

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)
196228

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,
C 07 K 9/00
A 61 K 37/02

(22) A bejelentés napja: 85. 11. 12.

(21) (4326/85)

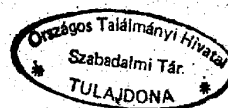
(33) GB

(32) 84. 11. 13.

(31) (84286.9)

(41) (42) Közzététel napja: 87. 03. 30.

(45) A leírás megjelent: 89. 12. 12.



Feltalálók(k): (72)

MALABARBA Adriano, CAVALLERI Bruno, TRANI Aldo, Milánó, MAGNI Ambrogio, Osnago, STRAZZOLINI Paolo, Fiume Veneto, IT

Szabadalmaz: (73)

GRUPPO LEPETIT S. p. A., Milánó IT

(54)

ELJÁRÁS AZ L 17046 ANTIBIOTIKUM ÉSZTER-SZÁRMAZÉKAINAK ÉS EZEKET HATÓANYAGKÉNT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárással előállítható L 17046 antibiotikum új észter-származékai olyan (I) általános képletű vegyületek, ahol

R alkil-, hidroxil-alkil-, alkoxi-alkil-, halogén-alkil-, fenil-alkil- vagy alkilcsoporttal helyettesített fenil-alkil-csoport, és R' hidrogénatom vagy alkanoiloxi-karbonil-csoport,

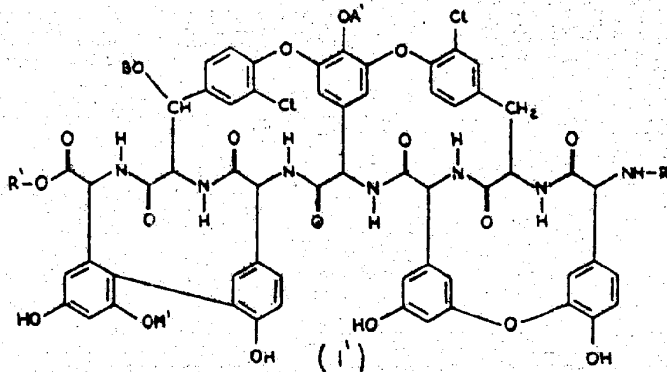
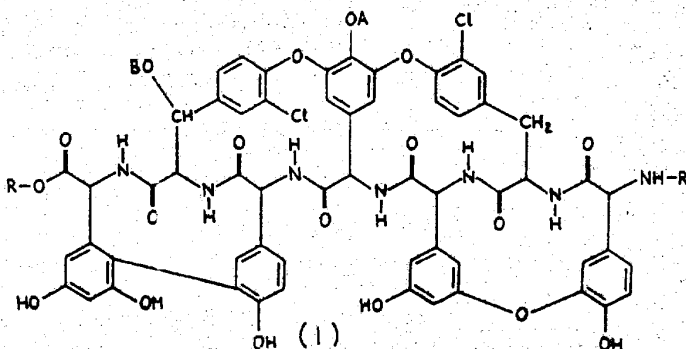
A és M hidrogénatom,

B N-acetil-β-D-glukozaminil-csoport,

azzal a feltétellel, hogy alkilészterek esetében ennek az alkiláncnak a proximális szénatomja nem lehet tercier szénatom.

Az eljárás során egy teikoplanin komplexet, ennek egy tiszta komponensét vagy a komponensek bármely arányú elegyét, vagy egy I' képletű vegyületet egy savas katalizátor jelenlétében ROH képletű alkohollal reagáltatnak, vagy b) egy N-védett L 17046 antibiotikumot RX képletű vegyülettel reagáltatnak, majd kívánt esetben az amino-védőcsoportot eltávolítják.

Az észter származékok antimikrobiális aktivitást mutatnak.



A találmány tárgya eljárás az L 17046 antibiotikumnak nevezett antibiotikus anyagnak a karboxil-csoport észterezésével előállított új (I) általános képletű észter-származékai, valamint ezek gyógyászati szempontból elfogadható savaddíciós sói előállítására. E képletben

R jelentése 1—4 szénatomos alkil-, hidroxi-(1—4 szénatomos)-alkil-, (1—3 szénatomos)-alkoxi-(1—4 szénatomos)-alkil-, halogén-(1—4 szénatomos)-alkil-, fenil-(1—4 szénatomos)-alkil-, a benzolgyűrűben 1—4 szénatomos alkilcsoporttal helyettesített fenil-(1—4 szénatomos)-alkil-csoport,

R¹ jelentése hidrogénatom vagy (2—5 szénatomos) alkanol-oxi-karbonil-csoport,

A és M jelentése hidrogénatom, és
B jelentése N-acetil-béta-D-glukozaminil-csoport,

azzal a feltétellel, hogy alkilészterek esetében ennek az alkiláncnak a proximális szénatomja nem lehet terciér szénatom.

A leírásban használt „alkil” megjelölés egyenes és elágazó szénhidrogén csoportokra egyaránt vonatkozik, és például metil-, etil-, propil-, 1-metil-etil-, butil-, 1-metil-propil-, vagy 1,1-dimetil-etil-csoportot jelent.

A „halogén-(1,4 szénatomos)-alkil” megjelölés olyan monohalogénezett alkilcsoportot jelent, amelyben a halogénatom klór-, fluor- vagy bór-atom.

A fenilcsoporttal helyettesített alkilcsoport például benzil-, m-metil-benzil-, p-terc-butil-benzil-, fen-etil-, 4-fenil-1-butil-, 3-fenil-1-butil stb. csoport.

Az (I) általános képletű vegyületek ismert módon gyógyászati szempontból elfogadható savaddíciós sókká alakíthatók át.

Általában előnyben részesítjük a só alakot, nagyobb stabilitása miatt, amelynek következtében könnyebben tárolható. Az (I) általános képletű vegyületek jellegzetes és megfelelő savaddíciós sói azokat a sókat jelentik, amelyeket a szokásos reakcióban szerves és szervetlen savakkal képezhetünk. Ilyen savak pl. a következők: sósav, kénsav, foszforsav, ecetsav, borostyánkősav, citromsav, tejsav, maleinsav, fumársav, palmitinsav, kólsav, pamoinsav, nyálkasav, glutaminsav, kámforsav, glutársav, glikolsav, ftálsav, borkősav, laurinsav, sztearinsav, szalicilsav, metán-szulfonsav, benzol-szulfonsav, szorbinsav, pikrinsav, benzoészav, fahéjsav stb.

A találmány szerinti, szabad aminosó csoportot tartalmazó vegyületeknek a megfelelő savaddíciós sókká való átalakítása és a megfordított művelet — vagyis egy találmány szerinti vegyület savaddíciós sójának a nem-só vagy szabad aminosó-alakká való átalakítása — a szakember tudásához tartozik és az első művelet a találmány oltalmi körének részét is képezi.

Tekintettel arra, hogy az (I) általános képletű vegyületek és sóik tulajdonságai hasonlóak, a jelen leírásban az (I) általános képletű vegyületek biológiai aktivitására vonatkozóan mondottak érvényesek a gyógyászati szempontból elfogadható sókra is és viszont. A találmány szerinti vegyületek felszintetikus antibakteriális ágensekként vagy az

ilyen anyagok közti termékeiként használhatók fel. Ezek a glikopeptid típusú L 17046 antibiotikum származékai. Közelebbről a találmány szerinti vegyületek észter származékok, amelyeket az L 17046 antibiotikum, az N-védett L 17046 antibiotikum vagy az N-védett L 17046 antibiotikum észterek karboxil-csoportjának észterezésével állíthatunk elő. Valamennyi ilyen vegyület mutat antimikrobiális aktivitást, az N-védett L 17046 antibiotikum és az N-védett L 17046 antibiotikum észter származékok azonban főként közti termékként alkalmazhatók az antimikrobiálisan aktív L 17046 antibiotikum észterek előállításához.

Az L 17046 antibiotikum az 1 195 754 sz. európai szabadalom szerinti eljárás alkalmazásával a teikoplanin — egy másik ismert antibiotikum — ellenőrzött hidrolízisével állítható elő. A teikoplanint a 4 239 751 sz. amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás ismerteti. A teikoplanin a korábban teichomicinnek nevezett antibiotikum nemzetközi szabad neve (INN). Ez az anyag az Actionplantes teicomyceticus nov. sp. ATCC 31121 törzs tenyésztésével állítható elő olyan táptalajban, amely asszimilálható szén- és nitrogénforrást és szervetlen sókat tartalmaz (l. a 4 239 751 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást). Az említett leírás szerinti eljárás során egy teichomicin A₁, A₂ és A₃ komponenseket tartalmazó antibiotikum komplex nyerhető ki az elkülönített fermentleiből oly módon, hogy ezt megfelelő, vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel extraháljuk és azt az extraháló oldószerből ismert módon kicsapjuk az antibiotikumokat. A teichomicin A₂-t, amely az elkülönített antibiotikum komplex legnagyobb mennyiségben jelenlevő faktora, ezt követően Sephadex[®]-en végzett oszlopkromatográfiával választjuk el a többi faktortól.

