

ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATALSZABADALMI  
LEÍRÁS

B

(11) 189 512

A bejelentés napja: (22) 81. 06. 11.

(21) 1737/81

A bejelentés elsőbbsége:

(33)  
US:(32)  
80. 06. 12.(31)  
(156 854)

Megjelent: (45) 1988. IX. 30.

Nemzetközi  
osztályjelzet:  
(51) NSZO,  
C 12 P 17/08

Feltaláló(k): (72)

BALTZ Richard Henry, mikrobiológus, WILD Gene Muriel, kutató,  
KIRST Herbert Andrew, kutató, Indianapolis, Indiana, US, SENO  
Eugene Thomas, kutató munkatárs, Norwich, GB

Szabadalmaz: (73)

Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, US

(54)

## ELJÁRÁS MAKROLID ANTIBIOTIKUMOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

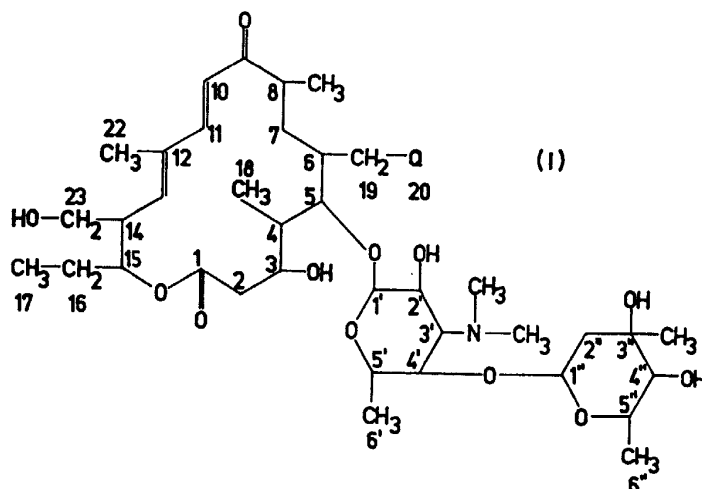
## (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás (I) általános képletű makrolid antibiotikumok és ezek 1-5 szénatomos alkanoil-, fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-, fenoxi-(1-4 szénatomos)-alkanoil- és halogén-fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-észtereinek előállítására, ahol

Q jelentése  $-\text{CH}_2\text{OH}$  vagy  $-\text{CHO}$  csoport - azzal a feltétellel, hogy ha a molekula 3-helyzetében

O-acetilcsoport van, a 4"-helyzet O-izovalerilcsoporttól eltérő.

Az állatorvosi gyakorlatban használható antibiotikum előállítására a *Streptomyces fradiae* NRRL 12 170 mikroorganizmust szülesztett, levegőztetett fermentációs körülmények között tenyésztik, majd a felhalmozódott antibiotikumot elkülönítik.



(I)

A találmány tárgya eljárás az ismert terápiás használatú tilozinnal (lásd például Tetrahedron Letters, 2339, 1970) rokon makrolid antibiotikumok előállítására.

A tilozin nagy értéke ellenére állandóan szükség van új antibiotikumok iránti kutatásra, mivel rezisztens törzsek jelenhetnek meg. Ezen felül a vegyületek szerkezetének módosítása megváltoztathatja az érzékeny mikroorganizmusok spektrumát. Sajnálatos módon a tilozinnal rokon makrolidok szerkezetének kémiai módosítása különösen nehéz. Így például a J. Org. Chem., 44, 2050-2952, 1979., cikkben jelzik a tilozin molekuláról való micinozil-glükózid kötés hasításának nehézségeit. Az ezen a területen dolgozó kutatók túlnyomó többségben oly módon kutatnak újszerű szerkezetű vegyületek után, hogy új, a természetben előforduló, vagy mesterségesen előállított új mikroorganizmusokat keresnek, abban a reményben, hogy tenyésztésük során hasonló szerkezetű vegyületek bioszintetizálódnak.

Úgy találtuk, hogy a tilozinhoz hasonló vegyületeket, de a tilozinban lévő micinozil-cukorrészt nem tartalmazó vegyületeket állíthatunk elő bizonyos Streptomyces fradiae törzsek sülyesztett, levegőztetett körülmények közötti fermentációjával.

A találmány tárgya eljárás egy új, az (I) általános képletben bemutatott szerkezetű makrolid antibiotikumot tartalmazó állatorvosi készítmény előállítására, ahol az általános képletben

$Q - CH_2OH$  vagy  $-CHO$  csoport.

A találmány tárgya továbbá eljárás az (I) általános képletű vegyületek 1-5 szénatomos alkanoil-, fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-, fenoxi-(1-4 szénatomos)-alkanoil- és halogén-fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-észterének előállítására. Az (I) általános képletben ha a 3-as helyzetű csoport O-acetilcsoport, úgy a 4"-helyzetben nem lehet O-izovale-ricilcsoport.

Bár a fenti szerkezetű képletben sztereokémiai konfigurációt nem jelöltünk, nyilvánvaló, hogy a vegyület sztereokémiai konfigurációja azonos a tilozinéval. A neutrális cukor mikaróz és az aminos-cukor mikaminóz.

Abban az esetben, ha az általános képletben Q aldehidcsoport, úgy a vegyület új makrolid antibiotikum, nevezetesen a 23-demicinozil-tilozin, amit demicinozil-tilozinnak, vagy DMT-nek nevezünk, kényelmi szempontból. A vegyület a (II) általános képletben megadott szerkezetű.

A DMT dihidro-származékát, azaz a 20-dihidro-23-demicinozil-tilozint dihidro-DMT-nek nevezük, kényelmi szempontból. Ennek a vegyületnek a szerkezetét a (III) képletben mutatjuk be.

A találmány szerinti vegyületek gátolják a melegvérű állatok számára patogén mikroorganizmusok növekedését. Részletesebben, ezek olyan baktériumellenes szerek, amelyek különösen aktívak Gram-pozitív mikroorganizmusokkal, és Mycoplasma fajokkal szemben.

Használható acil-észter-származékok előállítására a DMT hidroxilcsoportjait és a dihidro-DMT-hidroxilcsoportjait észterezhetjük a 2'-, 4"-, 3"-, 23- és 3-hidroxilcsoportokon. Ezen felül a dihidro-

DMT-t észterezhetjük a 20-hidroxilcsoporton is. A 2'-hidroxilcsoport észterezése a legkönnyebb.

A találmány szerinti eljárást új Streptomyces fradiae törzssel végezzük, e törzs száma NRRL 12 170. A találmány tárgya továbbá eljárás DMT vagy dihidro-DMT előállítására oly módon, hogy ezt a törzset sülyesztett, levegőztetett fermentációs körülmények között addig tenyésztjük, míg jelentős mennyiségű antibiotikum termelődik. A DMT-t vagy dihidro-DMT-t a lúgos fermentle szűrletéből extrahálhatjuk poláris, szerves oldószerekkel, majd tovább tisztíthatjuk extrakcióval, adszorpcióval és/vagy kristályosítással.

A DMT dihidro-származékát kémiai redukcióval vagy fermentációval állítjuk elő. Ha a dihidro-DMT-t kémiai redukcióval állítjuk elő, úgy ismert módon járunk el, például a DMT-t közelítőleg sztöchiometrikus mennyiségű kémiai redukálószerrel, például nátrium-bórhidriddel reagáltatjuk, például alkoholos oldószerekkel készült reakcióelegyen. A dihidro-DMT előállítására eljárhatunk oly módon is, hogy a találmány szerinti S. fradiae NRRL 12 170 törzssel szabályozott körülmények között végzünk fermentációt.

Az acil-észter-származékok előállítására a DMT-t és dihidro-DMT-t észterezzük a 2'-, 4"-, 23- és 3-helyzetben oly módon, hogy ismert módon acilezőszerekkel reagáltatjuk. A dihidro-DMT-t a 20-helyzetben is észterezhetjük. A legkönnyebben a 2'-hidroxilcsoport észtereződik. Acilezőszerként például anhidrideket, halogenideket (rendszerint bázissal, vagy más savelnnyelével együtt), és szerves savak aktív észtereit használjuk. Az acilezést szerves sav és egy dehidratálószer, például N,N'-diciklohexil-karbodiimid elegyével is végezhetjük. Az acilezés történhet enzimatikusan is, ahogy azt Okamoto és munkatársai írják a 4 092 473 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. A keletkező acil-származékokat ismert módszerekkel különítjük el és tisztítjuk.

A 2'-monoészter-származékokat az irodalomból ismert szelektív észterezéssel állíthatjuk elő, például oly módon, hogy az antibiotikumot sztöchiometrikus mennyiségű (vagy ennyi fölüllegben jelenlévő) acilezőszerrel reagáltatjuk, acilezőszerként például acil-anhidridet használunk; a reakciót szobahőmérsékleten, 1-24 óráig végezzük, míg az észtereződés gyakorlatilag teljessé válik. A 2'-monoésztert a reakcióelegyből ismert módszerekkel, például extrakcióval, kromatográfiával vagy kristályosítással különítjük el.

Előnyös vegyületcsoportot képviselnek a gyógyszerészeti szempontból elfogadható észter-származékok. Más észter-származékokat is használhatunk intermediereként.

A DMT, a dihidro-DMT és ezek acil-észter-származékai savaddíciós sókat képeznek. A DMT, dihidro-DMT és ezek acil-származékainak savaddíciós sói a találmány oltalmi köréhez tartoznak. Ezeket a sókat felhasználhatjuk például a DMT, dihidro-DMT és ezek acil-származékainak elkülönítésére, tisztítására és kristályosítására.

