

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

236663
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 10 11 81
(21) (PV 8255-81)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 11 80
(205 539) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 17 09 84

(45) Vydáno 15 02 87

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/62

(72)
Autor vynálezu

BALTZ RICHARD HENRY, INDIANAPOLIS, INDIANA,
KIRST HERBERT ANDREW, INDIANAPOLIS, INDIANA,
WILD GENE MURIEL, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)
SENO EUGENE THOMAS, NORWICH (Velká Británie)

(73)
Majitel patentu

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

(54) Způsob výroby makrolidových antibiotik 20-dihydro-20-deoxy-23-demycinosyltylosinu a 20-dihydro-20-deoxy-5-O-mycaminosyltylonolidu

1

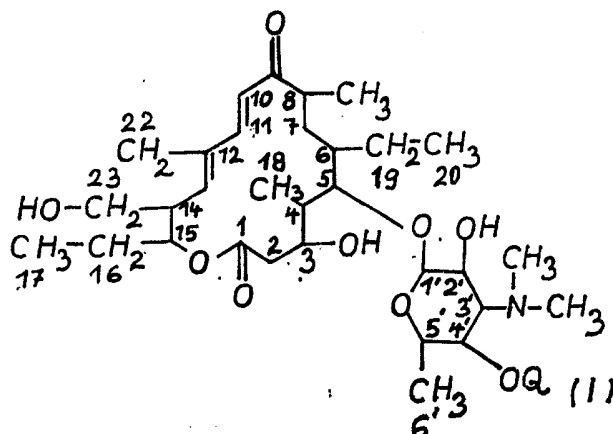
Vynález se týká makrolidových antibiotik, zejména sloučenin, podobných známé sloučenině tylosinu, popsané například v Tetrahedron Letters, 2339 (1970).

Přestože tylosin je velmi cennou sloučeninou, je stále zapotřebí nacházet nová antibiotika již proto, že mohou vznikat odolné kmeny. Mimoto při modifikaci struktury je možno získat jiné spektrum citlivých mikroorganismů. Na neštěstí chemické modifikace ve struktuře makrolidových antibiotik typu tylosinu jsou výjimečně obtížné. V J.

2

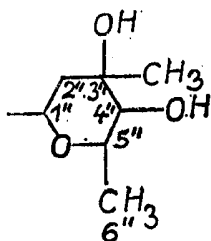
Org. Chem. 44 [12], 2050-2 (1979) se například uvádí téměř nepřekonatelné problémy, které vznikají při pokusu o štěpení mycinosylglykosidové vazby tylosinu chemickým způsobem. Ve většině případů tedy nezbyvá než nacházet nové mikroorganismy, a to buď přírodně se vyskytující nebo syntetické za účelem získání podobných struktur.

Nyní bylo zjištěno, že makrolidová antibiotika obecného vzorce I



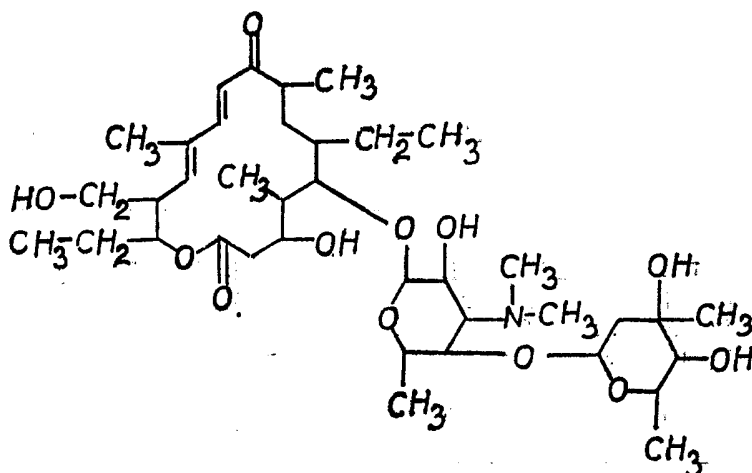
kde

Q znamená atom vodíku nebo skupinu



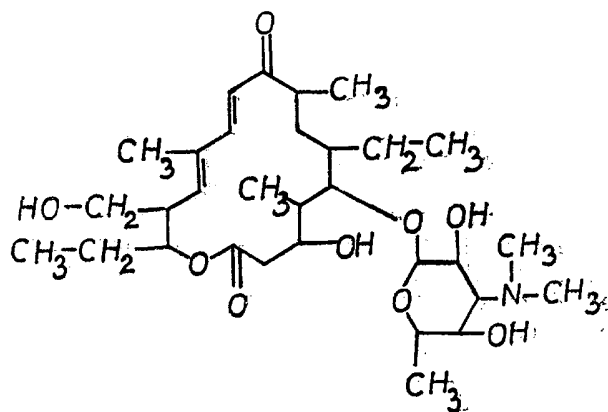
jakož i z farmaceutického hlediska přijatelné estery těchto látek nebo jejich adiční soli s kyselinami způsobují inhibici růstu pathogenních mikroorganismů.