A 2121401 sz. közzétett brit szabadalmi bejelentésben leírják, hogy a teichomicin A₂ antibiotikum ténylegesen öt, egymáshoz nagyon hasonló, együtt képződő fő komponens keveréke.

Az újabb szerkezeti vizsgálatok eredményei szerint a teikoplanin A₂ (a korábbi teichomicin A₂) 1, 2, 3, 4 és 5 jelű fő komponensei az előbbi (I) szerkezeti képlettel ábrázolhatók, amelyben

R és R₁ jelentése hidrogénatom,
A jelentése N-(1—10 szénatomos)-alifás acil-béta-D-glukozaminil-csoport,
B jelentése N-acetil-béta-D-glukozaminil-csoport és
M jelentése alfa-D-mannozil-csoport.

Mindezek a cukor-maradékok O-glukozid kötésekkel kapcsolódnak a teikoplanin maghoz.

Jellegzetes és kitüntetett példák az 1—10 szénatomos telített alifás acil csoportokra a következők: n-dekanoil-, 8-metil-nonanoil-, Z-4-decenoil-, 8-metil-dekanoil- és 9-metil-dekanoil-csoport.

Ezenkívül megállapították, hogy a teikoplanin, annak egy tiszta komponense vagy az említett komponensek bármely arányú elegye egy vagy két cukor maradék szelektív hidrolízise segítségével egy-egy további antibiotikumá alakítható át. Ezeknek a termékeknek a neve: L 17054 antibiotikum és L 17046 antibiotikum.

Az L 17054 antibiotikum olyan előbbi (I) általános képletű vegyületnek felel meg, amelyben A, R és F jelentése hidrogénatom, B jelentése N-acetil-

béta-D-glukozaminil-csoport és M jelentése alfa-D-mannozil-csoport, és a cukor maradékok O-glukozid kötéssel kapcsolódnak a peptid-maghoz. Ezt a 119575 sz. európai szabadalmi leírásban ismertetik.

Az L 17046 antibiotikum olyan előbbi (I) általános képlettel ábrázolható, amelyben A, M, R és R¹ jelentése hidrogénatom, B jelentése N-acetil-béta-D-glukozaminil-csoport és a cukor maradék O-glukozid kötéssel kapcsolódik a peptid maghoz. Ez a vegyület az 119575 sz. európai szabadalmi leírásból ismert.

Valamennyi említett vegyület, azaz a teikoplanin, egy teikoplanin komponens, az említett komponensek bármilyen arányú elegye, a L 17054 antibiotikum és az L 17046 antibiotikum kiindulási anyagot képvisel a találmány szerinti észter származékok előállításához.

A tárgyalás egyszerűsítése érdekében a leírásához „teikoplanin szerű vegyület”-ként vagy „teikoplaninhoz hasonló anyag”-ként fogunk általában hivatkozni bármelyik előbbi kiindulási anyagra, azaz a teikoplanin komplexre (amelyet a 4 239 751 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás szerint állítottunk elő), ennek valamely tisztítási termékére, egy olyan (I') általános képletű vegyületre, amelyben R jelentése hidrogénatom, R¹ jelentése hidrogénatom vagy egy amino-védőcsoport, így (2—5 szénatomos)alkanoiloxi-karbonil-csoport. A' jelentése hidrogénatom vagy egy (10—11 szénatomos alifás acil)-béta-D-glukozaminil-csoport, B jelentése N-acetil-béta-D-glukozaminil-csoport és M' jelentése hidrogénatom vagy alfa-D-mannozil-csoport (azzal a feltétellel, hogy ha A jelentése hidrogénatom, akkor M jelentése is hidrogénatom), valamint ezek bármilyen arányú elegyére.

Az (I) általános képletű L 17046 antibiotikum észtereket úgy állítjuk elő, hogy a megfelelő teikoplaninszerű anyagot észterezzük.

Az észterezési körülmények függnek a kiindulási anyagként alkalmazott konkrét teikoplaninszerű anyag minőségétől, és bizonyos mértékig attól, hogy milyen konkrét észtert kívánunk előállítani.

Az észterezési eljárás reakciókörülményei általában olyanok, hogy elkerülhetővé válik a teikoplanin mag módosulása, és abban az esetben, amikor a kiindulási teikoplaninszerű anyag A és M helyettesítője nem hidrogénatom, az észterezési eljárás reakciókörülményeit úgy választjuk meg, hogy a kiindulási anyagnak ezek a cukor maradékai hidrolízissel eltávolíthatók legyenek, mielőtt a fő reakció befejeződnék.

A találmány tárgya tehát eljárás az L 17046 antibiotikum észtereinek előállítására oly módon, hogy

a) egy teikoplaninszerű anyagot, így egy teikoplanin komplexet, ennek valamely tisztítási termékét, vagy egy olyan (I') általános képletű vegyületet, melynél

R¹ hidrogénatom,
R¹ hidrogénatom vagy egy amino-védőcsoport, így (2—5 szénatomos)alkanoiloxi-karbonil-csoport,
A' hidrogénatom vagy egy N-[(10—11 szénatomos)-alifás acil]-β-D-glükóz-aminil-csoport,

B egy N-acetil-β-D-glükózaminil-csoport,
M' hidrogénatom vagy egy α-D-mannozil-csoport,

azzal a feltétellel, hogy ha A jelentése hidrogénatom, akkor M-nek is hidrogénatomot kell jelentenie, amely vegyületekben valamennyi cukor-maradék O-glukozid-kötéssel kapcsolódik a peptid maghoz, egy sav, előnyösen egy ásványi sav jelenlétében, —15 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten, ROH általános képletű alkohol — melynek képletében R jelentése az (I) általános képletnél megadott — feleslegével reagáltatjuk, vagy

b) olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, melyek képletében R jelentése az (I) általános képletnél megadott a halogén-(1—4 szénatomos)-alkil-csoport kivételével, R¹, A, M és B jelentése az (I) általános képletnél megadott, egy N-védett L 17046 antibiotikum-származékot egy RX általános képletű vegyülettel — melynek képletében R jelentése az (I) általános képletnél megadott, X jelentése klór-, bróm- vagy jódatom — közömbös szerves poláris aprotikus oldószerben, előnyösen egy hidrogénhalogénid akceptor jelenlétében, —5 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten reagáltatunk.

A szakember számára magától értetődő, hogy a teikoplaninszerű anyagok szabad amino-csoportja bekapcsolódhat a reakcióba, ezért egyes esetekben szükségessé válhat ennek védőcsoporttal való ellátása, az észterezési eljárás megkezdése előtt.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható N-védőcsoport a szakember által ismert N-védőcsoportok egyike lehet, amelyeket pl. a következő szakkönyvek írnak le: T. W. Greens, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley and Sons, New York, 1981, 323—326. oldalak és M. Mc Omie, Protecting Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, 1973. Ezeknek a védőcsoportoknak eleget kell tenniük az alábbi feltételeknek: olyan kötést kell képezniük a teikoplaninszerű származék amino-csoportjaival, amely a reakció körülményei között stabil; nem befolyásolhatják kedvezőtlenül az észterezési fő-reakciót, és a reakció befejeződése után könnyen lehasíthatóknak és eltávolíthatóknak kell lenniük a reakcióelegyből anélkül, hogy az újonnan képződött észter kötés károsodást szenvedne. Előnyösen alkalmazhatók az oxikarbonil-védőcsoportok.

Mint az a szakember számára nyilvánvaló, a konkrét N-védőcsoport kiválasztása végső soron annak a konkrét észternek a jellemzőitől függ, amelyet elő kívánunk állítani. Ennek az észternek mindenekelőtt stabilnak kell lennie az N-védőcsoport eltávolítása körülményei között. Mivel a különböző N-védőcsoportok eltávolítási körülményei ismertek, a szakember ki tudja választani a megfelelő védőcsoportot. Ha pl. benzilésztert kívánunk előállítani, el kell kerülnünk olyan védőcsoportok alkalmazását, amelyek katalitikus hidrogénezéssel távolíthatók el (amilyen pl. a benziloxikarbonil-csoport), míg megfelelően alkalmazhatók azok az N-védőcsoportok, amelyek enyhe savas körülmények között távolíthatók el (amilyen pl. a terc-but-oxikarbonil-csoport).

A találmány szerinti vegyületek előállítására irányuló eljárás ezért általában abból áll, hogy egy N-védett vagy egy szabad amino-csoportot tartalma-

zó teikoplaninszerű anyagot savas közegben egy alkohollal reagáltatunk, vagy egy N-védett L 17046 antibiotikum származékot egy alkilhalogennel, bromiddal, kloriddal vagy joddal reagáltatunk, vagy egy N-védett L 17046 antibiotikumot, amely egy aktivált karboxilcsoportot tartalmaz, a kiválasztott alkohollal reagáltatunk.