Ahogy azt az előzőekben megjegyeztük, a DMT-t és dihidro-DMT-t oly módon állítjuk elő, hogy a Streptomyces fradiae egy törzsét tenyésztjük, olyan

törzset használunk, amely ezeket a vegyületeket termeli sülyesztett és levegőztetett fermentációs körülmények között, megfelelő összetételű táptalajban. A tenyésztést addig folytatjuk, míg jelentős mennyiségű antibiotikum halmozódik fel. A témában jártas szakember előtt nyilvánvaló, hogy először a DMT termelődik a fermentáció során. A dihidro-DMT akkor keletkezik, ha a fermentációt hosszabb időn át végezzük, amikor a jelenlévő DMT enzimatikusan redukálódik.

A *Streptomyces fradiae* NRRL 12 170 mikroorganizmus tenyésztéséhez többféle táptalajt használhatunk. A termelés gazdaságossága, az optimális hozam és a termék izolálásának egyszerűsítése érdekében azonban bizonyos összetételű táptalajok előnyösek. Így például szénforrásként előnyösen, különösen a nagy térfogatú fermentációkkor szénhidrátokat, például dextrint, glükózt, keményítőt, kukoricalisztet és olajokat, például szójabab-olajat használunk. Nitrogénforrásként előnyösen például kukoricalisztet, szójalisztet, hallisztet, aminosavakat, vagy más, hasonló készítményeket használunk.

A táptalajhoz adott szervetlen sók például a vízben oldódó, vasionokra, káliumionokra, nátriumionokra, magnéziumionokra, kalciumionokra, ammóniumionokra, kloridionokra, karbonátionokra, szulfátionokra, nitrátionokra és más, hasonló ionokra disszociáló sók.

A mikroorganizmus növekedéséhez és kifejlődéséhez szükséges nyomelemeket szintén hozzáadhatjuk a táptalajhoz. Ezek a nyomelemek általában szennyezőanyagként jelen vannak a táptalaj többi összetevőjében, mégpedig a mikroorganizmus igényének megfelelő mennyiségben. Esetenként kevés (például literenként 0,2 ml) habzástgátló szert, például polipropilén-glikolt (molekulasúlya körülbelül 2000) adunk a nagy térfogatú fermentációk táptalajához, abban az esetben, ha a habzás problémát okoz.

Nagyobb mennyiségű DMT vagy dihidro-DMT előállításához tankfermentorban sülyesztett, levegőztett körülmények között végzünk fermentációt. Kismennyiségű DMT-t vagy dihidro-DMT-t úgy állítunk elő, hogy rázott lombikban végzünk tenyésztést. Az antibiotikum termelésben mutatkozó lag-fázis miatt, amely általában akkor jelentkezik, ha nagymennyiségű táptalajt oltunk be a mikroorganizmus spóráival, előnyösen vegetatív inokulumot használunk. A vegetatív inokulum előállítására kismennyiségű táptalajt oltunk a mikroorganizmus spóráival vagy micélium darabkáival, ilyenkor friss, aktívan növekvő tenyészetet kapunk. A vegetatív inokulummal ezután beoltjuk a nagymennyiségű táptalajt. A vegetatív inokulum előállítására használt táptalaj a főfermentációs táptalajjal azonos lehet, használhatunk azonban más összetételű táptalajt is.

A *S. fradiae* NRRL 12 170 mikroorganizmust 10 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten növeszthetjük. Az antibiotikum termelés szempontjából optimális a 28 °C.

Ahogy az a levegőztetett, sülyesztett fermentációknál szokásos, a táptalajon steril levegőt buborékolatunk át. A nagymennyiségű antibiotikum

termelés érdekében tankfermentációkor 28 °C hőmérsékleten és 1 atmoszféra nyomáson 30%-os, vagy ennél magasabb levegő-telítettséget biztosítunk.

A fermentáció során az antibiotikum termelést oly módon követjük, hogy mintákat az antibiotikumokra érzékeny mikroorganizmussal szemben mérünk. Mérőorganizmusként például *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 mikroorganizmust használunk. A biológiai értékmérést előnyösen automatizált turbidimetriás módszerrel végezzük. Az antibiotikum termelést ezen kívül követhetjük nagyfelbontású folyadék-kromatográfiával UV fényben.

A sülyesztett, levegőztetett fermentációs körülmények között kivitelezett tenyésztés után a DMT-t vagy a dihidro-DMT-t a fermentációs szakmában ismert módszerekkel különítjük el a tenyészléből. A DMT vagy a dihidro-DMT kinyerésére szűrjük a tenyészelvet. A szűrt levét ezután tovább tisztíthatjuk az előállítandó antibiotikum kinyerésére. A tisztítás során több módszert használhatunk. A szűrt lé tisztítása például oly módon történhet, hogy pH-ját 9-re állítjuk be, megfelelő oldószerezrel, például etil-acetáttal, amil-acetáttal vagy metil-izobutil-ketonnal extraháljuk, a szerves fázist elkülönítjük és vizes, savas oldattal extraháljuk. Ezt követően kicsapjuk az antibiotikumot oly módon, hogy a vizes extrakt pH-ját lúgosra állítjuk be. A további tisztítási lépéseket extrakcióval, adszorpcióval és/vagy kicsapással végezzük.

A találmány szerinti új mikroorganizmust a tilozint termelő *Streptomyces fradiae* kémiai mutagenézisével állítottuk elő. A mutagenizált mikroorganizmus csak kismennyiségű tilozint termel, termeli viszont a DMT-t, mégpedig major komponensként.

Jellemzés céljából az új mikroorganizmust összehasonlítottuk a *Streptomyces fradiae* M48-E 2724.1 törzssel, ez a törzs a *S. fradiae* NRRL 2702 mikroorganizmusból származik, és tilozint bioszintetizál. A *S. fradiae* NRRL 2702 mikroorganizmust Hamill és munkatársai írják le a 3 178 341 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. A jelen leírásban a tilozint termelő *S. fradiae* M48-E 2727.1 tenyészetet E2724.1 törzsnek nevezzük.

Az új DMT- és dihidro-DMT-t termelő NRRL 12 170 törzset szintén *Streptomyces fradiae*-nek határoztuk meg. A meghatározás során az International Streptomyces Project *Streptomyces* fajokra érvényes módszereit használtuk [Shirling és Gottlieb, *Methods For Characterization of Streptomyces Species*; Internal. Journal of Systematic Bacteriology, 16 (3), 313–340 (1966)]; a vizsgálat során bizonyos kiegészítő vizsgálatokat is végeztünk. Az összehasonlítást az alábbi *S. fradiae* mikroorganizmusra vonatkozó irodalom figyelembevételével végeztük: 1) Buchanan és Gibbons, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. kiadás, The Williams és Wilkins Co., Baltimore, Md., 1974, 815. oldal; és 2) Shirling és Gottlieb, *Cooperative Description of Streptomyces*. II. Species Description from First Study, Internal. Journal of Systematic Bacteriology, 18 (2), 118, 1968].

Az új törzs és az E2724.1 törzs spóraláncainak

morfológiája: Retinaculum Apertum (RA) csoportba tartozó. Horgok, hurkok és szabálytalan gördületek láthatók, ezek rövidek, és általában keskeny átmérőjűek. Ezek legjobban az ISP # 2 (élesztő kivonat-maláta-agar) táptalajon figyelhetők meg. A spórák felszíne sima; a spórák alakja ovális, átmérőjük 0,65 µm. Átmérőjük 0,61 µm és 0,71 µm között változik.

A törzsek között a legnyilvánvalóbb különbség tenyésztési jellemzőikben mutatkozik. Az E2724.1 törzs a legtöbb táptalajon légmiciéliumot fejleszt, a légmiciéliumok jól fejlettek, és a fehér színsorozathoz tartoznak. A DMT-t termelő törzs egyáltalán nem, vagy csak kevésbé fejlett légmiciéliumot fejleszt. Ha jelen van a légmiciélium, úgy az a fehérszürke színsorozathoz sorolható. A telepek hátoldalán nem látszik színanyag-termelés. Színük világos-közepesen sárga. A melanoid-pigment-termelés szempontjából a törzs negatív. (A melanoid-típusú színanyag termelését ISP # 1 (tripton-élesztő kivonat), ISP # 6 (pepton-élesztő kivonat-vas-agar), ISP # 7 (tirozin-agar) és IPS tirozin nélküli agaron vizsgáltuk).

Az E2724.1 törzs és a DMT-t termelő törzs közötti hasonlóságokat és különbségeket az I. táblázatban ismertetjük.

I. Táblázat

*Streptomyces fradiae* E2724.1 és az NRRL 12 170 törzs összehasonlítása

| Hasonlóságok                               | Különbségek               |
|--------------------------------------------|---------------------------|
| A spóraláncok morfológiája                 | tenyésztési tulajdonságok |
| A spórák felületének ornamentikája         | szénforrás hasznosítás    |
| Spóra méret                                | zselatin elfolyósítás     |
| A kromogenitás hiánya                      | nátrium-klorid tolerancia |
| Oldható színanyag hiánya                   | pH-érték                  |
| Növekedés szelektált, vegetatív táptalajon | hőmérséklet-érték         |
| Keményítő-hidrolízis                       |                           |
| Negatív fölözött tej-reakció               |                           |
| Nitrát-redukció                            |                           |
| Kataláz-pozitív                            |                           |
| Foszfátáz-pozitív                          |                           |
| Ureáz-negatív                              |                           |
| Antibiotikum érzékenységi vizsgálat.       |                           |

A II. táblázatban ismertetjük a *S. fradiae* E2724.1 és NRRL 12 170 törzsek morfológiai és növekedési tulajdonságait.