V případě, že Q znamená zbytek cukru mykarózy, je sloučenina obecného vzorce I 20-dihydro-20-desoxy-23-demycinosyltylosin (DH—DO—DMT):



V případě, že Q znamená atom vodíku, je sloučenina obecného vzorce I 20-dehydro-

-20-desoxy-5-O-mykaminosyltylonolid (DH—DO—DMT):



Přestože nejsou uvedeny stereochemické údaje pro svrchu uvedeně struktury, je zřejmé, že stereochemie je totožná se stereochemií tylosinu. Neutrálním cukrem je mykaróza a aminocukrem je mykaminóza.

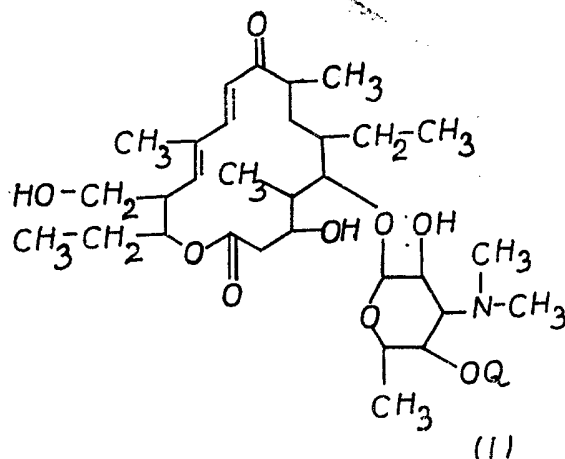
Jak již bylo uvedeno, působí DH—DO—DMT a DH—DO—OMT inhibici růstu mikroorganismů, pathogenních pro živočichy. Je možno uvést, že DH—DC—DMT a DH—DO—OMT jsou antibakteriální látky, které jsou účinné proti grampozitivním mikroorganismům a proti čeledi Mycoplasma.

DH—DO—DMT je možno esterifikovat na hydroxylových skupinách v poloze 2', 4', 3'', 23 a 3- a DH—DO—OMT je možno esterifikovat na hydroxylových skupinách v po-

loze 2', 4', 23 a 3 za vzniku cenných acylesterových derivátů. Nejjednodušší je esterifikace hydroxylových skupin v poloze 2' a 4'. Typické estery jsou estery monokarboxylových kyselin nebo poloestery dikarboxylových kyselin o 2 až 18 atomech uhlíku.

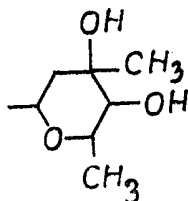
DH—DO—DMT, DH—DO—OMT a jejich acylestery jsou zásadité látky, které se mění při reakci s kyselinami na adiční soli. Tyto adiční soli jsou stejně účinné a tvoří také součást vynálezu.

Předmětem vynálezu je způsob výroby makrolidových antibiotik 20-dihydro-20-desoxy-23-demycinosyltylosinu a 20-dihydro-20-desoxy-5-O-mykaminosyltylonolidu obecného vzorce I



kde

Q znamená atom vodíku nebo



nebo z farmaceutického hlediska přijatelného esteru nebo adiční soli této látky s kyselinou, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* ATCC 31733 v živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí v submerzní kultuře za aerobních podmínek při teplotě 10 až 40 °C do nahromadění antibiotika obecného vzorce I a popřípadě se odštěpí mykarosylová skupina z makrolidového antibiotika obecného vzorce I, v němž Q má odlišný význam od atomu vodíku hydrolyzou v kyselém prostředí při pH 4 nebo nižším a při teplotě 20 až 100 °C za získání makrolidového antibiotika obecného vzorce I, kde Q znamená atom vodíku.

DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je možno extrahovat z alkalického filtrátu živného prostředí pomocí polárních organických rozpouštědel a tyto látky je pak možno dále čistit extrakcí, chromatografií a/nebo krystalizací.

Způsobem podle vynálezu je rovněž možno získat DH—DO—OMT hydrolyzou DH—DO—OHT v mírně kyselém prostředí.

Absorpční spektrum DH—DO—DMT ve volné formě a DH—DO—OMT ve volné formě v infračerveném světle v chloroformu je uvedeno na přiloženém výkrese.

Obr. 1 — DH—DO—DMT.

Obr. 2 — DH—DO—OMT.

Dále budou popsány vlastnosti DH—DO—DMT a DH—DO—OMT.

DH—DO—DMT

Struktura této sloučeniny je zřejmá ze vzorce I.

DH—DO—DMT je bílá krystalická pevná látka o teplotě tání 198 až 200 °C. DH—DO—

—DMT má následující přibližně procentuální složení: uhlík 63 %, vodík 9 %, dusík 2 procenta, kyslík 26 %. DH—DO—DMT má empirický vzorec $C_{38}H_{65}NO_{12}$ a molekulovou hmotnost přibližně 728 (727 podle stanovení hmotovým spektrometrem).

