



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P921069 A2

HR P921069 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁵: **A 61 K 47/48**
C 07 H 19/01

(21) Broj prijave: P921069

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 16.10.1992.

(43) Datum objave prijave patenta: 31.12.1994.

(31) Broj prve prijave: 07/777,864 (32) Datum podnošenja prve prijave: 16.10.1991. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:

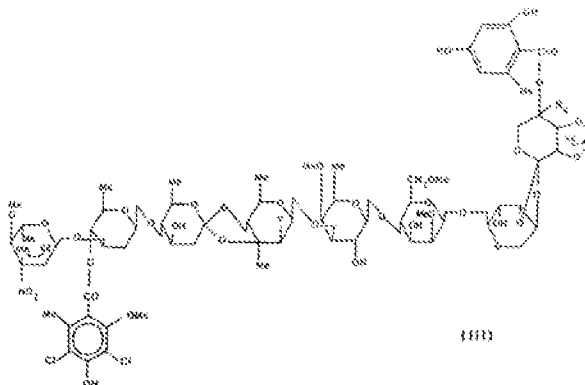
(72) Izumitelj:

Shering Corporation, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, 07033 NJ, US
Mahesh Patel, 42 Brentwood Drive, Verona, 07044 NJ, US
Vincent P. Gullo, 33 Darren Woods Drive, Liberty Corner, 07938 NJ, US
Roberta Hare, 27 Kalson Rd, Gilette, 07933 NJ, US
David Loebenberg, 10 Sylvan Rd, Monsey, 10952 NY, US
James B. Morton, 141 Holmes Av., Belleville, 07109 NJ, US
George H. Miller, 25 Tara Lane, Montville, 07045 NJ, US
Heewon Y. Kwon, 11 Palm Court, Edison, 08820 NJ, US
Hraste & Partneri odvjetničko društvo, Zagreb, HR

(74) Zastupnik:

(54) Naziv izuma: **PREPARATI SOLI LIPOFILNIH OLIGOSAHARIDNIH ANTIOBIOTIKA**

(57) Sažetak: Opisani su farmaceutski prihvatljivi preparati koji sadrže lipofilni oligosaharidni antibiotik, na primjer antibiotik everninomicinskog tipa formule (III), najmanje jednu stehiometrijsku količinu lužine, na primjer N-metilglukamina, određenu količinu na primjer hidroksipropil-beta-ciklodekstrina i, po potrebi, farmaceutski prihvatljivo neionsko površinski aktivno sredstvo, na primjer Tween 80. Također su opisane farmaceutske formulacije koje sadrže navedene preparate, metode za tretiranje i prevenciju bakterijskih infekcija kod životinja, a naročito ljudi, kao i metode za sprečavanje pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma uz istodobno davanje takovoj životinji antiinfektivne količine lipofilnog oligosaharidnog antibiotika kao što je onaj predstavljen formulom (III). Obuhvaćeno je i korištenje opisanih preparata u izradi lijekova za spomenuto tretiranje ili prevenciju.



HR P921069 A2

Pozadina izuma

Sadašnji izum se odnosi na nove preparate koji sadrže lipofilne oligosaharidne antibiotike, na farmaceutske formulacije koje sadrže ovakve preparate, na postupke za njihovo dobivanje, kao i na metode u kojima se navedene farmaceutske formulacije koriste za tretiranje i/ili prevenciju infekcija mikrobima kod životinja, a naročito kod sisavaca kao što je čovjek.

