



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr

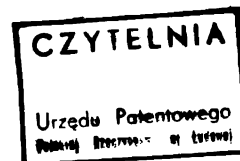
Int. Cl.³ C07G 11/00
C12P 29/00

Zgłoszono: 05.12.79 (P. 220169)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 06.10.80

Opis patentowy opublikowano: 01.07.1982



Twórcy wynalazku: Maciej Domaradzki, Teresa Czajkowska, Lidia Paśś,
Alina Marciniak

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania nowych rozpuszczalnych w wodzie pochodnych stafilocokcyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych rozpuszczalnych w wodzie acylowanych pochodnych stafilocokcyny w postaci chlorowodoroków. Stafilocokcyna jest substancją należącą do grupy bakteriocyn hamujących wzrost różnych bakterii chorobotwórczych, w szczególności szeregu bakterii opornych na działanie znanych antybiotyków, zwłaszcza gronkowców.

Zakażenia gronkowcami stanowią jeden z poważniejszych problemów w lecnictwie, bowiem powodują bardzo wiele komplikacji w leczeniu pooperacyjnym, w położnictwie i innych, jak również zakażenia te stwarzają szereg poważnych problemów w praktyce weterynaryjnej.

Sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym zwanej stafilocokciną, opisany został w polskich opisach patentowych nr 70 632 oraz nr 105 748.

Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie stafilocokcyna może mieć ograniczone zastosowanie. Substancja otrzymywana sposobem według polskiego opisu patentowego nr 70 632 wykazywała wprawdzie pewną rozpuszczalność w wodzie, wynikającą z dużej zawartości soli mineralnych, jednakże zawartość substancji nieorganicznych, głównie chlorku sodowego i soli wolframowych, oznaczonych jako popiół po spalaniu, wynosiła około 40%.

W przypadku ewentualnego usunięcia soli mineralnych następowało znaczne pogorszenie rozpuszczalności w wodzie. Ponadto cukry występujące w preparacie, w ilości około 5%, należy traktować jako zanieczyszczenia. Również nierozpuszczalną substancję otrzymuje się sposobem według polskiego opisu patentowego nr 105 748.

Na podstawie znajomości składu aminokwasowego stafilocokcyny stwierdzono możliwość otrzymania jej pochodnych na drodze acylowania występujących w cząsteczce grup funkcyjnych w postaci soli z kwasem chlorowodorowym. Okazało się, że otrzymane sposobem według niniejszego wynalazku chlorowodoroki pochodnych stafilocokcyny charakteryzują się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie tworząc roztwory właściwe. Uzyskane na drodze procesu acylowania pochodne stafilocokcyny w postaci chlorowodoroków, przy zachowaniu antybiotycznych właściwości substancji, wykazują bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie w stężeniach 50 mg/ml i powyżej. Otrzymanie wodnego roztworu substancji antybiotycznej umożliwia zastosowanie jej w wielu postaciach farmaceutycznych, jak również znacznie ułatwia dalszy proces oczyszczania przy sporządzaniu form farmaceutycznych do podawania drogą pozajelitową, przy których wymagana jest zwłaszcza jałowość preparatów.

Sposób wytwarzania pochodnych stafilocokcyny według niniejszego wynalazku polega na zawieszeniu stafilocokcyny w suchym, aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, taki jak dwumetyloacetamid, po czym do zawiesiny dodaje się katalityczną ilość N-metylomorfoliny i przy mieszaniu w temperaturze poniżej temperatury pokojowej, wkrapla nadmiar chlorku kwasowego stanowiącego środek acylujący oraz jednocześnie donor chlorowodoru. Powolne uwalnianie się chlorowodoru, w trakcie zachodzącej reakcji, pozwala na otrzymywanie soli z chlorowodorem preparatu białkowego bez jednoczesnego rozkładu cząsteczek białka.