Spektrum této látky v infračerveném světle v chloroformu je znázorněno na obr. 1. Pozorovatelná absorpční maxima se nacházejí při následujících frekvencích: (cm^{-1}):

3676 (malé), 3598 (malé), 3470 (velké široké), 3010 (intenzivní), 2974 (intenzivní), 2938 (intenzivní), 2925 (hrb), 2880 (intenzivní), 2799 (malé), 2457 (malé široké), 1715 (intenzivní), 1676 (střední), 1629 (malé), 1595 (velmi intenzivní), 1456 (intenzivní), 1411 (intenzivní), 1380 (intenzivní), 1363 (hrb), 1315 (intenzivní), 1273 (malé), 1263 (hrb), 1220 (malé široké), 1184 (intenzivní), 1162 (intenzivní), 1144 (malé), 1117 (střední), 1096 (hrb), 1076 (intenzivní/hrb), 1050 (velmi intenzivní), 1015 (intenzivní), 997 (střední), 986 (střední), 958 (střední), 923 (střední), 905 (střední), 867 (malé), 842 (střední), 720 (široké) a 660 (malé).

Absorpční spektrum DH—DO—DMT v ultrafialovém světle v 95% neutrálním ethanolu má absorpční maximum při 283 nm (ϵ 21,800).

DH—DO—DMT ve volné formě má následující specifickou otáčivost:

$$[\alpha]_D^{25} -46,3^\circ \quad (c = 3,3, \text{CH}_3\text{OH}).$$

DH—DO—OMT

DH—DO—OMT je bílá krystalická pevná látka o teplotě tání 214 až 217 °C. DH—DO—OMT má následující přibližně procentuální složení: uhlík 64 %, vodík 9 %, dusík 2,5 %, kyslík 24,5 %. DH—DO—OMT má empirický vzorec $C_{31}H_{53}NO_9$ a molekulovou hmotnost přibližně 584 (583 při provedení hmotové spektrometrie).

Absorpční spektrum DH—DO—OMT ve volné formě v infračerveném světle v chloroformu je znázorněno na obr. 2. Pozorova-

telná absorpční maxima se vyskytují při následujících frekvencích: (cm^{-1}):

3677 (velmi malé), 3601 (malé), 3422 (široké), 3006 (intenzivní), 2971 (intenzivní), 2937 (intenzivní), 2879 (intenzivní), 2798 (malé), 1714 (intenzivní), 1677 (intenzivní), 1627 (malé), 1593 (velmi intenzivní), 1457 (intenzivní), 1407 (malé), 1382 (střední), 1362 (hrb), 1315 (střední), 1269 (malé), 1181 (velmi intenzivní), 1141 (malé), 1115 (malé), 1079 a 1058 (intenzivní, dublet), 1008 (střední), 983 (střední), 923 (malé), 903 (malé), 865 (malé), 835 (malé), 712 (široký), 658 (malé) a 629 (malé).

Absorpční spektrum DH—DO—OMT v ultrafialovém světle v 95% neutrálním ethanolu má absorpční maximum při 282 nm (ϵ 22,400).

DH—DO—OMT ve volné formě má následující specifickou otáčivost:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -7,35^\circ \quad (c = 6, \text{CH}_3\text{OH}).$$

Údaje ^1H nukleární magnetické resonance (NMR) při 360 MHz pro DH—DO—OMT ve volné formě v CDCl_3 jsou uvedeny v následující tabulce 1.

Tabulka 1

NMR při 360 MHz pro DH—DO—OMT

Poloha	*
2	2,0 až 2,5
3	3,7 až 3,85
4	1,64
5	3,7 až 3,85
6	NA**
7	NA
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
18	1,05
19	1,49
20	0,89
21	1,18
22	1,82
23	3,7 až 3,85
1'	4,31
2'	3,55
3'	2,40
4'	3,08
5'	3,22
6'	1,31
NMe ₂	2,51

* ppm směrem dolů od tetramethylsilanu [vnitřní standard]

** NA nebylo provedeno

DH—DO—DMT a DH—DO—OMT ve volné formě jsou rozpustné ve vodě a ve většině polárních organických rozpouštědel jako acetonu, methanolu, ethanolu, chloroformu, dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu. Adiční soli DH—DO—DMT a DH—DO—OMT s kyselinami jsou rozpustnější ve vodě než volné látky.

DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je možno od sebe odlišit chromatografií na tenké vrstvě. Přibližné hodnoty R_f pro DH—DO—DMT a DH—DO—OMT v jednom ze systémů jsou shrnuty v následující tabulce 2. K detekci bylo užito absorpčního spektra v ultrafialovém světle.

Tabulka 2

Údaje získané při chromatografii na tenké vrstvě ^{a, b}

Sloučenina	Hodnota R_f
DH—DO—OMT	0,53
DH—DO—DMT	0,64

Poznámky k tabulce 2:

^a prostředí: silikagel 60 (E. Merck, Darmstadt)

^b rozpouštědlo: směs ethylacetátu a diethylaminu v poměru 95 : 5.