Lipofilni oligosaharidni antibiotici uključujući, na primjer, everninomicine, kuramicine, avilamicine i flambamicine, pripadaju obitelji antibiotika koji sadrže barem jedan kiseli fenolni vodik i dvije ortoesterske veze povezane sa ugljikohidratnim skupinama. Vidjeti, na primjer, A.K. Ganguly, u "Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology", (1978), Vol. 2, str. 205-209, treće izdanje, John Wiley & Sons, kao i W.D. Ollis i suradnici, Tetrahedron (1979), Vol. 35, str. 105-127. Ovi lipofilni oligosaharidni antibiotici pokazuju biološko djelovanje širokog spektra protiv gram pozitivnih i nekih gram negativnih bakterija u različitim testovima in vitro, kao i aktivnost in vivo u životinjskim modelima kao što su miševi, ali do danas nije na raspolaganju niti jedna farmaceutski prihvatljiva formulacija takvih antibiotika za davanje in vivo. Tako smo, na primjer, primijetili da davanje ovih lipofilnih oligosaharidnih antibiotika injekcijom dovodi do nepoželjnog reakcijskog sindroma. Izraz "nepoželjni reakcijski sindrom", kako je ovdje upotrijebljen, znači da su kod životinja, kao što su miševi, nakon parenteralnog davanja lipofilnih oligosaharidnih antibiotika, zapaženi simptomi sljedećeg tipa: nedostatak koordinacije, ataksija, ležanje na boku, uriniranje, krutost zadnjih nogu, teško disanje, kao i srčani zastoj. Sve u svemu, nisu poznati farmaceutski prihvatljivi preparati lipofilnih oligosaharidnih antibiotika koji bi omogućili sigurno i djelotvorno korištenje ovih snažnih antibiotika kod životinja, uključujući i sisavce kao što je čovjek.

Ciklodekstrini predstavljaju modificirane škrobove dobivene od glukopiranoznih jedinica i obuhvaćaju α -ciklodekstrin, koji se sastoji od šest glukopiranoznih jedinica, β -ciklodekstrin, koji se sastoji od sedam glukopiranoznih jedinica i γ -ciklodekstrin, koji se sastoji od osam glukopiranoznih jedinica. α , β i γ -ciklodekstrini i njihovi derivati imaju unutarnju površinu, ili šupljinu, koja je lipofilna i vanjsku površinu koja je hidrofilna. Ova kombinacija hidrofobne šupljine i hidrofilne vanjske površine dovela je do upotrebe ciklodekstrina i njihovih derivata za molekularno kompleksiranje ili za kapsuliranje mnogih hidrofobnih i/ili nestabilnih lijekova prikladnih dimenzija, čime se poboljšava topivost, stabilnost i biološka pristupačnost takvih lijekova. Derivate α , β i γ -ciklodekstrina, na primjer hidroksipropil- β -ciklodekstrine, opisao je Jozsef Szejtli u Pharmaceutical Technology, lipanj 1991, str. 36-40.

Kompleksi α -, β - i γ -ciklodekstrina, njihove smjese i derivati opisani su, na primjer, u Američkom patentu 4,983,586 N. Bodor-a. Bodor-ov Američki patent 4,983,586 opisuje postupak za smanjenje broja slučajeva taloženja lipofilnih ili u vodi labilnih lijekova, do čega, nakon parenteralnog davanja, dolazi na mjestu ubrizgavanja i/ili u njegovoj blizini, i/ili u plućima. Postupak se sastoji u tome što se lijek parenteralno daje u obliku vodene otopine koja sadrži veliku količinu, na primjer od 20 do oko 50 mas.% hidroksipropil- β -ciklodekstrina.

Joseph Pitha, u Američkom patentu 4,727,064 i u The International J. of Pharmaceutics, (1986) 29, 73-82, opisuje korištenje koncentriranog, tj. 40-60 mas.% vodene otopine hidroksipropil- β -ciklodekstrina za solubiliziranje različitih lijekova kao što su acetaminofen, polni steroidi, srčani glukozidi kao što je digoksin, kao i retinoinjska kiselina i njene kisele soli. Vidjeti također Pitha-in Američki patent 4,596,795, u kome se opisuje davanje polnih hormona, testosterona, progesterona i estradiola kao kompleksa sa poli- β -ciklodekstrinom ili hidroksipropil- β -ciklodekstrinom.

Kod Bodor-a se, kao ni kod Pitha-e, ne spominju fenoli niti lipofilni oligosaharidni antibiotici.