Az „aktivált karboxilcsoport” kifejezés a teikoplaninszerű szubsztátum karboxilcsoportjának olyan átalakítását jelenti, amely ezt a karboxilcsoportot reakcióképesé teszi az alkohol reagenssel való összekapcsolódás szempontjából, olyan észter kötés kialakítása mellett, amely a találmány szerinti vegyületekre jellemző.

A karboxilcsoport „aktiváló szereire”, a találmány szerinti eljárásban, példák a következők: karbomil-diimid származékok — pl. az N,N'-diklohexil-karbodiimid, N,N'-diizopropil-karbodiimid — és a karbonil-funkciót klórozó ágensek, amilyen a tionilklorid. Ezek az ágensek képesek olyan reakcióképes közti termékek képzésére, amelyeket instabilitásuk miatt egyes esetekben nem különítünk el, hanem célszerűen in situ reagáltatunk a kiválasztott alkohollal, a kívánt észter keletkezésé mellett.

Közelebből az L 17046 antibiotikumnak a találmány szerinti észter származékai előállítására irányuló ellenőrzött észterezési eljárások olyan észterezési reakciókat foglalnak magukban, amelyek során savas-alkoholos körülményeket létesítünk, vagy egy N-védett teikoplaninszerű származék vagy előnyösen egy szabad teikoplaninszerű származék jelenlétében; továbbá olyan észterezési reakciókat, amelyek során a teikoplaninszerű szubsztátumot a kiválasztott alkohol savas oldatának feleslegével kezeljük (ennek a reakció hőmérsékletén cseppfolyósnak kell lennie); olyan észterezési reakciókat, amelyek során az N-védett L 17046 antibiotikum származékot egy megfelelő alkoholos szubsztáttal — így fenollal vagy egy helyettesített fenollal — reagáltatunk a karboxilcsoportot megfelelően aktiváló ágens jelenlétében; és olyan észterezési eljárásokat, amelyek során egy N-védett L 17046 antibiotikum származékot közömbös szerves oldószerben egy R-X általános képletű halogennel reagáltatunk — a képletben R jelentése az előbbieken meghatározott, a halogén-alkilcsoportok kivételével és X jelentése klór-, vagy előnyösen bróm- vagy jódatom —, előnyösen egy tercier amin, pl. trietilamin, pikolin stb. jelenlétében.

Egy általános eljárás tehát olyan (I) általános képletű észterek előállítására, amelyekben az alkohol maradék egy olyan alkohol maradéka, amely a reakció hőmérsékletén cseppfolyós és vízben alig oldható vagy gyakorlatilag vízoldhatatlan, ezért abból áll, hogy egy teikoplaninszerű vegyületet a megfelelően megválasztott alkohol oldatával reagáltatjuk egy ásványi sav, előnyösen egy hidrogénhalogenid jelenlétében. A reakció hőmérséklete előnyösen 50 °C és 80 °C között választható meg. Kitüntetett hidrogénhalogenid a hidrogénbromid és a sósav, de különösen a sósav.

A találmány szerinti eljárással előállítható (I) általános képletű észter-származékokra jellegzetes példák a következők: L 17046 metil-, etil-, n-butil-észter, L 17046 benzilészter, L 17046 m-klór-benzilészter, L 17046 o-fluor-benzilészter, L 17046 m-

-fluor-benzilészter, L 17046 p-fluor-benzilészter, L 17046 m-metil-benzilészter, L 17046 p-terc.-butil-benzilészter, L 17046 2-klór-etilészter, L 17046 2-bróm-etilészter, L 17046 4-bróm-butilészter, L 17046 4-fluor-butilészter és ezek savaddíciós sói.

Egy másik általános eljárás a találmány szerinti vegyületek előállítására — azok kivételével, amelyekben R jelentése halo-(1—12 szénatomos)-alkilcsoport — abból áll, hogy egy N-védett L 17046 antibiotikumot, hidrogénhalogenid akceptor jelenlétében, közömbös szerves poláris aprotikus oldószerben egy RX általános képletű halogenid származékkal reagáltatunk; e képletben

R jelentése az előbbi, a halo-(1—4 szénatomos)-alkil-csoport kivételével és
X jelentése klór- vagy előnyösen bróm- vagy jódatom.

A reakció hőmérséklete kb. (—5 °C)-50 °C. A hőmérséklet előnyösen 15—50 °C. Az N-védett L 17046 antibiotikum észter-származékából ezt követően az alábbiakban ismertetett vagy a szakember számára egyébként ismert eljárások szerint eltávolítjuk a védőcsoportot.

A megfelelő közömbös szerves poláris aprotikus oldószerekre példák a poláris aprotikus oldószerek, amilyen a dimetilformamid, dimetoxi-etán, mexametil-foszforamid, dimetilszulfoxid, benzol, toluol stb.

A megfelelő hidrogénhalogenid akceptorokra példák a tercier szerves aminok — pl. a trimetilamin, pikolin stb. —, valamint a szerves bázisok, mint az alkálifém-hidrogén-karbonátok, pl. a nátrium- vagy kálium-hidrogénkarbonát.

Ezen az esetben kitüntetett N-védőcsoport a terc. butoxi-karbonilcsoport, míg kitüntetett közömbös szerves poláris aprotikus oldószer a dimetilformamid (DMF). A reakcióidő általában 24—50 óra kb. szobahőmérsékleten. Az ezzel a módszerrel előállítható (I) általános képletű észter-származékokra jellemző példák a következők: L 17046 metilészter, L 17046 etilészter, L 17046 n-butilészter, L 17046 benzilészter, L 17046 p-terc-butil-benzilészter L 17046 fenetilészter, L 17046 4-fenil-1-butilészter, L 17046 3-fenil-1-butilészter és ezek savaddíciós sói.

Egy további eljárás a találmány szerinti vegyületek előállítására abból áll, hogy egy aktivált karboxilcsoportot tartalmazó N-védett L 17046 származékot közömbös szerves oldószerben egy megfelelő alkohollal reagáltatunk.

Ezen eljárás szerint N-védett L 17046 észterhez juthatunk, amely ismert módon védőcsoport-mentesíthető. Az N-védett L 17046 származék „aktiválási” lépése is ismert eljárásokkal végezhető, amint ezt az előbbieken leírtuk és amint ez a szakember számára ismert. Egy másik megoldás szerint az N-védett L 17046 származékot és a megfelelő alkoholt közömbös szerves oldószerben oldjuk és az oldathoz ugyanebben az oldószerben oldva adjuk hozzá a kondenzálószert. A reakció hőmérsékletét minden esetben általában (—15 °C) és a szobahőmérsékletet, előnyösen (—10 °C) és 20 °C és legelőnyösebben 0 °C és 15 °C között tartjuk.

Közömbös szerves oldószerek az előbbieken meghatározott poláris aprotikus oldószerek, míg megfelelő kondenzálószereknek az L 17046 anti-

biotikum karboxil-csoportja „aktiválásával” kapcsolatban említettek tekinthetők.

A karboxilcsoport aktiválószerként az ismert karbodiimid származékon kívül a tionilklorid is alkalmazható. Ez az aktiválószer különösen előnyösen alkalmazható (I) általános képletű halo-(1—12 szénatomos)-alkilészterek előállítására.

Egyes klór-alkilészterek — például a 4-klór-butilészter — úgy is előállíthatók, hogy az L 17046 antibiotikumot oxetánnal, tetrahidrofuránnal, tetrahidropiránnal, oxepánnal, 2-metil-tetrahidrofuránnal, 3-metil-tetrahidrofuránnal, illetőleg 3-metil-tetrahidropiránnal reagáltatjuk, sósav átbuborékolatása közben. A reakció hőmérséklete előnyösen 30 °C—60 °C. A reakció általában 4—24 óra alatt befejeződik. A szakember számára magától értetődő, hogy az előbbieken ismertetett észterezési eljárásban a reakcióidő változik a konkrét reakciókörülmények és az alkalmazott kiindulási anyagok függvényében. Mivel azonban a találmány szerinti vegyületek éppúgy, mint a teikoplaninszerű kiindulási anyagok autobiográfiás vizsgálatokkal könnyen kimutathatók, ill. TLC vagy HPLC segítségével megfigyelhetők, a szakember ugyancsak képes a reakció lefolyásának követésére és annak meghatározására, hogy a reakció mikor fejeződik be.

A következőkben egy példát írunk le arra, hogy a reakció lefolyása hogyan követhető HPLC-vel. A reakcióelegyből meghatározott időközönként kb. 20 µl-es mintákat veszünk, a mintákat 50:50 (térf./térf.) 0,2 %-os vizes ammóniumformiát: acetonitril elegy hozzáadásával kb. 2 mg/ml végkoncentrációra hígítjuk és beinjektáljuk a HPLC rendszerbe.