Příprava DH—DO—OMT

Způsobem podle vynálezu je rovněž možno získat DH—DO—OMT hydrolýzou DH—DO—DMT v mírně kyselém prostředí. Podmínky hydrolýzy v tomto prostředí jsou z literatury známy. K uskutečnění hydrolýzy je možno užít roztoků o pH 4 nebo nižším.

Další reakční podmínkou je teplota v rozmezí 20 až 100 °C. Doba reakce, nutná k dovršení hydrolýzy se mění v závislosti na pH reakční směsi a na použité teplotě. Při vyšším pH je reakční rychlost nižší a při vyšší teplotě se reakční rychlost zvyšuje. Reakce se provádí tak, že se působí na DH—DO—DMT mírně kyselým roztokem na dobu dostatečnou k odstranění mykarosylové skupiny za vzniku DH—DO—OMT.

Je také možno postupovat tak, a někdy je to zvláště výhodné, že se DH—DO—OMT připravuje tak, že se působí na DH—DO—DMT přímo ve fermentačním prostředí, v němž je tato látka získána, přičemž se užívá hydrolýzy za mírně kyselých podmínek po dobu dostatečnou k převedení DH—DO—DMT na DH—DO—OMT, jak bylo popsáno svrchu. Takto získaný DH—DO—OMT je možno izolovat z fermentačního prostředí běžným způsobem.

Esterové deriváty

DH—DO—DMT je možno esterifikovat na

hydroxylových skupinách v polohách 2', 4', 3'', 23 a 3 za vzniku acylesterových derivátů tak, že se působí acylačními činidly známým způsobem. DH—DO—OMT je možno esterifikovat na hydroxylových skupinách v polohách 2', 4', 23 a 3.

Typickými acylačními činidly jsou anhydridy, halogenidy, které se užívají obvykle v kombinaci se zásadou nebo jinou látkou pohlcující kyselinu a 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 provádět enzymaticky, jak bylo popsáno Okamotoem a dalšími v US patentu č. 4 092 473. Vzniklé acylové deriváty je možno oddělit a čistit známým způsobem.

Nejsnadnější je esterifikace na hydroxylové skupině v poloze 2' a 4'. Esterifikací DH—DO—OMT tedy vznikají 2'-monoesterové deriváty při použití selektivní esterifikace, známé z literatury, postupuje se například tak, že se na antibiotikum působí stechiometrickým množstvím nebo malým přebytkem acylačního činidla, například anhydridu kyseliny při teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin do dovršení esterifikace.

Tyto deriváty je možno izolovat z reakční směsi běžnými postupy jako extrakcí, chromatografií a krystalizací. Esterifikací DH—DO—OMT za obdobných podmínek se získají 2',4'-diesterové deriváty. 2'-monoestery DH—DO—OMT je možno získat hydrolýzou odpovídajících 2'-monoesterů DH—DO—DMT v mírně kyselém prostředí svrchu uvedeným způsobem. Smíšené 2',4'-diestery DH—DO—OMT je možno získat esterifikací 2'-monoesterů DH—DO—OMT svrchu uvedeným způsobem.

Použitelnými estery jsou estery organických kyselin včetně kyselin alifatických, cykloalifatických, arylkarboxylových, aralkylkarboxylových, heterocyklických karboxylových kyselin, kyselin sulfonových a alkoxykarbonylových o 2 až 18 atomech uhlíku a estery anorganických kyselin, například kyseliny sírové a fosforečné.

Příkladem vhodných esterů mohou být estery odvozené od kyseliny octové, chloroctové, propionové, máselné, isovalerové, alkoxykarboxylových kyselin, kyseliny stearové, cyklopropankarboxylové, cyklohexankarboxylové, β -cyklohexylpropionové, 1-adamantankarboxylové, benzoové, fenylacetové, fenoxycetové, mandlové a 2-thienylacetové, jakož i kyselin alkylsulfonových, arylsulfonových, a aralkylsulfonových.

Arylkyseliny a aralkylkyseliny popřípadě nesou substituenty, například atomy halogenu, nitroskupiny, nižší alkoxy skupiny a podobně na aromatickém jádře. Vhodnými estery jsou rovněž poloestery, odvozené od dikarboxylových kyselin jako kyseliny jantarové, maleinové, fumarové, malonové a ftalové.

Výhodnou skupinu tvoří estery, přijatelné z farmaceutického hlediska. Ostatní este-

rové deriváty je možno použít jako meziprodukty.

Soli

DH—DO—DMT, DH—DO—OMT a jejich deriváty mohou tvořit adiční soli s kyselinami. Adiční soli DH—DO—DMT a DH—DO—OMT a acylderiváty těchto sloučenin s kyselinami rovněž spadají do oboru vynálezu. Tyto soli je možno použít například k izolaci, čištění a krystalizaci DH—DO—DMT, DH—DO—OMT a jejich acylových derivátů. Mimoto jsou uvedené soli daleko lépe rozpustné ve vodě.