A III. táblázatban az antibiotikum-érzékenységet, a IV. táblázatban a szénforrás-hasznosítási spektrumot, végül az V. táblázatban az egyéb élet-tani tulajdonságokat hasonlítjuk össze.

II. táblázat  
Növekedési tulajdonságok és morfológia

|    |                              | E2724.1                           | NRRL 12 170               |
|----|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 5  | Spóratartók                  | RA                                | RA                        |
|    | Spróraláncok                 | 10                                | 10                        |
|    | Spórák felülete <sup>1</sup> | sima                              | sima                      |
| 10 | Spórák alakja                | ovális                            | ovális                    |
|    | ISP # 2                      | G <sup>2</sup> jó                 | jó                        |
|    | R                            | 87. közepsárga <sup>3</sup>       | 87. közepsárga            |
|    | Am                           | jól fejlett, 263. fehér           | fejlett, 263. fehér       |
| 15 | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
|    | ISP # 3                      | G gyengén fejlett                 | gyengén fejlett           |
|    | R                            | 263. fehér                        | 263. fehér                |
|    | Am                           | gyengén fejlett, 263. fehér       | nyomokban                 |
| 20 | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
|    | ISP # 4                      | G rendkívül jól fejlett           | jól fejlett               |
|    | R                            | 87. közepsárga                    | 87. közepsárga            |
| 25 | Am                           | rendkívül jól fejlett, 263. fehér | gyengén fejlett           |
|    | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
|    | ISP # 5                      | G jó                              | jó                        |
| 30 | R                            | 86. l. sárga                      | 86. l. sárga              |
|    | Am                           | jól fejlett, 92. y. fehér         | nincs                     |
|    | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
|    | ISP # 7                      | G rendkívül jól fejlett           | jól fejlett               |
| 35 | R                            | 87. m. sárga                      | 87. m. sárga              |
|    | Am                           | rendkívül jól fejlett, 263. fehér | fejlett, 265. közepszürke |
| 40 | Bennett                      | Sp nincs                          | világosbarna              |
|    | G                            | gyengén fejlett                   | nincs növekedés           |
|    | R                            | 90. gy. sárga                     | ---                       |
|    | Am                           | nincs                             | ---                       |
|    | Sp                           | nincs                             | ---                       |
| 45 | Kalcium-maláta               | G jó                              | jó                        |
|    | R                            | 263. fehér                        | 92. y. fehér              |
|    | Am                           | jól fejlett, 263. fehér           | nincs                     |
|    | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
|    | Czapek                       | G jól fejlett                     | fejlett                   |
| 50 | R                            | 87. m. sárga                      | 87. m. sárga              |
|    | Am                           | rendkívül jól fejlett, 263. fehér | nyomokban                 |
|    | Sp                           | nincs                             | nincs                     |
| 55 | Glükóz-aszparagin            | G nincs                           | nincs                     |
|    | R                            | nincs                             | nincs növekedés           |
|    | Am                           | ---                               | ---                       |
|    | Sp                           | ---                               | ---                       |
| 60 |                              |                                   |                           |

## II. táblázat (folytatás)

|          | E2724.1 | NRRL 12 170                       |
|----------|---------|-----------------------------------|
| Paradi-  | G       | rendkívül jól fejlett             |
| csom-    |         | jól fejlett                       |
| paszta-  | R       | 92. y. fehér                      |
| zabliszt | Am      | rendkívül jól fejlett, 263. fehér |
|          | Sp      | nincs                             |

<sup>1</sup> = A spórák felületének ornamentációját elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

<sup>2</sup> = G: növekedés; R: a telepek hátoldala, vagy oldalaik; Am: légmecélium; Sp: oldódó színanyag.

<sup>3</sup> = A színek jeleit az ISCC-NBS színskála szerint adjuk meg (Kelly és Judd, The ISCC-NBS Centroid Color Charts Standard Sample No. 2106, „U.S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards, Washington, D. C. 20234).

## III. Táblázat

Antibiotikumérzékenység<sup>a, b</sup>

| Antibiotikum  | Koncentráció | Vizsgált vegyület   | E2724.1 | NRRL 12 170 |
|---------------|--------------|---------------------|---------|-------------|
| kloramfenikol | 30 µg        | nitrofenil-vegyület | +       | +           |
| eritromicin   | 15 µg        | makrolid            | tr      | tr          |
| Cefaloridin   | 30 µg        | β-laktám            | +       | +           |
| linkomicin    | 2 µg         | linkozaminid        | —       | —           |
| polimixin B   | 300 egység   | peptid              | tr      | tr          |
| streptomycin  | 10 µg        | aminoglükózid       | +       | +           |
| tetraciklin   | 30 µg        | tetraciklin         | +       | +           |
| vankomicin    | 30 µg        | glükopeptid         | +       | +           |

a = Az érzékenységet beoltott agarlemezre helyezett korongokkal határoztuk meg.

b = — rezisztens (nincs gátlási zóna)  
+ érzékeny (gátlási zóna látható)  
= tr érzékenység nyomai.

## IV. Táblázat

Szénforrás hasznosítás<sup>a, b</sup>

| Szénforrás                 | E2724.1 | NRRL 12 170 |
|----------------------------|---------|-------------|
| kontroll: nincs szénforrás | —       | —           |
| kontroll: glükóz           | +       | +           |
| L-arabinóz                 | —       | +           |
| D-fruktóz                  | +       | +           |
| D-galaktóz                 | +       | +           |
| i-inozit                   | +       | +           |
| D-mannit                   | —       | +           |
| raffinóz                   | —       | —           |
| szalicin                   | —       | —           |
| szaccharóz                 | +       | +           |
| D-xilóz                    | +       | +           |
| D-rhamnóz                  | —       | +           |

a — = nincs hasznosítás; + = hasznosítja.

b = Az International Streptomyces Project (ISP #9) (szénforrás hasznosítási agar) alaptáptalajon határoztuk meg, amihez szűrve sterilizett szénforrást adtunk minden esetben 1,0%-os mennyiségben. A lemezeket 30 °C-on tenyésztettük, és a 7–12. napon olvastuk le.

V. táblázat  
Egyéb élettani tulajdonságok

|    | E2724.1                                           | NRRL 12 170 |
|----|---------------------------------------------------|-------------|
| 5  | ISP#1 (kromogenitás)                              | —           |
|    | ISP#6 (kromogenitás)                              | —           |
|    | ISP#7 (kromogenitás)                              | —           |
|    | zselatin-elfolyósítás                             | —           |
| 10 | fölözött tej-reakció                              | +           |
|    | növekedés különböző pH-értékeken <sup>1, 2</sup>  | 6,1–8,8     |
|    | növekedés különböző hőmérsékleten <sup>1, 3</sup> | 10–37 °C    |
|    | nátrium-klorid tolerancia <sup>1, 4</sup>         | 8%          |
| 15 | keményítő-hidrolízis <sup>5</sup>                 | 4%          |
|    | nitrát-redukció                                   | +           |
|    | kataláz <sup>6</sup>                              | +           |
|    | foszfátáz <sup>6</sup>                            | +           |
|    | ureáz <sup>6</sup>                                | —           |

<sup>1</sup> = ISP#2 táptalajon (élesztő kivonat-malátá kivonat-agar); 7 napon át inkubálva.

<sup>2</sup> = 0,05 mólos, alábbi puffereket használtuk: citromsav, pH 3, 4, 5; 2-(N-morfolino)-etán-szulfonsav, pH 6; 3-(N-morfolino)-propán-szulfonsav, pH 7; N-2-hidroxi-etil-piperazin-N'-2-etán-szulfonsav, pH 8; 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propán-diol, pH 9; 3-ciklohexil-amino-1,1-propán-szulfonsav, pH 10, 11.

<sup>3</sup> = Az agarok pH-ját 7 napos inkubációt követően megmértük, mivel egyes pufferek nem tartották az eredetileg beállított pH-értéket. A puffer toxicitását oly módon vizsgáltuk, hogy az összes puffer pH-ját 7,0-ra állítottuk be, és vizsgáltuk a növekedést. Toxicitást nem figyeltünk meg.

<sup>4</sup> = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50 és 55 °C hőmérsékleten vizsgáltuk.

<sup>5</sup> = Az agarhoz nátrium-kloridot adtunk, 0, 2, 4, 6, 8, 10 és 12%-os koncentrációban.

<sup>6</sup> = A keményítő hidrolízisét szervesetlen só-keményítő-agaron (ISP#4) vizsgáltuk, oly módon, hogy a jelenlévő keményítőt jódval mutattuk ki.

<sup>7</sup> = Az enzim méréséhez Blazevec és Ederer módszerét használtuk (Blazevec és Ederer, Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology, John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1975).

40 Az előző tulajdonságok alapján a DMT- és dihidro-DMT-t termelő NRRL 12 170 mikroorganizmust a Streptomyces fradiae új törzsének határoztuk meg. A tenyészetet letétbe helyeztük a Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61 604 törzsgyűjteményébe, ahonnan ez NRRL 12 170 szám alatt hozzáférhető.

