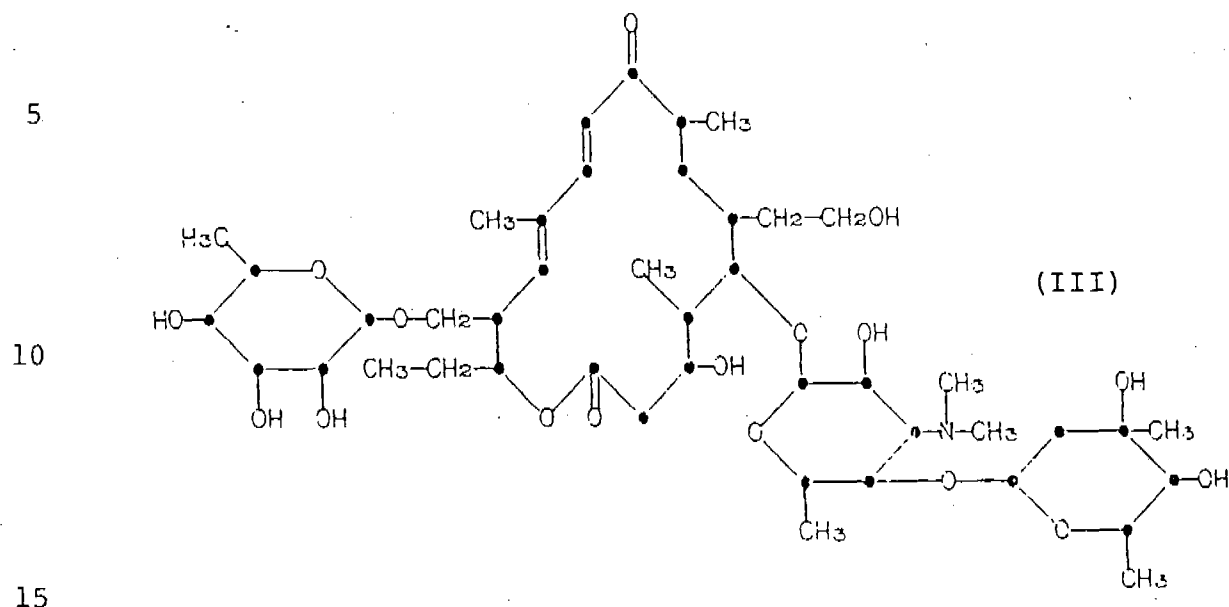
10. Viljelyliuos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää *Streptomyces fradiae* ATCC 31669 ja assimiloituvat hiili-, typpi- ja epäorgaaniset suolalähteet.

Patentkrav:

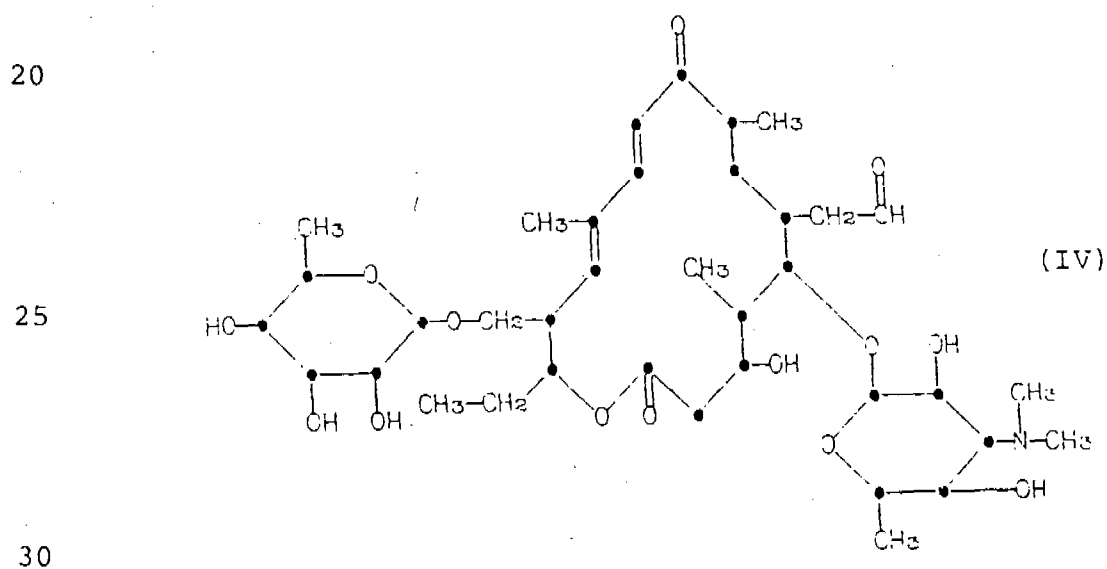
1. Ny makrolid med formeln (I):