Příkladem vhodných solí mohou být soli vzniklé standardními reakcemi s organickými kyselinami, například kyselinou sírovou, chlorovodíkovou, fosforečnou, octovou, jantarovou, citrónovou, mléčnou, malonovou, fumarovou, palmitovou, žlučovou, pamoovou, slizovou, D-glutamovou, D-kafeovou, glutarovou, glykolovou, ftalovou, vinnou, mravenčí, laurovou, stearovou, salicylovou, methansulfonovou, benzensulfonovou, sorbinovou, pikrovou, benzoovou, skořicovou a podobnými kyselinami.

Adiční soli s kyselinami, přijatelné z farmaceutického hlediska tvoří zvláště výhodnou skupinu solí, které je možno získat způsobem podle vynálezu. Pod tímto pojmem se rozumí soli, které je možno podat jako bezpečná a účinná léčiva teplokrevným živočichům.

Výroba DH—DO—DMT a DH—DO—OMT při použití *S. fradiae*

DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je možno získat tak, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae*, například *S. fradiae* ATCC 31733, který produkuje tuto látku v submerzní kultuře za aerobních podmínek ve vhodném živném prostředí do nahromadění antibiotika. Živným prostředím, užitým k pěstování *Streptomyces fradiae* ATCC 31733 může být jakékoli běžné prostředí. Z důvodů hospodárnosti, optimálního výtěžku a snadnosti izolace jsou některá živná prostředí výhodnější.

Výhodnými zdroji uhlíku při fermentaci ve větším měřítku jsou uhlohydráty, například dextrin, glukóza, škrob a kukuřičná mouka a oleje, například sójový olej. Výhodnými zdroji dusíku jsou kukuřičná mouka, sójová mouka, rybí mouka, amluokyseliny a podobně. Z anorganických solí, které je možno včlenit do živného prostředí jsou především o běžné rozpustné soli, obsahující železo, draslík, sodík, hořčík, vápník, amonné ionty, chloridové ionty, ionty uhličitánové, síranové, dusičnanové a podobně.

Živné prostředí má také obsahovat základní stopové prvky, které jsou nutné pro růst a vývoj použitého produkčního organismu. Tyto stopové prvky jsou běžně přít-

tomny jako nečistoty v ostatních složkách živného prostředí v množství, dostatečném ke splnění růstových požadavků organismu. Může však být zapotřebí přidat malé množství, například 0,2 ml/l protipěnového činidla jako polypropylenglykolu molekulové hmotnosti přibližně 2000, a to zejména při fermentaci ve velkém měřítku, kde pění živného prostředí se stává velkým problémem.

Pro výrobu větších množství DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je výhodná fermentace v submerzní kultuře za aerobních podmínek v tanku. Pro výrobu větších množství DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je výhodné fermentace v tanku v submerzní kultuře za aerobních podmínek. Malá množství DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je možno získat v třepací kultuře. Protože při očkování sporami organismu ve větším tanku dochází k období lag, je výhodnější užít vegetativního očkovacího materiálu. Befeťativní očkovací materiál se získá tak, že se naočkuje malý objem živného prostředí sporami nebo myceliálními fragmenty organismu, čímž se získá čerstvá aktivní rostoucí kultura organismu. Vegetativní očkovací materiál se pak přenesení do většího tanku. Prostedí, užité pro vegetativní očkovací materiál může být totéž jako prostedí, užité ve větší fermentaci, je však možno užít i jiného prostedí.

S. fradiae ATCC 31733 je možno pěstovat při teplotě 10 až 40 °C. K optimální produkci antibiotika dochází při teplotě přibližně 28 °C.

Jak je to běžné v submerzní kultuře za aerobních podmínek, nechá se živným prostedím probublávat sterilní vzduch. Pro účinnou produkci antibiotika má být nasycení vzduchem v tanku 30% nebo vyšší při teplotě 28 °C a atmosférickému tlaku.

Produkci antibiotika je možno sledovat v průběhu fermentace tak, že se odebírají vzorky a srovnávají se testováním proti organismům, která jsou na toto antibiotikum citlivá. Použitelným organismem je například *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Biologická zkouška se obvykle provádí automatickou zákalovou metodou. Mimoto je možno sledovat produkci antibiotika kapalinovou chromatografií při detekci ultrafialovým světlem.

Po skončení fermentace v submerzní kultuře za aerobních podmínek je možno DH—DO—DMT nebo DH—DO—OMT izolovat z fermentačního prostředí známým způsobem.

Izolace DH—DO—DMT nebo DH—DO—OMT se nejprve provádí filtrací fermentačního prostředí. Zfiltrované živné prostředí je možno dále čistit za získání požadovaného antibiotika. K čištění je možno užít celou řadu způsobů. Výhodným způsobem čištění zfiltrovaného živného prostředí je způsob, při němž se živné prostředí upraví na pH 9 a pak se extrahuje vhodným rozpouštědlem, například ethylacetátem, amylacetátem, nebo methylisobutylketonem, organická fáze se extrahuje vodným kyselým roztokem a antibiotikum se vysráží alkalizací vodného extraktu. Další čištění je možno provést extrakcí, chromatografií a/nebo srážecími metodami.