Ahogy az más mikroorganizmusoknál is előfordul, a Streptomyces fradiae NRRL 12 170 tulajdonságai variálnak. Így például az NRRL törzs mesterséges variánsai és mutánsai állíthatók elő oly módon, hogy a sejteket különböző ismert fizikai és kémiai mutagénnel kezeljük, például ultrabolya sugarakkal, X-sugarakkal, gamma-sugarakkal, és N-metil-N'-nitro-N-nitrozó-guanidinnal. A találmány oltalmi köréhez tartoznak a Streptomyces fradiae NRRL 12 170 összes természetes és mesterséges variánsai, mutánsai és rekombinánsai, amelyek termelik a DMT-t.

A DMT vegyületek gátolják a patogén baktériumok, különösen a Gram-pozitív festődésű baktériumok és a Mycoplasma fajok növekedését. A VI. táblázatban összefoglaljuk az ismert agar-higítási módszerrel meghatározott legkisebb növekedésgát-

ló koncentrációkat, amely koncentrációk mellett a DMT szabad bázis alakban gátolja bizonyos baktériumok növekedését.

VI. Táblázat

A DMT szabad bázis in vitro aktivitása

| Mikroorganizmus                 | Legkisebb növekedésgátló koncentráció (µg/ml) |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| Streptococcus pyogenes C203     | 0,25                                          |
| Streptococcus pneumoniae Park I | 0,13                                          |
| Streptococcus sp. (Group D) 282 | 0,5                                           |
| Staphylococcus aureus 3055      | 1,0                                           |
| Staphylococcus aureus 209P      | 0,25                                          |
| Pasteurella multocida           | 3,12                                          |
| Pasteurella hemolytica          | 12,5                                          |
| Mycoplasma gallisepticum        | 0,097                                         |
| Mycoplasma hyopneumoniae        | 0,195                                         |
| Mycoplasma hyorhinis            | 0,78                                          |

A találmány szerinti DMT-vegyületek in vivo baktériumellenes aktivitással rendelkeznek kísérleti bakteriális fertőzésekkor. Ha egereknek kísérleti fertőzéskor két dózisban adjuk a vizsgált vegyületeket, az aktivitást  $ED_{50}$ -értékben határozhatjuk meg (hatásos dózis mg/testsúlykilogrammban, amely a vizsgált állatok 50%-át megvédi: lásd Wick és munkatársai, J. Bacteriol., 81, 233–235, 1961). A VII.

táblázatban megadjuk a DMT és DMT-tartarát vizsgálatok kapott  $ED_{50}$ -értékeket.

VII. Táblázat

Az  $ED_{50}$ -értékek (mg/kg  $\times$  2) szubkután vagy orális adagolással

| Vegyület                         | Streptococcus pyogenes C203 |        | Streptococcus pneumoniae Park I |        | Staphylococcus aureus 3055 |        |
|----------------------------------|-----------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------------|--------|
|                                  | szubkután                   | orális | szubkután                       | orális | szubkután                  | orális |
| DMT-bázis                        | 2,2                         | 218    | 15,7                            | 66     | 2,7                        | 64     |
| DMT-tartarát                     | 2,3                         | 172    | $\leq 9,9$                      | 100    | NT*                        | NT     |
| Baktériumfertőzés (x $LD_{50}$ ) | 13                          | 11,3   | 3                               | 2,7    | 21                         | 26     |

\* = Nem vizsgáltuk.

20 A találmány szerinti DMT-vegyületek aktivitása a Mycoplasma-fajokkal szemben különösen értékes tulajdonság. A VIII. és IX. táblázatokban összefoglaljuk a DMT- és DMT-tartaráttal végzett kísérletek eredményeit, amelyek során indukált Mycoplasma gallisepticum fertőzéseket kezeltünk csirkékben. A vegyületeket az ivóvízben oldva adagoltuk 1–2 gramm/4,2 liter víz mennyiségben, 1–3 napon át, vagy testsúlykilogrammban számítva 15–30 mg-os mennyiségben, injekcióval.

VIII. Táblázat

Indukált Mycoplasma gallisepticum fertőzés kezelése csirkékben DMT-bázissal

| Vegyület           | Dózis                | Elpusztult állatok száma/összes állat száma | A légzési traktus sérülésével rendelkező állatok száma/összes állat száma | Átlagos súly (g) | M. gallisepticum antitesttel rendelkezők száma/összes állat száma |
|--------------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------|
| DMT-bázis          | 2,0 g/4,2 l; 1–3 nap | 9/30 (30%)                                  | 26/30 (86,7%)                                                             | 397              | 21/21 (100%)                                                      |
| DMT-bázis          | 1,0 g/4,2 l; 1–3 nap | 13/30 (43,3%)                               | 28/30 (93,3%)                                                             | 392              | 15/17 (88,2%)                                                     |
| DMT-bázis          | 15 mg/kg             | 10/30 (33,3%)                               | 24/30 (80%)                                                               | 453              | 20/20 (100%)                                                      |
| Fertőzött kontroll | ---                  | 19/30 (63%)                                 | 30/30 (100%)                                                              | 304              | 11/11 (100%)                                                      |

IX. Táblázat

Indukált Mycoplasma gallisepticum fertőzés kezelése csirkékben DMT-tartaráttal

| Vegyület           | Dózis                | Elpusztult állatok száma/összes állat száma | A légzési traktus sérülésével rendelkező állatok száma/összes állat száma | Átlagos súly (g) | M. gallisepticum antitesttel rendelkezők száma/összes állat száma |
|--------------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------|
| DMT-tartarát       | 2,0 g/4,2 l; 1–3 nap | 0/30 (0%)                                   | 13/30 (43,3%)                                                             | 458              | 17/30 (56,7%)                                                     |
| DMT-tartarát       | 1,0 g/4,2 l; 1–3 nap | 2/30 (6,7%)                                 | 22/29 (75,9%)                                                             | 354              | 27/28 (96,4%)                                                     |
| DMT-tartarát       | 30 mg/kg             | 10/30 (33,3%)                               | 27/30 (90%)                                                               | 330              | 16/20 (80%)                                                       |
| Fertőzött kontroll | ---                  | 15/30 (50%)                                 | 30/30 (100%)                                                              | 231              | 15/15 (100%)                                                      |

A baromfiak Mycoplasma fertőzéseinek megakadályozására vagy kezelésére a DMT-vegyületek egyikének nem-toxikus mennyiségét orálisan vagy parenterálisan adagoljuk a szárnyasoknak. A DMT-vegyületeket előnyösen gyógyszerészeti szempontból elfogadható vivőanyaggal, például vízzel együtt adagoljuk az állatoknak.

A X. táblázatban összefoglaljuk a DMT akut toxicitásának adatait. A vizsgálatok során 4–5 hetes Harlan ICR egereket használtunk. A közepes letális dózist ( $LD_{50}$ ) a DMT esetén határoztuk meg orális, szubkután, intravénás és intraperitoneális adagolással.

X. Táblázat  
A DMT akut toxicitása

| Adagolás módja | LD <sub>50</sub> (mg/kg) |           |
|----------------|--------------------------|-----------|
|                | Hímek                    | Nőstények |
| p.o.           | –                        | 5000      |
| s.c.           | –                        | 5447      |
| i.v.           | 100                      | 186       |
| i.p.           | 721                      | 325       |

Abban az esetben, ha melegvérű állatok betegségét kezeljük, úgy a találmány szerinti vegyületeket állatorvosi készítmények alakjában adagoljuk. A találmány tárgya egyrészt eljárás állatorvosi készítmény előállítására, amely készítmény aktív összetevőként egy (I) általános képletű vegyületet, vagy ennek gyógyszerészeti szempontból elfogadható sóját vagy észterét tartalmazza, legalább egy, semleges vivőanyaggal együtt.

A témában jártas szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy ezen készítményekben használt vivőanyagok természete hasonló lehet a tilozin esetében használt vivőanyagokhoz.

A találmány szerinti eljárást a továbbiakban példákkal szemléltetjük.

#### 1. példa

A) A DMT előállítása a rázott lombikban kivitelezett fermentációval

A *Streptomyces fradiae* NRRL 12 170 liofilezett tenyészetét 1–2 ml steril vízbe szuszpendáljuk. 0,5 ml szuszpenzióval 150 ml alábbi összetételű vegetatív táptalajt oltunk:

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| kukoricalekvár        | 1,0 %   |
| élesztő kivonat       | 0,5 %   |
| szójabab dara         | 0,5 %   |
| kalcium-karbonát      | 0,3 %   |
| szójabab olaj (nyers) | 0,45 %  |
| ionmentes víz         | 97,25 % |

Eljárhatunk oly módon is, hogy az *S. fradiae* NRRL 12 170 vegetatív tenyészetének 1 ml-ét, amelyet előzőleg folyékony nitrogénben tároltunk, felolvasztunk, és ezzel oltjuk a vegetatív táptalajt. A beoltott vegetatív táptalajt 500 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikokban tenyésztjük 29 °C hőmérsékleten, 48 órán át, percenként 300-at forduló, zárt rázógéppben.

A kinőtt vegetatív táptalaj 0,5 ml-ével 7 ml alábbi összetételű termelő táptalajt oltunk:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| répamelasz                  | 2,0 %   |
| kukoricaliszt               | 1,5 %   |
| halliszt                    | 0,9 %   |
| kukoricadara                | 0,9 %   |
| nátrium-klorid              | 0,5 %   |
| diammónium-hidrogén-foszfát | 0,04 %  |
| kalcium-karbonát            | 0,2 %   |
| szójabab olaj (nyers)       | 3,0 %   |
| ionmentes víz               | 91,36 % |

A beoltott fermentációs táptalajt 50 ml térfogatú lombikokban tenyésztjük 29 °C hőmérsékleten, 6 napon át, percenként 300-at forduló, zárt rázógéppben.