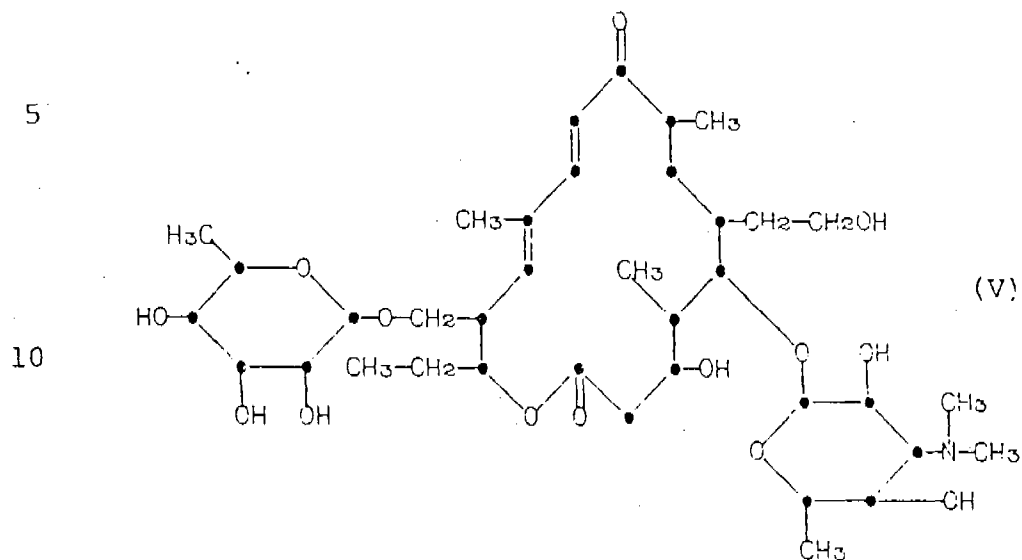
3. Ny makrolid enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den har strukturformeln (III):



4. Ny makrolid enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den har strukturformeln (IV):



5. Makrolid enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
n a d därav, att den har strukturformeln (V):



6. Förfarande för framställning av en makrolid med formeln (I) enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar en stam av *Streptomyces fradiae* under indränkta aerobiska förhållanden tills en väsentlig antibiotisk aktivitet alstras, med villkor att ifall man önskar en förening enligt patentkravet 4 eller 5, bör odlingen ske under användande av svagt sura förhållanden.

7. Förfarande för framställning av en förening med formeln (I) enligt patentkravet 4 eller 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar svagt sur hydrolys av en förening enligt patentkravet 2 respektive 3.

8. Förfarande för framställning av 5-O-mykaminosyltylonolid eller 20-dihydro-5-O-mykaminosyltylonolid, k ä n n e t e c k n a t av styrd sur hydrolys av en förening med formeln (IV) eller (V) enligt patentkraven 4 eller 5.

9. *Streptomyces fradiae* NRRL 12187.

10. Kulturmedium, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar *Streptomyces fradiae* NRRL 12187 och assimilerbara källor av kol, kväve och oorganiska salt.