Nový mikroorganismus, který je schopen produkovat DH—DO—DMT a DH—DO—OMT byl získán chemickou mutací kmene *Streptomyces fradiae*, který produkuje tylosin.

Tento nový mikroorganismus produkuje pouze velmi malé množství tylosinu, avšak jako hlavní složky produkuje DH—DO—DMT a DH—DO—OMT v přibližně stejném množství.

Nový mikroorganismus, který produkuje DH—DO—DMT a DH—DO—OMT je rovněž možno klasifikovat jako *Streptomyces fradiae*. Kultura tohoto organismu bylo uložena ve sbírce The American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, 16. října 1980, kultury je možno získat pod číslem ATCC 31733.

Jako je tomu v případě jiných organismů, vlastnosti *Streptomyces fradiae* ATCC 31733 se poněkud mění. Je například možno získat umělé varianty nebo mutanty kmene ATCC 31733 působením různých fyzikálních nebo chemických mutagenů, jako jsou například ultrafialové světlo, paprsky X, paprsky gamma nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Všechny přírodní a umělé varianty, mutanty a rekombinanty kmene *Streptomyces fradiae* ATCC 31733, které si uchovávají svou schopnost produkovat DH—DO—DMT a/nebo DH—DO—OMT je možno užít při provádění způsobu podle vynálezu.

DH—DO—DMT a DH—DO—OMT inhibují růst pathogenních bakterií, zvláště gram-pozitivních bakterií čeledi *Mycoplasmata*. V následující tabulce 3 jsou uvedeny minimální inhibiční koncentrace (MIC) při měření standardním zředovacím způsobem v agaru, za těchto podmínek inhibují DH—DO—DMT a DH—DO—OMT ve volné formě růst některých bakterií.

Tabulka 3

Účinnost in vitro pro DH—DO—DMT a DH—DO—OMT

Organismus	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	DH—DO—DMT	DH—DO—OMT
<i>Streptococcus aureus</i> NRRL B 313	128	4
<i>Staphylococcus aureus</i> V41	128	4
<i>Staphylococcus aureus</i> X400	> 128	8
<i>Staphylococcus aureus</i> S13E	64	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> EPI1	128	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> EPI2	64	8
<i>Streptococcus pyogenes</i> C203	> 128	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Park 1	> 128	8
<i>Streptococcus faecium</i> ATCC 9790	> 128	16
<i>Streptococcus</i> sp. skupina D 9960	> 128	16
<i>Haemophilus influenzae</i> C. L.	> 128	16
<i>Haemophilus influenzae</i> 76	> 128	16
<i>Shigella sonnei</i> N9	> 128	> 128
<i>Escherichia coli</i> N10	> 128	> 128
<i>Escherichia coli</i> EC14	> 128	> 128
<i>Escherichia coli</i> TEM	> 128	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> X26	> 128	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KAE	> 128	> 128

DH—DO—OMT rovněž inhibuje některé anaerobní bakterie. Tabulka 4 shrnuje MIC pro DH—DO—OMT v případě těchto bakterií. Stanovení bylo prováděno zředěním na agaru při odečítání za 24 hodiny.

Tabulka 4

Účinnost DH—DO—OMT in vitro proti anaerobním bakteriím

Organismus	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Clostridium difficile</i> 2994	2
<i>Clostridium perfringens</i> 81	2
<i>Clostridium septicum</i> 1128	2
<i>Eubacterium aerofaciens</i> 1235	2
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 1302	> 8
<i>Peptococcus prevoti</i> 1281	> 8
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1428	> 8
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> 1264	> 8
<i>Propionibacterium acnes</i> 79	2
<i>Bacteroides fragilis</i> 111	> 8
<i>Bacteroides feagilis</i> 1877	> 8
<i>Bacteroides fragilis</i> 1936B	> 8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1438	> 8

<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 1856/28	> 8
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 2736	> 8
<i>Bacterioides vulgatus</i> 1211	> 8
<i>Bacteroides corrodens</i> 1874	> 8
<i>Fusobacterium symbiosum</i> 1470	> 8
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 6054A	8

DH—DO—OMT působí inhibici růstu *Chlamydia trachomatis* v buněčné kultuře při MIC 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Mimoto působí DH—DO—OMT inhibicí čeledi *Mycoplasma*. Například byla stanovena pro DH—DO—OMT hodnota MIC 12,5 $\mu\text{g/ml}$ proti *M. gallisepticum* a *M. synoviae*.