B) A DMT előállítása tankfermentorban  
Nagy térfogatú inokulum előállítására az A) pontban megadottak szerint 1200 ml kinőtt vegetatív táptalajjal 4300 liter második fázisú vegetatív táptalajt oltunk, amelynek összetétele a következő:

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| kukoricalekvár        | 1,0 %    |
| szójaliszt            | 0,5 %    |
| élesztő kivonat       | 0,5 %    |
| kalcium-karbonát      | 0,3 %    |
| szójabab olaj (nyers) | 0,5 %    |
| lecitin (nyers)       | 0,015 %  |
| víz                   | 97,185 % |

A táptalaj pH-ját 50%-os nátrium-hidroxid-oldattal 8,5-re állítjuk be. Ezt a második fázisú vegetatív tenyészetet 1500 liter térfogatú fermentorban inkubáljuk 48 órán át 28 °C hőmérsékleten, levegőztetés és keverés közben.

Körülbelül 700 liter második fázisú tenyészettel 4300 liter térfogatú steril, termelő táptalajt oltunk, aminek az alábbi az összetétele:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| halliszt                    | 0,875 % |
| kukoricaliszt               | 1,5 %   |
| kukoricadara                | 0,875 % |
| kalcium-karbonát            | 0,2 %   |
| nátrium-klorid              | 0,5 %   |
| diammónium-hidrogén-foszfát | 0,04 %  |
| répamelasz                  | 2,0 %   |
| szójaolaj (nyers)           | 3,0 %   |
| lecitin                     | 0,09 %  |
| víz                         | 91,32 % |

A táptalaj pH-ját 50%-os nátrium-hidroxid-oldattal 7,2-re állítjuk be.

A beoltott termelő táptalajt 9000 liter térfogatú fermentorban tenyésztjük 8–9 napon át, 28 °C hőmérsékleten. A fermentációs táptalajba steril levegőt vezetünk át olyan mennyiségben, hogy az oldott oxigén koncentrációja 30% és 50% között legyen, a táptalajt továbbá percenként 250-et forduló, hagyományos keverővel keverjük.

#### 2. példa A DMT izolálása

Az 1. példában megadottak szerint előállított 3800 l teljes fermentlevet szűrjük, szűrési segédanyag jelenlétében. Vízzel mossuk a micéliumot, és a vizes mosófolyadékot hozzáadjuk a szűrlethez.

50%-os, vizes nátrium-hidroxid-oldat 9,5 l-ével 9,2-re állítjuk be a szűrlet pH-ját, ezután 2000 l etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos extraktumhoz 450 l ionmentes vizet és 6,4 kg nátrium-hidrogén-foszfátot adunk, a kapott elegyet erőteljesen keverjük. Az oldat pH-ját 3300 ml, 33%-os foszforsav-oldattal 6,0-ról 4,35-re állítjuk be. A vizes fázist elkülönítjük. Az elkülönített vizes fázis pH-ját 700 ml 50%-os, vizes nátrium-hidroxid-oldattal 6,5-re állítjuk be.

Az így kapott oldatot csökkentett nyomáson 225 l térfogatra töményítjük. A sűrítmény pH-ját 16 l 10%-os, vizes, nátrium-hidroxid-oldattal 9,2-re állítjuk be. A kapott lúgos oldatot egy éjszakán át állni hagyjuk. Az oldatból kivált kristályokat szűrővel elkülönítjük, 50 l ionmentes vízzel mossuk,

majd szárítjuk, ami után 8,6 kg terméket kapunk. A termék 3 kg-ját acetone és víz elegyből kikristályosítjuk, ezután 2,07 kg DMT szabad bázist kapunk.

A DMT 132 °C hőmérsékleten lágyul, és 150 °C hőmérsékleten lassan olvad. A DMT elemvizsgálata a következő: szén: 65%; hidrogén: 8,5%; nitrogén: 2%; oxigén: 28%. A DMT tapasztalati képlete:  $C_{38}H_{63}NO_{13}$ , molekulásúlya: 742 (a tömegspektrometriás mérés szerint: 741).

A DMT szabad bázis kloroformos oldatban vizsgált infravörös abszorpciós spektrumában maximumok figyelhetők meg. A maximumok az alábbi frekvencián láthatók ( $cm^{-1}$ ): 3634 (kicsiny), 3559 (váll), 3423 (széles), 2955 (intenzív), 2907 (intenzív), 1710 (intenzív), 1676 (váll), 1588 (intenzív), 1447 (váll), 1396 (váll), 1359 (kicsiny), 1309 (kicsiny), 1178 (váll), 1156 (intenzív), 1111 (váll), 1072 (váll), 1048 (intenzív), 1013 (váll), 984 (váll), 926 (kicsiny), 898 (kicsiny), és 833 (kicsiny).

A DMT ultraibolya abszorpciós spektrumában semleges etanolos oldatban vizsgálva a 283 nm-es hullámhosszon látunk elnyelési maximumot ( $\epsilon$ : 22,296;  $E_{1cm}^{1\%}$ : 300,9).

A DMT szabad bázis az alábbi specifikus forgatással rendelkezik:  $[\alpha]_D^{25}$ : -53,5° (konc.: 1, metanolban).

A DMT 66%-os, vizes dimetil-formamidos oldatban vizsgált elektrometrikus titrálás szerint 7,25 pK<sub>a</sub>-értékkel jellemezhető titrálható csoporttal rendelkezik.

A DMT bázis vízben oldódik, oldódik továbbá a legtöbb poláris, szerves oldószerben, például acetoneban, metanolban, etanolban, kloroformban, dimetil-formamidban és dimetil-szulfoxidban. A DMT savaddíciós sói vízben jobban oldódnak, mint maga a DMT bázis.

A DMT papír- és vékonyréteg-kromatográfiával megkülönböztethető a tilozintól, és más, ismert tilozin-komponensektől. A XI. és XII. táblázatban összefoglaljuk a DMT és a különböző tilozin-komponensek  $R_f$ - és  $R_x$ -értékeit. A XII. táblázatban megadott  $R_x$ -értékek a tilozin elmozdulásához viszonyított értékeket jelentik, a tilozin elmozdulását 1,0-nak véve. A vegyületek kimutatását *Bacillus subtilis* bioautográfiával végeztük.

XI. Táblázat

A DMT<sup>a</sup> vékonyréteg-kromatográfiás adatai

| Vegyület   | $R_f$ -érték   |      |      |
|------------|----------------|------|------|
|            | A <sup>b</sup> | B    | C    |
| tilozin    | 0,53           | 0,53 | 0,67 |
| DMT        | 0,45           | 0,52 | 0,61 |
| dezmikozin | 0,47           | 0,24 | 0,17 |
| makrozin   | 0,23           | 0,49 | 0,60 |
| relomicin  | 0,34           | 0,51 | 0,63 |

<sup>a</sup> = Merck, Darmstadt – szilikagél 60

<sup>b</sup> = oldószer-elegy: A: etil-acetát és dietil-amin 96 : 4 arányú elegy

B: acetone és etanol 2 : 1 arányú elegy

C: kloroform és metanol 3 : 1 arányú elegy

XII. Táblázat  
A DMT papír-kromatográfiás vizsgálata

| 5  | Vegyület   | $R_x$          |      |
|----|------------|----------------|------|
|    |            | D <sup>a</sup> | E    |
|    | tilozin    | 1,0            | 1,0  |
|    | DMT        | 0,76           | 0,95 |
| 10 | dezmikozin | 0,22           | 0,83 |
|    | makrozin   | 0,43           | 0,87 |
|    | relomicin  | 0,63           | 1,0  |

<sup>a</sup> = Papír: Whatman No. 1, amit 0,75 mólos kálium-dihidrogén-foszfát pufferrel kezeltünk 4,0 pH-n, majd szárítottunk.

<sup>b</sup> = Oldószer-elegy: D: vízzel telített etil-acetát  
E: vízzel telített n-butanol.

A 3, 4, 6. és 7. példa célja tájékoztatás.

20

### 3. példa

#### Az OMT izolálása

A 2. példában megadottak szerint előállított DMT-t hig hidrogén-klorid-oldatban oldjuk (addig adunk sósavat a vízhez, míg az oldat pH-ja 1,8 lesz). A kapott oldatot 24 órán át szobahőmérsékleten hagyjuk állni, majd pH-ját nátrium-hidroxiddal 9,0-ra állítjuk be. A lúgos oldatot etil-acetáttal, diklór-metánnal vagy kloroformmal extraháljuk. Az extraktumot csökkentett nyomáson desztilláljuk, ami után megkapjuk az OMT-t.

35

### 4. példa

#### Az OMT izolálása

A 2. példában megadottak szerint előállított DMT 500 g-ját malomban porítjuk és 1,5 l ionmentes vízhez adjuk. 20%-os kénsav szükség szerinti adagolásával 3,5 és 7,5 között tartjuk az oldat pH-ját. 30 perc múlva az összes DMT feloldódik. Ezután 1,4-re állítjuk be az oldat pH-ját, és 22 °C hőmérsékleten, 42 órán át hagyjuk állni. Ismert módon feldolgozva az oldatot, 366 g OMT-t kapunk, a termék azonosságát ismert mintával összehasonlítva vékonyréteg-kromatográfiával bizonyítjuk. Az ismert mintát a 3 459 853 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint állítjuk elő.