A HPLC rendszer egy Varian 5000 kromatográf, Rheodyne 7125 típusú 20 µl-es injektor-kaccsal ellátva. A rendszer további részei: egy 254 nm-es UV detektor és egy Perisorb RP-8 Merck töltettel megtöltött elő-oszlop (30—40 µm), amelyet egy LiChrosorb RP-8-cal (10 µm) elő-töltött Hibar Merck oszlop (25 cm) követ.

Eluálószer: lineáris gradiens 15 % B-től (A-ban) 32 % B-ig (A-ban) 20 perc alatt, kb. 2 ml/perc áramlási sebesség mellett;

A oldószer: 0,2 %-os vizes ammóniumformiát

B oldószer: acetonitril.

Néhány találmány szerinti jellegzetes vegyület relatív retenciósi idejét az előbbi rendszerben az I/a táblázatban mutatjuk be.

A következőkben egy másik példát mutatunk be a HPLC elemzési eljárásra.

Meghatározott időközökben kb. 0,1 ml-es mintákat veszünk a reakcióelegyből, a mintákat kb. 0,7 mg/ml végkoncentrációra hígítjuk 50:50 (térf./térf.) 0,2 %-os vizes NaH₂PO₄:acetonitril elegyével és beinjektáljuk a HPLC rendszerbe.

A HPLC rendszer egy Hewlett-Packard 1084A kromatográf.

Injektált térfogat: 20 µl.

UV detektor: 254 nm.

Oszlop: 25 cm-es Hibar-Merck, LiChrosorb RP-8-cal (7 µm) átöltve.

Eluálószer:

A oldószer: NaH₂PO₄ 0,02M/CH₃CN 25/75 (térf./térf.)

B oldószer: NaH₂PO₄ 0,02M/CH₃CN 95/5 (térf./térf.)

Gradiens: t, perc	0	2	25	30	35
% B	30	30	50	60	30

5 Áramlási sebesség: 1,5 ml/perc.

Néhány, találmány szerinti jellegzetes vegyület relatív retenciósi idejét az I/b táblázatban mutatjuk be.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti vegyületek mind lényegében tiszta teikoplaninszerű anyagokból, mind nyers teikoplaninszerű anyagokból előállíthatók.

Az előbbi esetben olyan, találmány szerinti vegyülethez juthatunk, amely nem igényli további külön tisztítási lépés végrehajtását, míg az utóbbiban egy végső tisztítási lépés válik szükségessé.

A tisztítást általában ismert eljárások szerint végzzük, amelyek közé tartozik pl. a kicsapás nem-oldószerrel, oldószeres extrakció, sóképzés és a kromatográfiás eljárások.

Egy kitüntetett tisztítási eljárás fordított fázisú oszlopkromatográfiái alkalmazását foglalja magában. Ebben az esetben a kitüntetett adszorbens a szilanizált szilikagél, 0,06—0,2 mm részecskeméret eloszlási tartománnyal.

Az eluálószer valamelyik hidrofil elegy lehet, amelyet a tisztítási eljárásokban alkalmaznak. Jellemző példák az ilyen hidrofil oldószerekre mint eluálószerre a következők: szerves savak ammóniumsóinak híg vizes oldatai és acetonitril vagy vízoldható rövidszénláncú alkanolok különböző arányú elegyei.

A szerves savak ammóniumsóinak híg vizes oldataira jellemző példák a 0,1—6 %-os vizes ammóniumformiát oldatok, míg a megfelelő alkanolokra példa a metanol, etanol, propanol stb. Kitüntetett eluálószer a vizes ammóniumformiát és acetonitril pH 6—8 elegye vagy vizes ammóniumformiát és metanol elegye.

Egy kitüntetett eljárás a következőket foglalja magában: először fordított fázisú kromatográfiát végzünk szilanizált szilikagélen (0,06—0,2 mm), a kifejlesztés lineáris lépcsős gradienssel (5—60 % acetonitril 0,2 %-os vizes ammóniumformiátban) végezve, majd egy második oszlopon kromatografálunk, eluálószerként 6:4 (térf./térf.) acetonitril: víz elegyet alkalmazva.

Egy másik kitüntetett eljárás a következőkből áll:

50 a) a nyers antibiotikumot 1:2:3 0,2%-os vizes ammóniumformiát:metanol:butanol elegyben oldjuk, szilanizált szilikagéllal hozzuk érintkezésbe és az oldószereket lehajtjuk;

55 b) a maradékot felvisszük egy szilanizált szilikagél oszlop (0,06—0,2 mm) tetejére, 9:1 0,6%-os vizes ammóniumformiát:acetonitril eleggyel kifejlesztést végzünk, az eluátumot elvetjük és az eluálást lineáris acetonitril/vízben gradienssel folytatjuk, amelyet úgy alakítunk ki, hogy 200 ml/óra sebességgel elegyítünk 1:9 acetonitril:víz elegyet és 7:3 acetonitril:víz elegyet.

60 A „lényegében tiszta” kifejezés, egy — a leírásban szereplő antibiotikum vonatkozásában — olyan anyagot jelez, amelynek HPLC titere nagyobb, mint 95% (a csúcs-területek százalékos mennyisége az előre meghatározott UV hullámhosszúságon, 254 nm-en), víz és oldószer tartalma

I.a) táblázat

Példa	R	R ¹	IR ^a (cm ⁻¹)	K ^b	pK _a ^c
1.	metil	H	1720	1,45	6,70
2.	etil	H	1720	1,55	6,68
3.	n-butil	H	1715	1,95	6,65
4.	2-CL-etil	H	1725	1,69	6,67
5.	4-Cl-n-butil	H	1720	2,12	6,66
8.	benzil	H	1735		
10.	4-CH ₃ -benzil	H	1735		
12.	2-OH-etil	H	1740		

^a az észter-CO frekvenciája ($\nu_{C=O}$); nujol mullpólyában Perkin-Elmer 850 készülékkel felvéve;

^b $K = t_R \text{ észter} / t_R \text{ L 17046}$ = relatív retenció idő az előbbieken ismertetett HPLC rendszerben; $t_R \text{ L 17046}$ értéke ebben a rendszerben kb. 8,5 perc;

^c a mintákat 4:1 (térf./térf.) metilcellol-szolv[®]:víz elegyben oldjuk, ugyanebben az oldószerben oldott 0,01 mólos sósav-felesleget adagolunk és a kapott oldatot ugyanebben az oldószerben oldott 0,01 M NaOH-val titráljuk.

10%—15% (tömegarány) és szervetlen maradék tartalma 0,5%-nál (tömegarány) alacsonyabb.

Néhány jellegzetes, találmány szerinti vegyület fizikokémiai jellemzőit az I.a), I.b), II. és III. táblázatban foglaljuk össze.

I.b) táblázat

Példa	R ¹	R	K ⁺
6.	BOC	H	1
7.	BOC	benzil	2
8.	H	benzil	0,57
9.	BOC	4-CH ₃ -benzil	2,2
10.	H	4-CH ₃ -benzil	0,74
11.	BOC	2-OH-etil	1,45
12.	H	2-OH-etil	0,36

⁺ $K = t_R \text{ észter} / t_R \text{ L 17046}$; $t_R \text{ L 17046}$ ebben a rendszerben kb. 10,5-del egyenlő.

II. táblázat
UV (λ_{max})
(nm)

Példa	Metanol	pH = 1,0	pH = 7,4	pH = 13,0
1.	280	279	279	298
2.	280	279	279	298
3.	280	279	279	298
4.	280	279	280	299
5.	280	279	280	298

A felvételeket Unicam SP 800 spektrométer segítségével készítettük.

A találmány szerinti vegyületek antibakteriális aktivitását in vitro a szokásos agar-hígítási vizsgálatokkal határozhatjuk meg.

A Staphylococcusok, illetőleg a Streptococcusok tenyésztésére Isosensitest levest (Oxoid), illetőleg

III. táblázat
Elem-analízis
Számított értékek

Példa	Számított képlet (mólsúly)	C%	H%	N%	Cl% összes	ionos
1.	C ₆₇ H ₆₀ N ₈ Cl ₂ O ₂₃ .HCl (1452,5)	55,40	4,57	7,71	7,32	2,44
2.	C ₆₈ H ₆₂ N ₈ Cl ₂ O ₂₃ .HCl (1466,7)	55,69	4,33	7,64	7,25	2,42
3.	C ₇₀ H ₆₆ N ₈ Cl ₂ O ₂₃ .HCl (1494,7)	56,24	4,52	7,50	7,12	2,37
4.	C ₆₈ H ₆₁ N ₈ Cl ₃ O ₂₃ .HCl (1501,1)	54,41	4,16	7,47	9,45	2,36
5.	C ₇₀ H ₆₅ N ₈ Cl ₃ O ₂₃ .HCl (1529,2)	55,44	4,35	7,33	9,27	2,32

III. táblázat
Elem-analízis
Talált értékek

Példa	C% ^a	H% ^b	N% ^a	Cl% ^b	szervetlen mar., % ^c	súlyveszt. % ^d
				összes	ionos	
1.	55,08	4,63	7,30	7,35	2,46	3,7
2.	55,25	4,42	7,44	7,41	2,53	3,9
3.	56,03	4,71	7,36	7,35	2,51	5,3
4.	54,28	4,30	7,29	9,71	2,62	12,9
5.	55,46	4,45	7,12	9,45	2,47	4,8

^a Előzetesen 140 °C-on nitrogén atmoszférában szárított mintákban meghatározva.