DH—DO—OMT má také in vivo antimikrobiální účinnost proti experimentálním bakteriálním infekcím. V případě, že se dvě dávky zkoumané látky podají myším v průběhu experimentální infekce, je možno vyjádřit zjištěnou účinnost jako hodnotu ED₅₀ [účinná látka v mg/kg, schopná zachránit 50 % pokusných zvířat, jak bylo popsáno v publikaci Warren Wick a další J. Bacteriol. 81, 233 až 235 (1961)]. Hodnoty ED₅₀, které byly zjištěny pro DH—DO—OMT ve volné formě jsou uvedeny v následující tabulce 5.

Tabulka 5

Účinnost DH—DO—OMT proti experimentální infekci u myši

Organismus	Cesta podání	LD ₅₀	ED ₅₀ (mg/kg × 2)
Staphylococcus aureus 3055	perorálně	100	44
Staphylococcus aureus 3055	podkožně	221	37,3
Streptococcus pyogenes C203	perorálně	64	75,3
Streptococcus pneumoniae Park I	perorálně	20,4	223,6

Makrolidy podle vynálezu budou obvykle užity pro léčebné účely ve formě veterinárních přípravků, v nichž makrolidová účinná složka bude smíšena s jedním nebo větším počtem netoxických nosičů. Povaha těchto přípravků je zcela běžná a je známa každému odborníkovi.

Přestože DH—DO—DMT a jeho deriváty mají určitou antibakteriální účinnost, je výhodnější užít tyto látky jako meziprodukty pro výrobu DH—DO—OMT.

DH—DO—OMT, acylesterové deriváty této látky a její adiční soli s kyselinami je možno užít jako povrchové desinfekční prostředky. Pro tento účel jsou vhodné roztoky s malou koncentrací, například 0,01 hmotnostních %. Tyto roztoky, výhodné také jako smáčedlo a čistící prostředek je možno užít k desinfekci osob a povrchů tam, kde je důležité udržení sterilních podmínek.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

A. Fermentace DH—DO—DMT a DH—DO—OMT v třepací lahvi

Lyofilizovaná peleta *Streptomyces fradiae* ATCC 31733 se disperguje 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 (%)
kukuřičný výluh	1,0
extrakt z kvasnic	0,5
sójové pokrutiny	0,5
uhličitan vápenatý	0,3
sójový olej (surový)	0,45
deionizovaná voda	97,25

Je také možno postupovat tak, že se vegetativní kultura *S. fradiae* ATCC 31733, uchovávaná po objemu 1 ml v kapalném dusíku nechá rychle roztát a pak se užije k naočkování vegetativního živného prostředí. Naočkované vegetativní živné prostředí se inkubuje v Erlenmeyerově baňce o objemu 500 ml při teplotě 29 °C po dobu 48 hodin v uzavřené třepačce při 300 výkyvech za minutu.

Toto inkubované vegetativní živné pro-

středí se v množství 0,5 ml užije k naočkování 7 ml produkčního prostředí, které má následující složení:

Složka	Množství (%)
řepná melasa	2,0
kukuřičná mouka	1,5
rybí mouka	0,9
kukuřičný gluten	0,9
chlorid sodný	0,1
hydrogenfosforečnan amonný	0,04
uhličitan vápenatý	0,2
sójový olej (surový)	3,0
deionizovaná voda	91,36

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

B. Fermentace DH—DO—DMT a DH—DO—OMT v tanku

Aby bylo možno získat větší objem očkovacího materiálu, užije se 1200 ml inkubovaného vegetativního prostředí, připraveného způsobem podle odstavce A k naočkování $950 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ vegetativního živného prostředí následujícího složení:

Složka	Množství (%)
kukuřičný výluh	1,0
sójová mouka	0,5
extrakt z kvasnic	0,5
uhličitan vápenatý	0,3
sójový olej (surový)	0,5
lecithin (surový)	0,015
voda	97,185

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

Toto vegetativní prostředí se inkubuje v tanku o objemu $1325 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ 48 hodin při teplotě 28 °C za současného provzdušňování a míchání.

$545 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ inkubovaného živného prostředí z druhého stupně se užije k naočkování $3785,41 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ sterilního produkčního prostředí následujícího složení:

Složka	Množství (%)
rybí mouka	0,875
kukuřičná mouka	1,5
kukuřičný gluten	0,875
uhlíčitán vápenatý	0,2
chlorid sodný	0,1
hydrogenfosforečnan amonný	0,04
řepná melasa	2,0
sójový olej (surový)	3,0
lecithin	0,09
voda	91,32

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

Naočkované produkční prostředí se podrobí fermentaci v tanku o objemu 6056 . 10⁻³ m³ po dobu 8 až 9 dnů při teplotě 28 °C. Fermentační živné prostředí se provzdušňuje sterilním vzduchem tak, aby bylo nasyceno rozpuštěným kyslíkem na 30 až 50 % a současně se míchá běžnými míchadly rychlostí 250 otáček za minutu.