50

### 5. példa

#### A dihidro-DMT előállítása

A 2. példában megadottak szerint előállított DMT 50 mg-ját 25 ml 40%-os, vizes izopropil-alkoholban oldjuk. Ugyanakkor 10 ml 30%-os, vizes izopropil-alkoholban 20 mg nátrium-bórhidridet oldunk. 1 ml nátrium-bórhidrid-oldatot adunk a DMT-t tartalmazó oldathoz. 5 percen át keverjük a reakcióelegyet, pH-ját foszforsavval 7,5-re állítjuk be, majd az izopropil-alkohol eltávolítására csökkentett nyomáson desztilláljuk. Ezután vizet adunk a vizes sűrítmenyhez, a 25 ml térfogatú ol-

65

dathoz 50 ml kloroformot adunk. A vizes fázis pH-ját 7,5-re állítjuk be. Extrakciót követően elkülönítjük a kloroformot, és csökkentett nyomáson desztillálva eltávolítjuk, ami után desztillációs maradékként dihidro-DMT-t kapunk.

#### 6. példa

##### A dihidro-OMT előállítása

Az 5. példában megadottak szerint előállított dihidro-DMT-t a 3. példában megadott módon reagáltatjuk, amikor dihidro-OMT-t kapunk.

#### 7. példa

##### Az OMT előállítása más módon

A DMT-ből OMT-t állítunk elő oly módon, hogy a DMT-t abban a tenyészlében reagáltatjuk, amelyben azt előállítottuk. A reakciót a 3. példában megadott módon, enyhén savas körülmények között végezzük. Az OMT izolálását a 2. példában, a DMT-re vonatkozóan megadottak szerint végezzük.

#### 8. példa

##### A 2'-O-Acetil-DMT előállítása

260 ml acetonban 10 g (13,5 mmól) DMT-t oldunk, az oldathoz 1,6 ml (15,7 mmól) ecetsav-anhidridet adunk cseppenként, miközben szobahőmérsékleten keverjük a reakcióelegyet. 18 órán át folytatjuk a keverést, majd csökkentett nyomáson eltávolítjuk az oldószert. A desztillációs maradékot 200 ml etil-acetátban oldjuk, és telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal extraháljuk (2 × 200 ml-rel). A szerves, oldószeres oldatot elkülönítjük, nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük és desztilláljuk. A desztillációs maradékot kevés etil-acetátban oldjuk, az oldatot szilikagélből (Waters Prep. 500) készült oszlopon kromatografáljuk, az eluálást 4 l etil-acetáttal végezve. Az előállítandó terméket tartalmazó frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáljuk, a megfelelő frakciókat egyesítjük és szárazra desztilláljuk. Ily módon 6,5 g (61%) 2'-O-acetil-DMT-kapunk. FDMS (térdeszorpciós tömegspektrum): m/e 783 (P<sup>+</sup>O), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ : 283 nm ( $\epsilon = 19\,300$ ), NMR-spektrum: 2,08 (s, acetyl)

#### 9. példa

##### A 2'-O-propionil-DMT előállítása

Az előzőekhez hasonló módon 6,0 g (8,5 mmól) DMT-t oldunk 120 ml acetonban, és 1,2 l (9,2 mmól) propionsav-anhidriddel reagáltatjuk. A feldolgozást és kromatográfiát követően 3,7 g (57%) 2'-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 797 (P<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ : 282 nm ( $\epsilon = 19\,500$ ), NMR-spektrum: 1,26 (t) és 2,40 (g) (propionil).

#### 10. példa

##### A 2',23-di-O-acetil-DMT előállítása

90 ml metilén-klorid és 7,8 ml piridin elegyében 3 g (4,05 mmól) DMT-t oldunk, az elegyhez cseppenként, keverés közben és szobahőmérsékleten 1,4 ml (13,7 mmól) ecetsav-anhidridet adunk. 17 órán át keverjük a reakcióelegyet, ami után 15 ml toluollal hígítjuk, majd csökkentett nyomáson eltávolítjuk az oldószereket. A desztillációs maradékot kevés etil-acetátban oldjuk, az oldatot szilikagélből (Waters Prep 500) készült oszlopon kromatografáljuk, az eluálást 4 l etil-acetáttal végezve. Ily módon 2,1 g nyerstelemeket kapunk. Ezt a lehető legkisebb mennyiségű toluolban oldjuk, az oldatot 300 ml szilikagélből készült oszlopon gyors kromatográfiával tisztítjuk, az eluálást toluol és etil-acetát 3 : 1 arányú elegyének 300 ml-ével, toluol és etil-acetát 5 : 4 arányú elegyének 600 ml-ével, majd toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyének 1000 ml-ével végezzük. A terméket tartalmazó frakciókat vékonyréteg-kromatográfiás analízissel határozzuk meg, a megfelelő frakciókat egyesítjük és szárazra desztilláljuk, amikor desztillációs maradékként 1,7 g (64%) 2',23-di-O-acetil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 826 (P + H<sup>+</sup>). UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ : 280 nm ( $\epsilon = 19\,500$ ), NMR-spektrum: 2,06 és 2,08 (s, 2-acetyl)

#### 11. példa

##### A 2',23-di-O-propionil-DMT előállítása

90 ml metilén-klorid és 7,8 ml piridin elegyében 3 g (4,05 mmól) DMT-t oldunk, az oldathoz 1,8 ml (13,8 mmól) propionsav-anhidridet adunk cseppenként, keverés közben, szobahőmérsékleten. 1 éjszakán át keverjük a reakcióelegyet, ezután 15 ml toluolt adunk hozzá, és csökkentett nyomáson desztilláljuk az elegyet. A desztillációs maradékot 20 ml toluolban oldjuk, az oldatot szilikagélből (Merck 60, 300 ml) készült oszlopon kromatográfiával tisztítjuk, az eluálást toluol és etil-acetát 3 : 1 arányú elegyének 300 ml-ével, toluol és etil-acetát 5 : 4 arányú elegyének 300 ml-ével, végül toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyének 1000 ml-ével végezzük. Ily módon 2,5 g (72%) 2',23-di-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS m/e: 854 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ : 279 nm ( $\epsilon = 20\,800$ ), NMR-spektrum: 1,15 és 1,2 (t, 2-propionil)

#### 12. példa

##### 2'-O-acetil-23-O-propionil-DMT előállítása

180 ml metilén-klorid és 15 ml piridin elegyében 6 g (7,7 mmól) 2'-O-acetil-DMT-t oldunk, az oldathoz cseppenként, keverés közben, szobahőmérsékleten 1,2 ml (9,2 mmól) propionsav-anhidridet adunk. 17 órán át keverjük a reakcióelegyet, az elegyhez ezután 300 ml toluolt adunk, és csökkentett nyomáson szárazra desztilláljuk. A desztillációs maradékot toluolban oldjuk, és telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal extraháljuk. Elkülönítjük a toluolos fázist, nátrium-szulfáttal vízmente-

sítjük, szűrjük és desztilláljuk. A desztillációs maradékot kevés toluolban oldjuk, az oldatot 300 ml szilikagélből készült oszlopon kromatografáljuk. Az oszlopot toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyével töltjük meg, az eluálást toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyének 1000 ml-ével végezzük. A vékonyréteg-kromatográfiás analízis szerint az előállítandó terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és csökkentett nyomáson desztilláljuk, ami után desztillációs maradékként 4,5 g (70%) 2'-O-acetil-23-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 840 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  280 nm ( $\epsilon = 21\,500$ ), NMR-spektrum: 2,08 (s, acetil), 1,15 (t) és 2,35 (q) (propionil)

## 13. példa

## A 2'-O-propionil-23-O-acetil-DMT előállítása

Az előzőekhez hasonló módon, 45 ml metilén-kloridban és 3,9 ml piridinben 1,5 g (2 mmól) 2'-O-propionil-DMT-t oldunk, és az elegyet 0,3 ml (2,9 mmól) ecetsav-anhidriddel reagáltatjuk. A terméket szilikagélből (Waters Prep 500) készült oszlopon kromatografáljuk, ami után 0,81 g 2'-O-propionil-23-O-acetil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 840 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  279 nm ( $\epsilon = 19\,700$ ), NMR-spektrum: 2,07 (s, acetil), 1,17 (t) és 2,33 (q) (propionil)

## 14. példa

## A 2'-O-acetil-23-O-fenil-acetil-DMT előállítása

75 ml metilén-klorid és 0,8 ml piridin elegyében 2,75 g (3,5 mmól) 2'-O-acetil-DMT-t oldunk, az oldathoz 0,56 ml (3,5 mmól) fenil-acetil-kloridot adunk 13 ml metilén-kloridban cseppenként, keverés közben, szobahőmérsékleten. 1,5 óra múlva további 0,56 ml, 13 ml metilén-kloridban oldott fenil-acetil-kloridot adunk a reakcióelegyhez. 1,5 óra múlva a vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat szerint a kiindulási vegyület elfogyott. Ekkor csökkentett nyomáson szárazra desztilláljuk az elegyet, a desztillációs maradékot metilén-kloridban oldjuk, és telített nátrium-hidrogén-karbonátdal extraháljuk. A szerves oldószeres fázist nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük és szárazra desztilláljuk. A desztillációs maradékot toluolban oldjuk, és szilikagélből (Waters Prep 500) készült oszlopon kromatografáljuk. Az eluálást lineáris grádienssel végezzük, toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyének 4 l-ével, és etil-acetát 4 l-ével.