^b Súlyvesztésre és szervetlen maradékra korrigálva.

^c A minták oxigén atmoszférában 900 °C-ra való melegítése után meghatározva.

^d Termogravimetriás elemzéssel 140 °C-on meghatározva.

Todd-Hewitt levest (Difco) használunk. A leves-tenyészeteket úgy hígítjuk, hogy a végső inokulum kb. 10⁴ telepképző egységet (TKE) tartalmazzon 1 ml-ben. A minimális gátló koncentrációnak (MIC) azt a legalacsonyabb koncentrációt tekintjük, amely mellett 18–24 órás inkubálás során, 37 °C-on nem lép fel látható növekedés. Az (I) általános képlet körébe tartozó jellegzetes vegyületek antibakteriális vizsgálata eredményeit a következő IV. táblázatban foglaljuk össze.

IV. táblázat

Mikroorg.	MIC (µg/ml) a következő példák szerinti vegyületekre				
	1.	2.	3.	4.	5.
1.	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25
2.	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125
3.	0,5	0,5	0,25	0,5	0,125
4.	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
5.	0,016	0,016	0,016	0,064	0,064
6.	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25
7.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125
8.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
9.	128	128	128	128	128

Mikroorg.	MIC (µg/ml) a következő példák szerinti vegyületekre		
	8.	10.	12.
2.	0,125	0,125	0,125
3.	0,125	0,25	0,125
4.	4	4	0,5
5.	0,063	0,063	0,063
6.	0,125	0,125	0,25
7.	0,25	0,5	1
8.	0,125	0,25	0,25
9.	64	64	128

Mikroorganizmusok:

1. — *S. aureus* ATCC 6538
2. — *S. aureus* TOUR (10³ TKE/ml)
3. — *S. aureus* TOUR (10⁶ TKE/ml)
4. — *S. aureus* TOUR + 30% szarvasmarha szérum
5. — *S. epidermidis* ATCC 12128
6. — *S. pyogenes* C 203 SKF 13400
7. — *S. pneumoniae* UC 41
8. — *S. faecalis* ATCC 7080
9. — *E. coli* SKF 12140

A Gram-pozitív baktériumokkal szemben nyilvánuló aktivitás mellett a találmány szerinti jellegzetes vegyületek bizonyos fokú aktivitást mutatnak Gram-negatív baktériumokkal szemben is.

Az előbbiekre tekintettel a találmány szerinti vegyületek hatékonyan alkalmazhatók olyan antimikrobiális készítmények aktív komponenseiként, amelyeket az ember- és állatgyógyászatban patogén baktériumok által okozott fertőző betegségek megelőzésére és kezelésére használunk, amely baktériumok érzékenyek az említett aktív komponensekre.

Az ilyen kezelések során ezek a vegyületek tetrazoles arányú keverékek alakjában alkalmazhatók. A találmány szerinti vegyületek orálisan, helyileg vagy parenterálisan vihetők be, mimellett előnyben részesítjük a parenterális alkalmazást. A bevitel módjától függően ezek a vegyületek különböző adagolási egységek alakjában egészíthetők ki. Az orális bevitelre szánt készítmények kapszula, tabletta, oldat vagy szuszpenzió alakúak lehetnek. Mint ez a szakember számára ismert, a kapszulák és tabletták az aktív komponensen kívül a szokásos töltőanyagokat — így hígítókat (amilyen pl. a laktóz, kalciumfoszfát, szorbit stb.) —, kenőanyagokat (pl. magnéziumsztearátot, talkumot, polietilénlikolt), kötőanyagokat (amilyen pl. a polivinilpirrolidon, zselatin, szorbit, tragakanta, arabmész), izanyagokat, valamint elfogadható szétesést elősegítő és nedvesítő anyagokat tartalmaznak. A folyékony készítmények — melyek általában vizes vagy olajos oldat vagy szuszpenzió alakúak — szokásos adalékokat, így szuszpendálószerkeket tartalmazhatnak. Helyi alkalmazás céljából a találmány szerinti vegyületek kikészíthetők olyan megfelelő alakúra is, hogy lehetővé váljék abszorpciójuk az orr és a torok nyálkahártyáján és a bronchiális szöveteken keresztül. Ezek előnyösen folyékony spray vagy inhalálószerke, gyógyszer vagy torokecsetelek alakúak lehetnek.

A szem vagy a fül kezelése esetében a készítmény folyékony vagy fél-folyékony alakban állítható elő. A helyi kezelésre alkalmas készítmények hidrofób vagy hidofil bázisokkal, így kenőcsökkel, krémekkel, rázókeverékekkel, ecsetelőszerkeket vagy porokkal készülhetnek.

Az injekciós készítmények szuszpenziók, oldatok vagy emulziók lehetnek — olajos vagy vizes vízfázisokban — és formázószerkeket, így szuszpendáló, stabilizáló és/vagy diszpergáló szerkeket tartalmazhatnak.

Egy másik megoldás szerint az aktív komponens por alakú lehet és a felhasználás időpontjában állítható elő a folyékony készítmény egy megfelelő vívdanyaggal, pl. steril vízzel.

A beviendő aktív komponens mennyisége különböző tényezőktől függ, amilyen a kezelendő beteg testsúlya és állapota, a bevitel módja és gyakorisága és a szóbanforgó kórokozó minősége.

A találmány szerinti készítmények általában kb. 0,5—kb. 30 mg aktív komponens/testsúly-kg napi dózisban hatékonyak; ezt a mennyiséget előnyösen 2—4 alkalomra osztjuk fel a nap folyamán. Különösen előnyösek az adagolási egységek alakjában előállított készítmények, amelyek egységenként kb. 20—kb. 300 mg aktív anyagot tartalmazhatnak.

A gyógyszerkészítmények előállítására néhány jellemző példát a következőkben mutatunk be:

Parenterális bevitelre alkalmas oldatot állítunk elő oly módon, hogy 100 mg L 17046 antibiotikum etilésztert — hidroklorid alakban — 2 ml steril pro inj. vízben oldunk.

Parenterális bevitelre szolgáló készítményt állítunk elő oly módon, hogy 250 mg L 17046 antibiotikum butilészter-hidrokloridot 3 ml pro inj. steril vízben oldunk.

Helyi alkalmazás céljából kenőcsöt állítunk elő oly módon, hogy 200 mg L 17046 antibiotikum 4-klór-butilészter-hidrokloridot, 3,6 g polietilén-glikolt (4000 USP) és 6,2 g polietilén-glikolt (400 USP) összekeverünk.

A következő példák azt mutatják be, hogy a találmány a gyakorlatban hogyan alkalmazható. Mint ilyenek azonban a példák nem tekinthetők az általmi kör terjedelmét korlátozóknak.

A kiindulási anyagok előállítása

a) Az L 17054 antibiotikum előállítása

5 g teikoplanint erőteljes keverés közben hozzáadunk 60 ml, 80 °C-ra előmelegített 0,5n vizes sósavhoz.

A keverést folytatjuk és a hőmérsékletet 30 percen át kb. 80 °C-on tartjuk. A keveréket ezután gyorsan szűrjük, a szűrletet 0—5 °C-ra hűtjük le és 10 ml 6n sósavat adagolunk. A kapott szuszpenziót kb. 15 percen át keverjük, miközben a hőmérsékletet 0—5 °C-on tartjuk. A csapadékot összegyűjtjük, 20 ml hideg 1n sósavval, majd etiléterrel mossuk és csökkentett nyomáson szobahőmérsékleten szárítjuk. 4,5 g nyers L 17054 antibiotikum-hidrokloridot kapunk.

3 g, az előbbieket szerint előállított nyers L 17054 antibiotikum-hidrokloridot 150 ml 95:5 (térf./térf.) 0,2%-os vizes ammóniumformiát/acetonitril elegyben oldunk. A pH-t 1n NaOH-dal kb. 7,5-re állítjuk be és a terméket feloldjuk. A kapott oldatot felvisszük egy oszlopra, amely 150 g 0,06—0,2 mm-es szilanizált szilikagél (Merck) tartalmaz, ugyanezzel az oldószerrel elkészítve. Az oszlopot lineáris gradiens elucióval fejlesztjük ki (5—21%, térf./térf., acetonitril 0,2%-os vizes ammóniumformiátban) és 20 ml-es frakciókat szedünk, amelyeket HPLC-vel követünk. Az L 17054 antibiotikumot tartalmazó frakciókat (70.—96.) egyesítjük és az acetonitrilt vákuumban eltávolítjuk. A visszamaradó vizes oldatot felvisszük egy oszlopra, amely 10 g szilanizált szilikagél tartalmaz desztill-

ált vízben. Az oszlopot a sók teljes eltávolításáig desztillált vízzel mossuk, majd a terméket 1:1 (térf./térf.) acetonitril:víz eleggyel eluáljuk.