Příklad 2

Izolace DH—DO—DMT a DH—DO—OMT

38 litrů živného prostředí, připraveného způsobem podle příkladu 1, odstavec B se zfiltruje za použití pomocného prostředku pro filtraci. Myceliální koláč se promyje vodou a 30 litrů filtrátu a promývacího roztoku se upraví na pH 9,1 přidáním 10 % hydroxidu sodného. Výsledný roztok se dvakrát extrahuje ethylacetátem (15 litrů a 5,5 litrů). Ethylacetátové extrakty se slíjí a extrahují 9 litry a pak 3 litry zředěného roztoku kyseliny fosforečné, vodná fáze se upraví na pH 4,1 přidáním kyseliny fosforečné o koncentraci 28 %. 8,8 litrů slitých vodných extraktů se upraví na pH 9,2 přidáním hydroxidu sodného, načež se dvakrát extrahuje chloroformem, pokaždé 2 litry. Chloroformové extrakty se vysuší a odpaří dosucha, čímž se získá 32 g pevného materiálu.

5 g tohoto materiálu se rozpustí v ethyl-

acetátu a zpracovává se pomocí šestistupňového protiproudového zpracování ethylacetátem a 0,5 M fosfátovým pufrům o pH 6,1, čímž se získá 2,5 g DH—DO—OMT. Dalším šestistupňovým zpracováním při pH 5,5 se získá ještě 0,1 g DH—DO—OMT. DH—DO—OMT se pak nechá krystalizovat z bezvodého acetonu.

Tímto způsobem se rovněž získá 1,42 g surového DH—DO—DMT. Tato látka se čistí protiproudovým systémem, který sestává z organické fáze, a to směsí ethylacetátu a heptanu v poměru 1:2 a z vodné fáze, kterou tvoří 0,5 M fosfátový pufr o pH 6,2. Po šesti stupních se částečně oddělí DH—DO—DMT. Pak se nechá krystalizovat z vodného methanolu. Z 1 g surového materiálu se získá 400 mg čistěného DH—DO—DMT.

Příklad 3

Výroba DH—DO—OMT z DH—DO—DMT

DH—DO—DMT, připravený způsobem podle příkladu 2 se rozpustí ve zředěném roztoku kyseliny chlorovodíkové (kyselina chlorovodíková se přidává do vodného roztoku tak dlouho, až se dosáhne pH 1,8). Výsledný roztok se nechá stát 24 hodin při teplotě místnosti a pak se upraví na pH 9,0 přidáním hydroxidu sodného. Alkalický roztok se extrahuje ethylacetátem, dichlormethanem nebo chloroformem. Extrakt se vysuší a odpaří ve vakuu, čímž se získá DH—DO—OMT.

Příklad 4

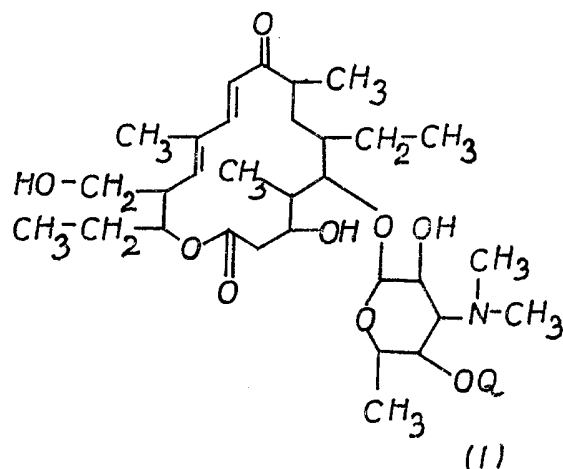
Další možný způsob výroby DH—DO—OMT

DH—DO—OMT je také možno připravit z DH—DO—DMT tak, že se působí na DH—DO—DMT ve fermentačním prostředí, v němž byla tato látka získána slabou kyselinou, tak jak bylo svrchu popsáno v příkladu 3. Izolace DH—DO—OMT se provádí způsobem, který je podobný způsobu, popsanému v příkladu 2.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

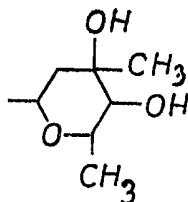
Způsob výroby makrolidových antibiotik
20-dihydro-20-deoxy-23-demycinosyltylosi-

nu a 20-dihydro-20-deoxy-5-O-mycaminosyl-
tylonolidu obecného vzorce I



kde

Q znamená atom vodíku nebo



nebo z farmaceutického hlediska přijatelného esteru nebo adiční soli této látky s kyselinou, vyznačující se tím, že se pěstuje

kmen *Streptomyces fradiae* ATCC 31733 v živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí v submerzní kultuře za aerobních podmínek při teplotě 10 až 40 °C do nahromadění antibiotika obecného vzorce I a popřípadě se odštěpí mykarosylová skupina z makrolidového antibiotika obecného vzorce I, v němž Q má odlišný význam od atomu vodíku hydrolýzou v kyselém prostředí při pH 4 nebo nižším a při teplotě 20 až 100 °C za získání makrolidového antibiotika obecného vzorce I, v němž Q znamená atom vodíku a popřípadě se vytvoří ester nebo sůl antibiotika obecného vzorce I.

2 listy výkresů

238663