A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és desztilláljuk, desztillációs maradékként 1,1 g (35%) 2'-O-acetil-23-O-fenil-acetil-DMT-t kapunk. A korábbi frakciókból 0,86 g (24%) 2'-O-acetil-23,4"-di-O-fenil-acetil-DMT-t nyerünk. FDMS: m/e 901 (P<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  280 nm ( $\epsilon = 20\,400$ ) és 204 nm ( $\epsilon = 14\,000$ ), NMR-spektrum: 7,23 (m, fenil), 3,62 (s, benzil), 2,08 (s, acetil).

## 15. példa

## A 23-O-propionil-DMT előállítása

80 ml 95%-os metanolban 1,6 g (1,9 mmól) 2'-O-acetil-23-O-propionil-DMT-t oldunk, az oldatot szobahőmérsékleten 42 órán át keverjük. Ezután csökkentett nyomáson szárazra desztilláljuk az oldatot. A desztillációs maradékot kevés toluolban oldjuk, az oldatot szilikagélből (Merck 60, 200 ml) készült oszlopon kromatografáljuk, az eluálást toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyének 2 l-ével végezzük. A vékonyréteg-kromatográfiás analízis szerint a terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és csökkentett nyomáson desztilláljuk, ami után 1,2 g (79%) 23-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 793 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  280 nm ( $\epsilon = 17\,700$ ), NMR-spektrum: 1,14 (t) és 2,36 (q) (propionil)

## 16. példa

## A 23-O-fenil-acetil-DMT előállítása

50 ml 80%-os vizes metanolban 0,6 g (0,60 mmól) 2'-O-acetil-23-fenil-acetil-DMT-t oldunk, az oldatot 4,5 órán át visszafolyató hűtő alatt enyhén forraljuk. Szobahőmérsékletre hűtjük az elegyet, és csökkentett nyomáson szárazra desztilláljuk, így módon 0,39 g (68%) 23-O-fenil-acetil-DMT-t kapunk. FDMS m/e 860 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  281 nm ( $\epsilon = 20\,600$ , végabszorpció), NMR-spektrum: 7,26 (m, fenil), 3,61 (s, benzil).

## 17. példa

## A 23,4"-di-O-fenil-acetil-DMT előállítása

30 ml 80%-os, vizes metanolban 0,36 g (0,36 mmól) 2'-O-acetil-23,4"-di-O-fenil-acetil-DMT-t oldunk, az oldatot 4,5 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Szobahőmérsékletre hűtjük a reakcióelegyet, és csökkentett nyomáson szárazra pároljuk, amikor desztillációs maradékként 0,29 g (84%) 23,4"-di-O-fenil-acetil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 978 (P + H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  281 nm ( $\epsilon = 20\,100$ ) és 204 nm ( $\epsilon = 20\,000$ , váll), NMR-spektrum: 7,22–7,34 (m, 2-fenil), 3,63 és 3,72 (s, 2-benzil).

## 18. példa

## A 2'-O-acetil-3,23,4"-tri-O-propionil-DMT előállítása

40 ml acetone és 8 ml piridin elegyében 2 g (2,6 mmól) 2'-O-acetil-DMT-t oldunk, az oldathoz cseppenként, keverés közben, szobahőmérsékleten 20 ml acetonnal elegyített 40 ml propionsav-anhidridet adunk. 5 napon át keverjük a reakcióelegyet, majd ezt követően csökkentett nyomáson desztilláljuk. A desztillációs maradékként kapott olajos anyagot etil-acetátban oldjuk, és az oldatot telített nátrium-hidrogén-karbonáttal extraháljuk. A szerves oldószeres fázist elkülönítjük, nátrium-szulfát-

tal vízmentesítjük, szűrjük és desztilláljuk. A desztillációs maradékot kevés toluolban oldjuk, és szilikagélből (Waters Prep 500) készült oszlopon kromatografáljuk. Az oszlopot lineáris gradienssel eluáljuk, a gradienst 4 l toluollal és 4 l etil-acetáttal készítjük. Az előállítandó terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és desztilláljuk, így módon 1,4 g (57%) 2'-O-acetil-3,23,4"-tri-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 951 (P<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  278 nm ( $\epsilon = 22\,000$ ), NMR-spektrum: 2,06 (s, acetil), 1,1 (m, 3-propionil).

#### 19. példa

##### A 3,23,4"-tri-O-propionil-DMT előállítása

55 ml 80%-os, vizes metanolban 0,7 g (0,74 mmól) 2'-O-acetil-3,23,4"-tri-O-propionil-DMT-t oldunk, az oldatot 5 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Lehűtjük a reakcióelegyet, és csökkentett nyomáson vizes, desztillációs maradékig desztilláljuk. A desztillációs maradékot metilén-kloriddal extraháljuk, elkülönítjük a szerves oldószert, nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük, csökkentett nyomáson szárazra desztilláljuk, amikor 0,38 g (56%) 3,23,4"-tri-O-propionil-DMT-t kapunk. FDMS m/e 910 (P+H<sup>+</sup>), UV-spektrum  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  277 nm ( $\epsilon = 22\,300$ ), NMR-spektrum: 1,1-1,2 (m, 3-propionil)

#### 20. példa

##### A 2,4"-23-tri-O-acetil-DMT előállítása

150 ml piridinben 10,0 g (13,5 mmól) DMT-t oldunk, az oldathoz keverés közben, szobahőmérsékleten 5,8 ml (60,7 mmól) ecetsav-anhidridet adunk. 1 éjszakán át keverjük a reakcióelegyet, az oldószert ezután csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A desztillációs maradékként kapott olajat diklór-metánban oldjuk, és telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal extraháljuk. A szerves oldószert fázist elkülönítjük, nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük, és csökkentett nyomáson desztilláljuk. A desztillációs maradékként kapott terméket szilikagélből (Waters Prep 500) készült oszlopon keresztül kromatografáljuk, eluensként lineáris gradienst használunk, ezt toluol és etil-acetát 3 : 1 arányú elegyének 4 l-éből, és etil-acetát 4 l-éből állítjuk elő. A vékonyréteg-kromatográfiás analízis szerint az előállítandó terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és csökkentett nyomáson desztilláljuk, ami után 4,5 g 2',4"-23-tri-O-acetil-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 868 (P+H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  280 nm, ( $\epsilon = 21\,100$ ), NMR-spektrum: 2,06 (s, 2-acetil), 2,09 (s, 1-acetil).

#### 21. példa

##### A 2'-O-acetil-23-O-fenoxi-acetil-DMT előállítása

75 ml diklór-metán és 0,8 ml piridin elegyében 2,75 g (3,5 mmól) 2'-O-acetil-DMT-t oldunk, az oldathoz cseppenként, keverés közben, szobahő-

mérsékleten 1,2 ml (8,8 mmól) 25 ml diklór-metánban oldott fenoxi-acetil-kloridot adunk. Egy óra múlva 200 ml telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldathoz öntjük a reakcióelegyet, elkülönítjük a szerves oldószert fázist, nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük és csökkentett nyomáson desztilláljuk. A desztillációs maradékként kapott, szilárd halmazállapotú habot szilikagélből készült oszlopon kromatografáljuk, a terméket toluol és etil-acetát 1 : 1 arányú elegyével eluáljuk. Az 1,5 g mennyiségű 2'-O-acetil-23-O-fenoxi-acetil-DMT-t 0,55 g 2'-O-acetil-23,4"-di-O-fenoxi-acetil-DMT-vel és 0,03 g 2'-O-acetil-3,23-di-O-fenoxi-acetil-DMT-vel együtt izoláljuk. FDMS: m/e 918 (P+H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  276 ( $\epsilon = 22\,500$ ), 214 nm ( $\epsilon = 9000$ ). NMR-spektrum: 6,9-7,3 (m, fenil), 4,65 (s, fenoxi-metil), 2,06 (s, acetil).

#### 22. példa

##### A 2'-O-acetil-23-O-(p-klór-fenil-acetil)-DMT előállítása

150 ml tetrahidro-furánban 4,3 g (25 mmól) p-klór-fenil-ecetsavat és 3,4 g (25 mmól) 1-hidroxibenzotriazolt oldunk. Jégfürdőben lehűtjük az elegyet, és 5,2 g (25,3 mmól) diciklo-hexil-karbodiimidet adunk hozzá. 3 órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük a reakcióelegyet, majd egy éjszakán át hűtőszekrényben tároljuk. Reggel szűrjük a reakcióelegyet, a szűrletet csökkentett nyomáson desztilláljuk. A desztillációs maradékot 75 ml acetonban oldjuk, az oldatot szűrjük és 10 g (12,8 mmól) 2'-O-acetil-DMT-t és 0,87 g (12,8 mmól) imidazolt adunk hozzá. 125 ml-re egészítjük ki az oldat térfogatát aceton adagolásával, ezután 1,87 ml (12,8 mmól) trietil-amint adagolunk. 20 órán át szobahőmérsékleten keverjük a reakcióelegyet, ezt követően csökkentett nyomáson eltávolítjuk az oldószert, és a desztillációs maradékot szilikagélből készült oszlopra töltjük. A terméket gradiens eluációval eluáljuk, a gradienst toluol és etil-acetát 4 : 1 arányú elegyből, és etil-acetáttal készítjük. Így módon 4,75 g 2'-O-acetil-23-O-(p-klór-fenil-acetil)-DMT-t kapunk. FDMS: m/e 936 (P+H<sup>+</sup>), UV-spektrum:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  280 ( $\epsilon = 19\,000$ ), 219 ( $\epsilon = 16\,000$ ), NMR-spektrum: 7,2-7,3 (m, fenil), 3,6 (s, p-klór-benzil), 2,06 (s, acetil).

#### Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás (I) általános képletű makrolid antibiotikumok és ezek 1-5 szénatomos alkanoil-, fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-, fenoxi-(1-4 szénatomos)-alkanoil- és halogén-fenil-(1-4 szénatomos)-alkanoil-észtereinek előállítására, ahol

Q jelentése —CH<sub>2</sub>OH vagy —CHO csoport - azzal a feltétellel, hogy ha a molekula 3-helyzetében O-acetilcsoport van, a 4"-helyzet O-izovalerilcsoporttól eltérő -, azzal jellemezve, hogy

a) Streptomyces fradiae NRRL 12 170 mikroorganizmust szüllesztett, levegőztetett körülmények között tenyésztünk, a keletkezett terméket elvá-

lasztjuk és kívánt esetben redukálószerrel kezeljük, vagy

b) olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol Q —CH<sub>2</sub>OH csoport, olyan (I) általános képletű vegyületet, ahol Q jelentése —CHO csoport, redukálószerrel kezelünk,

és kívánt esetben egy a) vagy b) eljárás szerint kapott (I) általános képletű vegyületet a tárgyi körben megadott acilcsoportokat tartalmazó acilezőszerrel kezelünk.

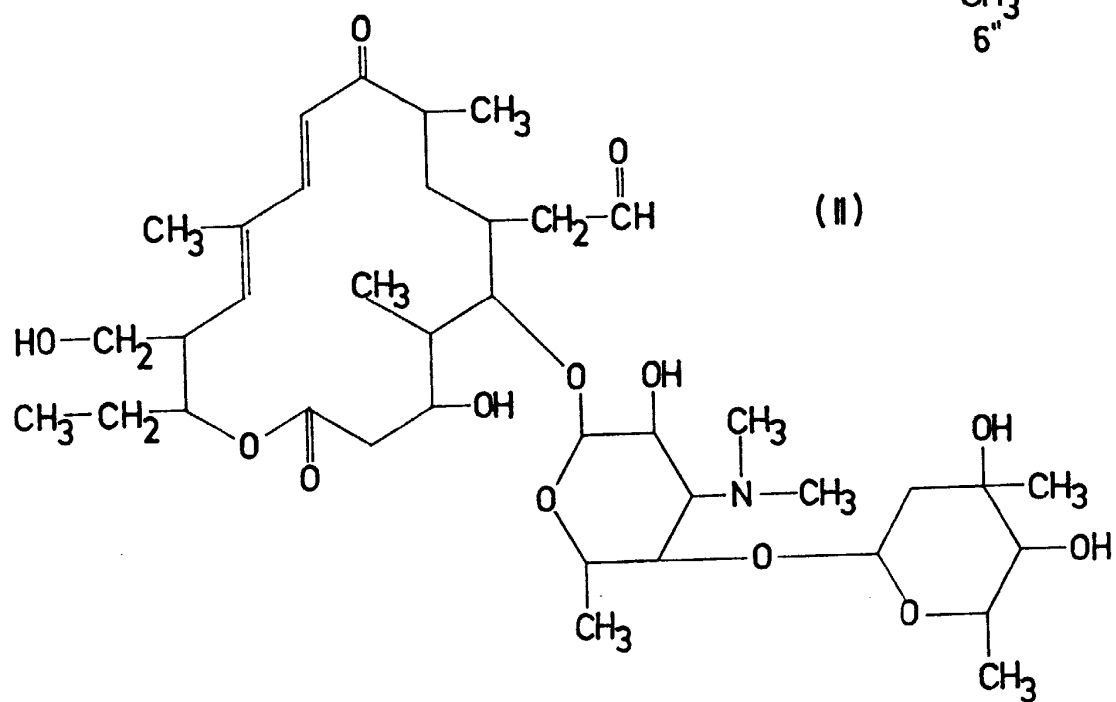
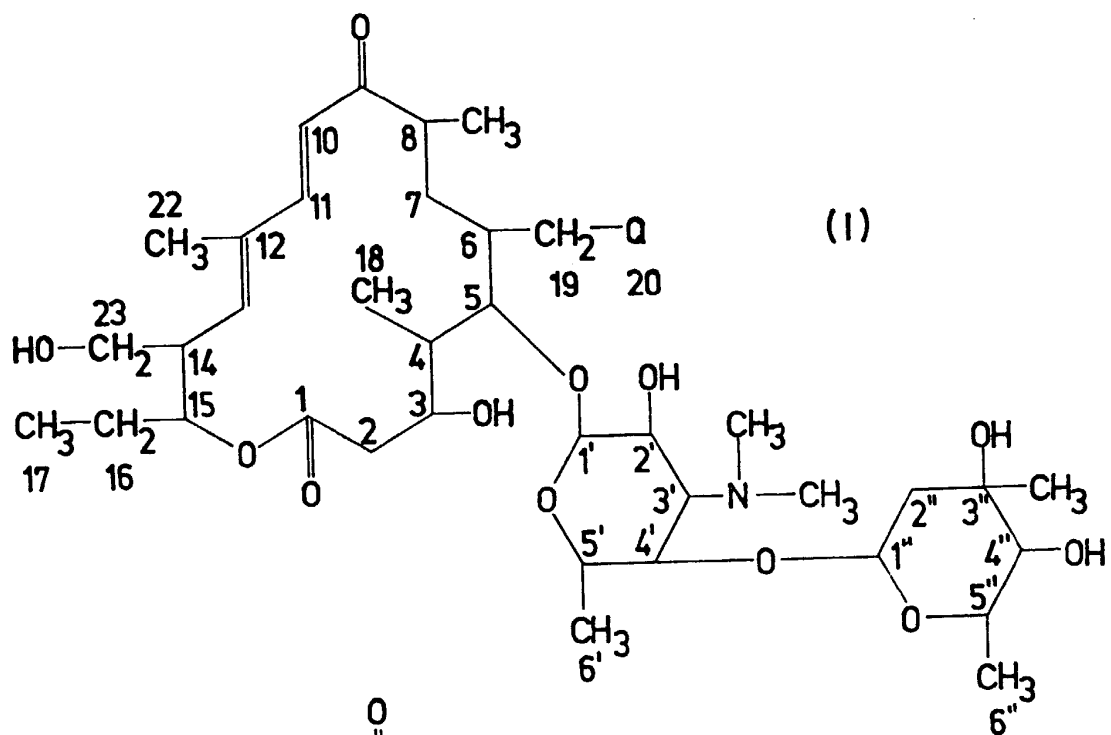
2. Eljárás állatgyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 1. igénypont szerint előállított (I) általános képletű antibiotikumot, ahol Q az 1. igénypontban megadott, vagy annak 1. igénypontban megadott acil-észterét legalább egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható semleges vivőanyaggal együtt szokásos dózisformává alakítunk.

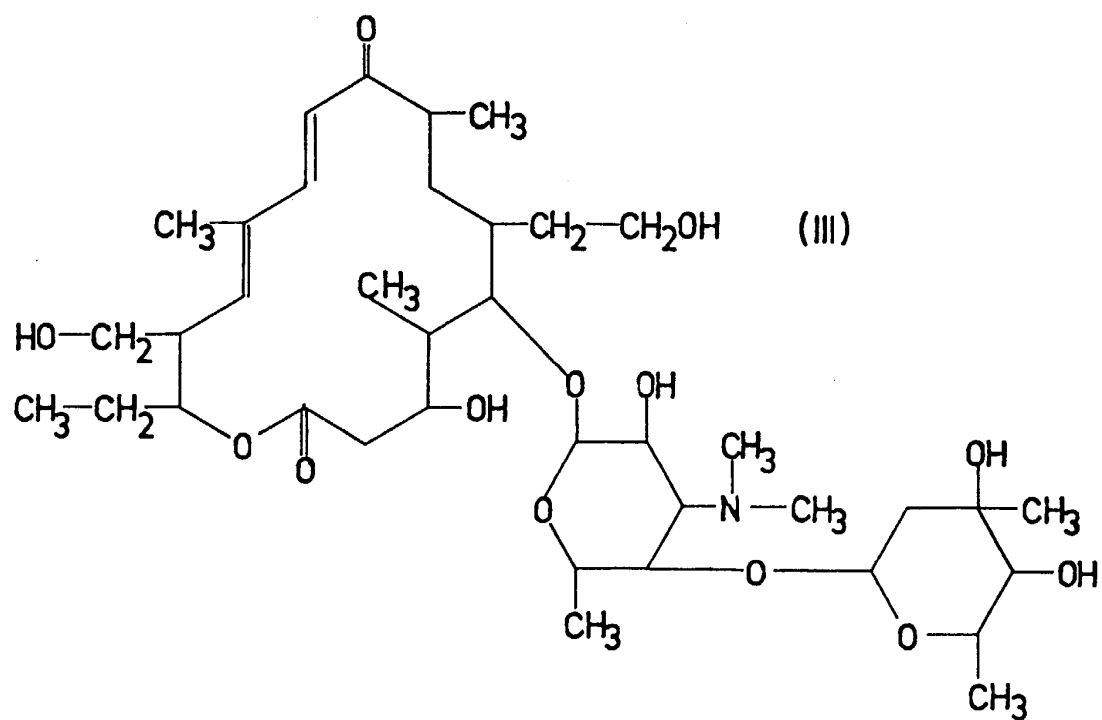
10

---

3 oldal rajz

---





.189 512

NSZO<sub>4</sub>: C 12 P 17/08