Az összegyűjtött oldatot vákuumban kis térfogatra töményítjük be és az antibiotikumot aceton hozzáadásával kicsapjuk.

Szobahőmérsékleten való szárítás után 0,9 lényegében tiszta L 17054 antibiotikumot kapunk.

b) Az L 17046 antibiotikum előállítása

10 g teikoplanint keverés közben hozzáadunk 150 ml sósavhoz, amelyet 80 °C-ra előmelegítünk. Kb. 45 perc elteltével a reakcióelegyet 0—5 °C-ra hűtjük és hozzáadunk kb. 30 ml 37%-os sósavat. A keverést kb. 10 percen át folytatjuk, majd a kivált szilárd anyagot szűrővel kinyerjük, 20 ml 2n sósavval, majd etil-éterrel mossuk és egy éjjelen át káliumhidroxid pasztillák felett szobahőmérsékleten szárítjuk. Így 8,3 g nyers L 17046 antibiotikum-hidrokloridot kapunk.

6,2 g előbbi nyers terméket 500 ml 80%-os metanolban oldunk és hozzáadunk 30 g szilikagél (Merck, 0,06—0,2 mm). 200 ml n-butanol hozzáadása után az oldószert vákuumban eltávolítjuk. A maradékot felvisszük egy kromatográfiás oszlopra, amely acetonitrilben 300 g szilikagél tartalmaz. Az oszlopot úgy fejlesztjük ki, hogy egymásután a következő oldószerkevegeket alkalmazzuk, 300-300 ml mennyiségben: acetonitril; 95:5 acetonitril:víz; 90:10 acetonitril:víz; 85:15 acetonitril:víz. Az elúátumokat kiöntjük és az oszlopot lineáris gradiens elucióval fejlesztjük ki, amelyet úgy értünk el, hogy 375 ml/óra sebességgel elegyítünk 3,5-3,5 liter következő oldószerkeveget: 83:17 acetonitril:víz és 70:30 acetonitril:víz.

25 ml-es frakciókat szedünk és ezeket HPLC-vel vizsgáljuk. Az L 17046 antibiotikumot tartalmazó frakciókat (170.—200.) egyesítjük. Az egyesített frakciókhoz 400 ml n-butanolt adunk és a kapott elegyet kis térfogatra töményítjük be. A zavaros oldathoz ezután acetont adagolunk és 10 °C-ra való lehűtés után azt észleljük, hogy csapadék kezd kiválni. A kicsapódás teljessé válása után a szilárd anyagot szűrővel összegyűjtjük, acetonnal, majd etiléterrel mossuk, szobahőmérsékleten vákuumban szárítjuk és így 1,9 g, cím szerinti vegyületet kapunk, lényegében tiszta alakban.

1. példa

Az L 17046 antibiotikum-metilészter-hidroklorid előállítása

a) L 17046 antibiotikumból

3 g L 17046 antibiotikumot 90 ml 0,35 mólos, 99,9%-os metanollal elkészített, vízmentes sósavban szuszpendálunk és a szuszpenziót kb. 2 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk (fürdő-hőmérséklet kb. 80 °C). A reakcióelegyet ezután 0—5 °C-ra hűtjük le és a csapadékot összegyűjtjük, 100 ml dietiléterrel mossuk és egy éjjelen át szobahőmérsékleten vákuumban szárítjuk. 2,41 g nyers, cím szerinti észtert kapunk. A nyers terméket 100 ml vízben szuszpendáljuk és a kapott szuszpenzió pH-ját 8,3-re állítjuk be 0,1n NaOH-dal, majd háromszor 200 ml n-butanollal extraháljuk. A szerves rétegeket egyesítjük és ehhez az elegyhez hozzáadunk 200 ml vizet és 100 ml etilacetátot. A szerves

réteget ezután elkülönítjük és vákuumban 40 °C-on kb. 200 ml végtérfogatra töményítjük be. 200 ml dietiléter hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, 100 ml dietiléterrel mosunk és 50 ml 99,9%-os metanolban szuszpendálunk.

A kapott szuszpenziót 30 percen át visszafolyató hűtő alatt forraljuk (fürdő-hőmérséklet kb. 80 °C), majd forrón szűrjük. A szűrletet 15 °C-ra hűtjük és hozzáadunk 1,6 ml 10 mólos vízmentes sósav oldatot, amelyet 99,9%-os metanollal készítettünk. Egy éjjelen át szobahőmérsékleten való állás közben szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, 3:1 (térf./térf.) dietiléter:acetoneleggyel mosunk és szobahőmérsékleten vákuumban 8 órán át szárítunk. 1,93 g L 17046 antibiotikum-metilészter-hidrokloridot kapunk.

Lényegében az 1. példa szerinti eljárást követve, de kiindulási anyagként az L 17046 antibiotikumot teikoplaninnal, teikoplanin A₂ 2. komponenssel, L 17054 antibiotikummal vagy ezek valamely keverékével helyettesítve hasonló kitermeléssel kapjuk a cím szerinti vegyületet (1,7—2,1 g, a reagenseknek a példa szerintivel azonos moláris mennyiségét alkalmazva).

2. példa

Az L 17046 antibiotikum-etilészter-hidroklorid előállítása

a) L 17046 antibiotikumból

3 g L 17046 antibiotikumot 112 ml etanolban szuszpendálunk és a szuszpenzióhoz keverés közben hozzáadunk 8 ml 4,5 mólos vízmentes sósavat. A reakcióelegyet 3 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk (fürdő-hőmérséklet kb. 85 °C), majd 5 °C-ra lehűtjük, a csapadékot összegyűjtjük, 5 ml etanollal, majd 200 ml dietiléterrel mossuk és egy éjjelen át szobahőmérsékleten vákuumban szárítjuk. 1,87 g cím szerinti nyers etilésztert kapunk.

Ezt a nyers terméket 180 ml vízben oldjuk és a kapott oldat pH-ját 0,1 N NaOH-dal 8,9-re állítjuk be. Szuszpenzió keletkezik, amelyet 200 ml 2:1 (térf./térf.) etilacetát:n-butanol eleggyel extrahálunk. A szerves réteget kiöntjük és a vizes réteget kétszer 200 ml n-butannal extraháljuk. Ezt a szerves kivonatot 60 ml vízzel mossuk és 45 °C-on vákuumban kb. 200 ml végtérfogatra töményítjük be. Dietiléter hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, 50 ml dietiléterrel mosunk és 50 ml vízben szuszpendálunk. Ezután 0,9 ml 1n sósavat adunk a szuszpenzióhoz és a kapott tiszta oldatot 200 ml n-butannal hígítjuk. Az elegyet 50 °C-on vákuumban kb. 60 ml végtérfogatra töményítjük be. 300 ml dietiléter hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk, 100 ml dietiléterrel mosunk és 100 ml 0,3 mólos vízmentes sósavban szuszpendálunk, amelyet etanollal készítettünk el. A kapott szuszpenziót vákuumban 35 °C-on kb. 40 ml végtérfogatra töményítjük be. A szilárd anyagot összegyűjtjük, 10 ml etanollal mossuk, majd 200 ml dietiléterrel és így 1,18 g L 17046 antibiotikum etilészter hidrokloridot kapunk.

b) L 17054 antibiotikumból

2 g L 17054 antibiotikumot 100 ml, absz. etanollal elkészített 0,6 mólos vízmentes sósavban szusz-

pendálunk és a szuszpenziót 3 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk, kb. 80 °C fürdő-hőmérséklet mellett, majd kb. 5 °C-ra hűtjük le és a 2.a) példa szerinti módon mossuk. 0,58 g, cím szerinti etilésztert kapunk.

Lényegében a 2.b) példa szerinti eljárást követve, de kiindulási anyagként az L 17054 antibiotikumot teikoplaninnal vagy teikoplanin A₂ 2. komponenssel helyettesítve a cím szerinti vegyületet kapjuk, hasonló kitermeléssel (kb. 0,4 — kb. 0,45 g), ugyanolyan moláris mennyiségű reagenst alkalmazva, mint az előző példában.