Po zakończeniu reakcji, to jest po całkowitym rozpuszczeniu zawiesiny mieszaniną reakcyjną, sący się i przy równoczesnym mieszaniu wlewa do rozpuszczalnika organicznego, takiego jak aceton lub metyloetyloketon, po czym następuje wytrącenie produktu w postaci osadu. Osad odsąca się, przemywa rozpuszczalnikiem organicznym i suszy. Zawartość zanieczyszczeń, na które składają się substancje nieorganiczne wynosi około 1% i poniżej. Sposób prowadzenia procesu gwarantuje zachowanie pierwotnego ciężaru cząsteczkowego 10 000–30 000. Zawartość cukrów w opisanych nowych pochodnych waha się od 25 do 40 mcg/mg i jest w przybliżeniu o 25–30% niższa niż w wyjściowych preparatach stafilocokcyny. Toksyczność pochodnych oznaczanych przy użyciu myszy stada cutbred IpF: SWISS przy podawaniu dożylnym 1% roztworu wodnego i oznaczona jako LD₅₀ wynosi od 130 do 200 mg/kg.

W poniższej tablicy I przedstawiono wartości najmniejszych stężeń hamujących MIC (mcg/mg) rozpuszczalnych w wodzie soli pochodnych stafilocokcyny, otrzymanych: z kompleksu acylowanego chlorkiem piwaloilu (A), ze stafilocokcyny acylowanej chlorkiem piwaloilu (B), ze stafilocokcyny acylowanej chlorkiem o-chlorobenzoilu (C) w stosunku do stafilocokcyny wyjściowej (D) wobec 13 wybranych szczepów bakteryjnych.

T a b l i c a I

Minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych bakteriocy

Lp. Drobnoustrój	A	B	C	D
1 Staph. aureus IAW 150	1,57	0,2	0,2	0,05
2 Staph. aureus 209 P	50,0	6,25	12,5	6,25
3 Staph. aureus 5664	100,0	50,0	50,0	12,5
4 Staph. aureus 1451	50,0	12,5	12,5	6,25
5 Staph. aureus 1469	100,0	25,0	25,0	25,0
6 Staph. aureus 1491	100,0	25,0	25,0	12,5
7 Staph. aureus 989	100,0	25,0	25,0	12,5
8 Staph. aureus 14/26	25,0	12,5	6,25	3,13
9 Staph. aureus 23	12,5	3,13	6,25	1,57
10 Staph. aureus 3613	100,0	12,5	12,5	6,25
11 Micrococ. pyog. 8244	50,0	12,5	12,5	3,13
12 Micrococ. pyog. 8588	50,0	6,25	12,5	6,25
13 Micrococ. flavus 10240	1,57	0,2	0,2	0,025

Wyższe wartości MIC dla pochodnej otrzymanej z acylowania kompleksu stafilocokcyny wynikają ze znacznie niższej aktywności, wyrażonej ilością jednostek w miligramie substancji, oznaczonej wobec testowego szczepu Micrococ. flavus ATCC 10 240 (szczep bakteryjny stosowany do standardowych oznaczeń stafilocokcyny). Aktywność kompleksu stafilocokcyny z siarczanem amonu i alunem glinowo-potasowym jest 5–6 razy niższa od aktywności stafilocokcyny, stosowanej jako substrat. Dobra rozpuszczalność w wodzie pozwala na rozszerzenie dróg i sposobów podawania leku, zarówno w lecznictwie ludzkim jak i w weterynarii.

T a b l i c a I I

Rozpuszczalność w wodzie i soli fizjologicznej
pochodnych stafilocokcyny (w temperaturze 23°C)

Pochodna	Woda mg/ml	Roztwór soli fizjologicznej mg/ml
A	60	55
B	100	100
C	100	95
Stafilocokcyna	1	2

Znaczenie symboli A, B, C podano w tablicy I.