3. példa

Az L 17046 antibiotikum n-butilészter-hidroklorid előállítása

a) L 17046 antibiotikumból

3 g L 17046 antibiotikumot 85 ml n-butanolban szuszpendálunk és a szuszpenzióhoz keverés közben 60 °C-on hozzáadunk 5,6 ml butanolos 6,5 M sósavat. A gyorsan képződő tiszta oldatot kb. 60 °C-on kb. 3 órán át keverjük, majd 5—10 °C-ra hűtjük le, a vizes réteg pH-ját 1n NaOH-dal 8,2-re állítjuk be és 90 ml vízzel extraháljuk az elegyet. A szerves réteget elkülönítjük és 200 ml n-butanollal hígítjuk. A kapott zavaros butanolos oldatot 200 ml vízzel mossuk, majd vákuumban 50 °C-on kb. 60 ml végtérfogatra töményítjük be. 100 ml etilacetát hozzáadására szilárd anyag válik ki, amelyet összegyűjtünk és 250 ml vízben szuszpendálunk. A szuszpenziót kb. 30 percen át szobahőmérsékleten keverjük, majd 30 ml metanolt és 2 ml 1n sósavat adunk hozzá. A kapott tiszta oldat pH-ját 8,1-re állítjuk be 0,1n NaOH-dal és a reakcióelegyet 400 ml etilacetáttal extraháljuk. A szerves réteget elkülönítjük és kiöntjük. A vizes réteget kétszer extraháljuk 200-200 ml n-butannal és az összeöntött szerves réteghez 2 ml 1n sósavat adunk. A kapott butanolos oldatot kis térfogatra (kb. 40 ml) töményítjük be vákuumban 45 °C-on és kb. 120 ml dietiléter hozzáadásával szilárd anyagot csapunk ki, amelyet összegyűjtünk, dietiléterrel mosunk és vákuumban egy éjjelen át 45 °C-on szárítunk. 0,98 g L 17046 antibiotikum n-butilészter-hidrokloridot kapunk.

Lényegében a 3. példa szerinti eljárást követve, de kiindulási anyagként az L 17046 antibiotikumot teikoplaninnal, teikoplanin A₂ 2. komponenssel, L 17054 antibiotikummal vagy ezek valamely keverékével helyettesítve ugyanazt a cím szerinti vegyületet kapjuk, hasonló kitermeléssel (0,7—0,9 g, ugyanolyan moláris mennyiségben alkalmazva a reageneket, mint a példában).

4. példa

Az L 17046 antibiotikum-2-klór-etilészter-hidroklorid előállítása az L 17046 antibiotikumból

1,4 g L 17046 antibiotikumot 20 ml 2-klór-etanolban szuszpendálunk és a szuszpenzióhoz keverés közben 1—10 °C-on hozzáadunk 1 ml tionilkloridot. A reakcióelegyet szobahőmérsékletre melegítjük fel és egy napon át kevertetjük. Ezután lehűtjük —10 °C-ra, hozzáadunk 1 ml tionilkloridot

és az elegyet szobahőmérsékleten még egy napig keverjük. Ezután a reakcióelegyet 200 ml dietiléterbe öntjük, a kivált szilárd anyagot összegyűjtjük, dietiléterrel mossuk és vákuumban egy éjjelen át szobahőmérsékleten szárítjuk. 1,2 g nyers, cím szerinti terméket, 2-klór-etilésztert kapunk. Ezt a nyers terméket a 2.a) példa szerinti módon feldolgozva — amely 1,87 g nyers L 17046 antibiotikum-etilészter-hidroklorid tisztítására vonatkozik — 0,25 g L 17046 antibiotikum 2-klór-etilészter-hidrokloridot kapunk.

5. példa

Az L 17046 antibiotikum-4-klór-butilészter-hidroklorid előállítás

a) teikoplaninból

10 g teikoplanint 200 ml száraz tetrahydrofuranban szuszpendálunk és a szuszpenzió keverés közben száraz sósavat buborékolatunk át 12 órán keresztül, miközben a hőmérsékletet 45–50 °C-on tartjuk. A keletkező tiszta oldatot 900 ml dietiléterbe öntjük és a kicsapódó szilárd anyagot szűrővel összegyűjtjük, dietiléterrel mossuk és vákuumban, szobahőmérsékleten egy éjjelen át KOH pasztillák fölött szárítjuk. 9,5 g nyers, cím szerinti 4-klór-butilésztert kapunk. Ezt a nyers terméket 1,5 liter 3:2:1 (térf./térf./térf.) n-butanol:metanol:víz elegyben oldjuk, az oldathoz hozzáadunk 20 g szilanzált szilikagélt (0,06–0,2 mm, Merck Inc.) és az oldószerket vákuumban kb. 45 °C-on sztrippelelssel eltávolítjuk. A maradékot 400 ml 9:1 (térf./térf.) acetonnitril:víz elegyben szuszpendáljuk és felvisszük egy kromatográfiás oszlop tetejére, amelyet úgy készítettünk el, hogy 1,4 kg ugyanilyen szilanzált szilikagélt 1 liter pH 4,2 1%-os ammóniumfoszfáttal előzetesen egyensúlyba hoztunk és 200 ml 1:9 (térf./térf.) acetonnitril:víz eleggyel stabilizáltunk. Az oszlopot ezután 1 liter 1:9 acetonnitril:víz eleggyel mossuk, majd lineáris gradiens alkalmazása mellett — 10–50% (térf./térf.) acetonnitril vízben —, 400 ml/óra sebességgel 20 óra alatt kifejlesztjük. Kb. 20 ml-es frakciókat szedünk és ezeket HPLC-vel vizsgáljuk meg. Az L 17046 4-klór-n-butilésztert tartalmazó frakciókat (241.—320.) egyesítjük és 2,5 liter n-butanol és 4 ml 1 n sósav hozzáadása után kis térfogatra (kb. 50 ml) töményítjük be. Kb. 300 ml dietilétert adagolunk és a keletkező csapadékot összegyűjtjük, dietiléterrel mossuk és vákuumban szobahőmérsékleten egy éjjelen át szárítjuk KOH pasztillák és P₂O₅ fölött. 2,1 g L 17046 antibiotikum 4-klór-butilészter-hidrokloridot kapunk.

Lényegében az 5.a) példa szerinti eljárást követve, de kiindulási anyagként a teikoplanin komplexet teikoplanin A₂ 2. komponenssel, L 17054 antibiotikummal, L 17046 antibiotikummal vagy ezek valamely keverékével helyettesítve ugyanezt a cím szerinti vegyületet kapjuk, lényegében azonos kitermeléssel (a reagensok ugyanolyan moláris mennyiségét alkalmazva, mint a példában).

6. példa

Az L 17046 antibiotikum N-BOC származékának előállítása

3,8 g (2,42 mmól) L 17046 antibiotikumot 60 ml desztillált DMF-ban oldunk és az oldathoz hozzáadunk 1,02 g (3,3 mmól) 2,4-5,-triklór-terc-butilkarbonátot és 2,12 ml trimetilamint. A keveréket 48 órán át szobahőmérsékleten tartjuk és a reakció lezajlását HPLC-vel követjük. A reakcióelegyet ezután 240 ml vízzel hígítjuk, a pH-t 1 n HCl hozzáadásával 4-re állítjuk be és az elegyet (összesen 300 ml) n-butanollal extraháljuk. A szerves fázist 40 ml vízzel mossuk és csökkentett nyomáson kb. 40 ml maradék-térfogatra töményítjük be. Ezt a maradékot 300 ml éterrel hígítjuk és egy éjjelen át hűtjük. A kicsapódó szilárd anyagot szűrővel összegyűjtjük, éterrel mossuk és vákuumban 50 °C-on szárítjuk. Kitermelés: 4,2 g tiszta, cím szerinti vegyület. Képlet: C₂₇H₃₆Cl₂N₈O₃₀ Molekulasúly: 1664,52 Számított: C 55,56 H 4,6 N 6,7 Cl 4,25 % Talált: 54,18 5,40 8,18 4,12 %

7. példa

Az L 17046 antibiotikum N-BOC származéka benzilészterének előállítása

500 mg (0,333 mmól) L 17046 antibiotikum N-BOC származékot, 50 mg (0,49 mmól) KHCO₃-ot és 80 µl (0,66 mmól) benzilbromidot 7 ml desztillált DMF-ban oldunk és a reakcióelegyet 24 órán át keverjük. A reakcióelegyet 60 ml vízzel hígítjuk, a pH-t ecetsavval kb. 5-re állítjuk be és a reakcióterméket kétszer extraháljuk 50-50 ml 2:1 (térf./térf.) etilacetát:n-butanol eleggyel. A szerves réteget elkülönítjük, 30 ml vízzel mossuk és csökkentett nyomáson 10 ml-re töményítjük be. Ezt a terméket a továbbiakban 100 ml etiléterrel hígítjuk. A kicsapódó szilárd anyagot szűrővel összegyűjtjük, etiléterrel mossuk és egy éjjelen át vákuumban szárítjuk. 450 mg tiszta, cím szerinti vegyületet kapunk.

8. példa

Az L 17046 antibiotikum benzilészter-trifluoracetátjának előállítása

450 mg L 17046 antibiotikum-BOC származék-benzilésztert — amelyet a 7. példa szerint állítottunk elő — 2,5 ml trifluorecetsavban oldunk és az oldatot 15 percen át szobahőmérsékleten keverjük. A reakcióelegyet 100 ml etiléterrel hígítjuk és a kicsapódó szilárd anyagot összegyűjtjük, éterrel mossuk és vákuumban egy éjjelen át 50 °C-on szárítjuk. 400 mg cím szerinti tiszta vegyületet kapunk.

Képlet: C₂₇H₃₆O₂₃N₈Cl₂HF₃O₂

Molekulasúly: 1606,3

Számított: C 56,08 H 4,04 N 6,97 Cl 4,41%

Talált: 54,58 4,3 7,03 4,17%

9. példa

Az L 17046 antibiotikum N-BOC származéka 4-metil-benzilészterének előállítása

500 mg (0,333 mmól) L 17046 antibiotikum N-BOC származékot 50 mg (0,499 m-egyenértéknyi) KOH-dal és 90 µl p-metil-benzilkloriddal együtt 7 ml desztillált DMF-ban oldunk és az oldatot egy éjjelen át szobahőmérsékleten keverjük. Ezután to-

vábbi reagens-mennyiségeket — 90 µl p-metil-benzilkloridot és 20 mg KHCO₃-ot — adagolunk és a reakcióelegyet 7 órán át 50 °C-on, majd egy éjjelen át szobahőmérsékleten tartjuk. A reakcióelegyet 70 ml vízzel hígítjuk, a pH-t ecetsavval kb. 5-re állítjuk be, majd a keveréket kétszer extraháljuk 50-50 ml 2:1 (térf./térf.) etil-acetát:n-butanol eleggyel. A szerves réteget elkülönítjük, 30 ml vízzel mossuk és 50 °C-on kis térfogatra töményítjük be. A szilárd maradékot 100 ml dietiléterrel eldörzsöljük, összegyűjtjük, dietiléterrel mossuk és vákuumban 50 °C-on szárítjuk. 400 mg cím szerinti vegyületet kapunk.

10. példa

Az L 17046 antibiotikum 4-metil-benzilészterének előállítása

480 mg, a 9. példa szerint előállított L 17046 antibiotikum 4-metil-benzilésztert szobahőmérsékleten 2,5 ml trifluoecetsavban oldunk és ezt az elegyet 15 percen át szobahőmérsékleten keverjük. A reakciót 100 ml dietiléterrel való hígítással leállítjuk és a szilárd anyagot összegyűjtjük, éterrel mossuk és vákuumban szárítjuk. 420 g nyers anyagot kapunk, amelyet pillanatkrómográfiával tisztítunk. Az oszlop 70 g LiChroprep RP 8-at (szilikagél C₈-alkilszármazék; 40–63 µm; Merck Co.) tartalmaz és a kifejesztést lineáris grádienssel — 25–50% CH₃CN vízben — végezzük. A cím szerinti tiszta származékot tartalmazó frakciókat egyesítjük, n-butanolt adagolunk és az oldószereket vákuumban 45 °C-on ledesztilláljuk. A maradékot dietiléterrel eldörzsöljük, majd összegyűjtjük, éterrel mossuk és vákuumban 40 °C-on szárítjuk. Szabad bázisként 150 mg tiszta, cím szerinti vegyületet kapunk.

11. példa

Az L 17046 antibiotikum N-BOC származéka 2-hidroxi-etilészterének előállítása

500 mg (0,333 mmól) L 17046 antibiotikum N-BOC származékot, 50 mg KHCO₃-at és 50 µl 2-bróm-etanolt 7 ml desztillált DMF-ban oldunk és az oldatot szobahőmérsékleten keverjük. Ezután 98 órás időtartam alatt több részletben hozzáadunk összesen 230 µl 2-bróm-etanolt és 75 mg KHCO₃-at. A reakció lefolyását HPLC-vel követjük. A reakcióelegyhez hozzáadunk 70 ml vizet, a pH-t ecetsav hozzáadásával kb. 5-re állítjuk be, és az elegyet kétszer extraháljuk n-butanollal (50 ml). A szerves réteget 30 ml vízzel mossuk és csökkentett nyomáson 10 ml-re töményítjük be, majd dietilétert adagolunk és a szilárd anyagot összegyűjtjük, mossuk és vákuumban szárítjuk. 450 mg cím szerinti tiszta vegyületet kapunk.

12. példa

Az L 17046 antibiotikum 2-hidroxi-etilészterének előállítása trifluoacetát só alakban

450 mg L 17046 antibiotikum-2-hidroxi-etilésztert — amelyet a 11. példa szerint állítottunk elő —

2,5 ml trifluoecetsavban oldunk és az oldatot 15 percen át 20 °C-on keverjük, majd hozzáadunk 100 ml dietilétert. A kicsapódó szilárd anyagot összegyűjtjük, éterrel mossuk és egy éjjelen át vákuumban 50 °C-on szárítjuk. 390 mg cím szerinti tiszta vegyületet kapunk.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az L 17046 antibiotikum (I) általános képletű észter-származékai és ezek gyógyászati szempontból elfogadható savaddíciós sói előállítására — e képletben

R jelentése 1—4 szénatomos alkil-, hidroxi-(1—4 szénatomos)-alkil-, (1—3 szénatomos)-alkoxi-(1—4 szénatomos)-alkil-, halogén-(1—4 szénatomos)-alkil-, fenil-(1—4 szénatomos)-alkil- vagy a benzolgyűrűben 1—4 szénatomos alkilcsoporttal helyettesített fenil-(1—4 szénatomos)-alkil-csoport, és

R¹ jelentése hidrogénatom vagy (2—5 szénatomos)-alkanoil-oxi-karbonil-csoport,

A és M jelentése hidrogénatom, B jelentése N-acetil-β-D-glukozaminil-csoport,

azzal a feltétellel, hogy alkilészterek esetében ennek az alkilláncnak a proximális szénatomja nem lehet tercier szénatom, *azzal jellemezve*, hogy

a) egy teikoplanin komplexet, ennek egy tiszta komponensét vagy a komponensek bármely arányú elegyét szelektív hidrolízis után, vagy egy olyan (I') általános képletű vegyületet, amelyben

R² jelentése hidrogénatom

R¹ jelentése a tárgyi körben megadott,

A¹ jelentése hidrogénatom vagy egy N-(10—11 szénatomos alifás acil)-β-D-glukozaminil-csoport,

B jelentése N-acetil-β-D-glukozaminil-csoport,

M¹ jelentése hidrogénatom vagy egy α-D-mannozil-csoport,

azzal a feltétellel, hogy ha A jelentése hidrogénatom, M-nek ugyancsak hidrogénatomot kell jelentenie, amely vegyületekben valamennyi cukor-maradék O-glukozid-kötésekkel kapcsolódik a peptid-maghoz, egy sav, előnyösen egy ásványi sav jelenlétében, —15 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten, ROH általános képletű alkohol — e képletben

R jelentése a tárgyi körben megadott — feleslegével reagáltatunk, vagy

b) olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, melyek képletében R jelentése a tárgyi körben megadott a halogén-(1—4 szénatomos)-alkil-csoport kivételével, R¹, A, M és B jelentése a tárgyi körben megadott,

egy N-védett L 17046 antibiotikum származékot egy RX általános képletű vegyülettel — e képletben R jelentése a tárgyi körben megadott és X jelentése klór-, bróm- vagy jódatom — közömbös szerves poláris aprotikus oldószerben, előnyösen egy hidrogénhalogenid akceptor jelenlétében, —5 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten reagáltatunk, majd kívánt esetben a 2—5 szénatomos alkanoil-oxi-karbonil-csoportot, vagy adott esetben az amino-védő-

csoportot eltávolítjuk, kívánt esetben az a) vagy b) eljárás során kapott terméket ismert módon gyógyászati szempontból elfogadható savaddíciós sóvá alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti a) eljárás, *azzal jellemezve*, hogy savas katalizátorként sósavat alkalmazunk és a reakció hőmérsékletét 50 °C és 80 °C közé állítjuk be.

3. Az 1. igénypont szerinti a) eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként olyan (I') általános képletű vegyületet alkalmazunk, amelyben A', M', R' és R¹ jelentése hidrogénatom, B jelentése az 1. igénypontban megadott, és az észterezési reakciót tionilklorid jelenlétében folytatjuk le (-15 °C) és a szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten.

4. Az 1. igénypont szerinti b) eljárás, *azzal jellemezve*, hogy közömbös szerves poláris aprotikus oldószerként dimetilformamidot alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti b) eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként terc.-butiloxi-karbonil-csoporttal védett L 17046 antibiotikumot alkalmazunk.

5 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás (I) általános képletű vegyületek körébe tartozó L 17046 n-butilészter, L 17046 etilészter, L 17046 benzilészter, L 17046 2-klór-etilészter és L 17046 4-klór-1-butilészter előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően helyettesített kiindulási anyagokat alkalmazunk.

10 7. Eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (I) általános képletű vegyületet — ahol R, R¹, A, M és B jelentése az 1. igénypontban megadott — gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyagokkal és adott esetben adalékanyagokkal összekeverjük és gyógyszerkészítménnyé dolgozzuk.

3 lap rajz

Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00
A 61 K 37/02



Nemzetközi osztályozás: C 07 K 9/00
A 61 K 37/02