Przykład I. Wytrącony z brzezki pofermentacyjnej i wysuszony kompleks stafilocokcyny z siarczanem amonu i alunem glinowo-potasowym w ilości 3 g zawieszono w 25 ml suchego dwumetyloformamidu. Do zawiesiny dodano 1 mikrokroplę N-metylomorfoliny i przy mieszaniu w temperaturze 5°C wkroplono 3 ml chlorku piwaloilu w 3 ml dwumetyloacetamidu. Zawiesina ulega rozpuszczeniu w ciągu 30 minut. Po reakcji acylowania w temperaturze 5°C w ciągu dalszych 30 minut roztwór przesączono bezpośrednio do 300 ml acetonu. Wydzielony osad odsączono, przemyto 3 razy po 25 ml acetonu i suszono w eksykatorze próżniowym na P₂O₅. Otrzymano 2,2 g jasnokremowego osadu, który rozpuszczono w 20 ml wody, oczyszczono węglem aktywnym i uzyskany roztwór poddano liofilizacji. Końcowa wydajność związku wynosi 2,1 g. Substancja rozpuszcza się w wodzie w stężeniu co najmniej 50 mg/ml. Aktywność wobec testowego szczepu *Micrococ. flavus* ATCC 10 240 wynosi 1500 j/ml. Zawartość popiołu 1,29%, wilgoci — 6,7%, chlorowodoru 6,15%, zawartość azotu całkowitego 16,07% oraz zawartość azotu amoniakalnego 4,74% (w przeliczeniu na preparat białkowy) pH 1% roztworu wodnego 2,56.

Przykład II. Do zawiesiny 5 g stafilocokcyny w 40 ml dwumetyloacetamidu dodano katalityczną ilość N-metylomorfoliny i w temperaturze 5°C wkroplono przy mieszaniu 4 ml chlorku piwaloilu w 4 ml dwumetyloacetamidu. Po mieszaniu w ciągu godziny w temperaturze 5°C roztwór przesączono dwukrotnie przez gęsty sączek i przy intensywnym mieszaniu wiano do 500 ml ketonu metyloetylowego. Wydzielony osad odsączono, przemyto 3 razy po 30 ml acetonu i suszono nad P₂O₅ w eksykatorze próżniowym. Otrzymano 3,4 g kremowego produktu o aktywności wobec *Micrococ. flavus* ATCC 10 240 wynoszącej 9200 j/mg. Rozpuszczalność w wodzie — co najmniej 50 mg/ml. Zawartość popiołu 1,03%, wilgoci 5,23%, chlorowodoru 3,2%; zawartość azotu całkowitego 13,4% oraz zawartość azotu amoniakalnego 1,89% (w przeliczeniu na preparat białkowy) pH 1% roztworu wodnego 2,93.

Przykład III. Powtórzono postępowanie z przykładu II w miejsce chlorku piwaloilu 4 ml chlorku o-chlorobenzoiłu. Otrzymano 3,6 g kremowego produktu. Rozpuszczalność w wodzie wynosiła co najmniej 50 mg/ml. Aktywność pochodnej wobec *Micrococ. flavus* ATCC 10 240 wynosiła 8950 j/mg. Zawartość popiołu 1,00%, wilgoci 6,3%, chlorowodoru 3,45%; zawartość azotu całkowitego 13,8% oraz zawartość azotu amoniakalnego 2,27% (w przeliczeniu na preparat białkowy), pH 1% roztworu wodnego 2,70.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania nowych rozpuszczalnych w wodzie pochodnych stafilocokcyny, **znamienny tym**, że nierozpuszczalną w wodzie stafilocokcynę lub jej kompleks z siarczanem amonu i alunem glinowo-potasowym poddaje się reakcji acylowania z chlorkiem kwasowym w rozpuszczalniku organicznym, w czasie 60 minut, w temperaturze 5°C, po czym produkt wydziela się metodą wytrącania w rozpuszczalniku organicznym i suszy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w suchym, aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, takim jak dwumetyloacetamid lub dwumetyloformamid.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako chlorek kwasowy stosuje się chlorek piwaloilu lub o-chlorobenzoiłu.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do wytrącania rozpuszczalnej pochodnej stafilocokcyny z mieszaniny reakcyjnej stosuje się rozpuszczalnik organiczny, taki jak aceton lub keton metyloetylowy.