Međunarodna patentna prijava PCT/EP84/00417 tvrtke Janssen Pharmaceutica N.V., objavljena pod međunarodnim brojem WO 85/02767 4. srpnja 1985., opisuje farmaceutske preparate koji sadrže komplekse u vodi nestabilnih ili slabo topivih lijekova sa djelomično eterificiranim β -ciklodekstrinom (" β -CD"), formule (β -CD)-OR, gdje ostatak R predstavlja hidroksietil, hidroksipropil, dihidroksipropil, a dio ostatka R mogu po potrebi biti i alkil skupine, naročito metil ili etil.

Ukoliko molekula lijeka ima lužinske ili kiselinske skupine koje bi se mogle koristiti za povećavanje topljivosti građenjem soli, Međunarodna publikacija WO 85/02767 ukazuje da oblikovanje soli po pravilu dovodi do smanjene djelotvornosti ili lošije kemijske stabilnosti. Građenje soli kao način da se solubiliziraju kiseli i lužnati spojevi koji su slabo topljivi u vodi se, prema tome, ne preporučuje. U opisu nema pomena o lipofilnim oligosaharidnim antibioticima niti o preparatima iz sadašnjeg izuma.

Različite vrste bakterija kao što su gram-pozitivne koke, na primjer streptokoke i enterokoke, kao i stafilokoke otporne i neotporne na meticilin, postali su otporni na komercijalno korištene antibiotike, na primjer na vankomicin.

Prema tome, prisutna je potreba za farmaceutski prihvatljivim preparatima za tretiranje bakterijskih infekcija, uključujući infekcije stafilokokama otpornim i neotpornim na meticilin, kao i bakterijama otpornim na vankomicin. Također postoji potreba za farmaceutski prihvatljivim preparatima koji sadrže lipofilne oligosaharidne antibiotike aktivne protiv širokog spektra podložnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih infekcija, a naročito za farmaceutskim preparatima prilagođenim za parenteralno davanje kod kojih se neće javljati nepoželjni reakcijski sindrom.

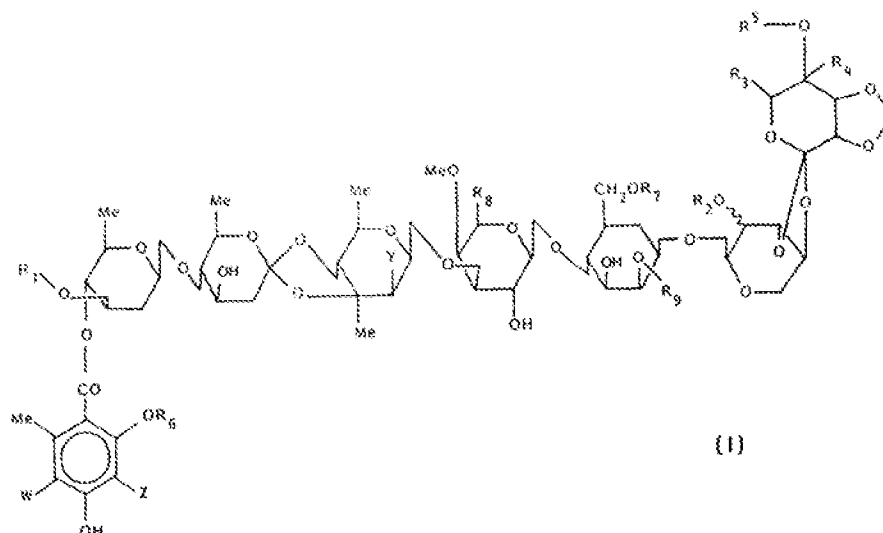
Kratak sažetak izuma

Mi smo, sa iznenađenjem, otkrili način na koji lipofilni oligosaharidni antibiotici, sa dobrim antibakterijskim djelovanjem protiv podložnih gram-pozitivnih i/ili gram-negativnih bakterijskih infekcija, mogu se davati životinjama, a naročito sisavcima kao što je čovjek, oboljelim od podložnih gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterijskih infekcija, pri čemu se osigurava djelotvoran tretman i/ili prevencija ovih infekcija uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma. Ovaj način se sastoji u kombiniranju lipofilnog oligosaharidnog antibiotika najmanje sa približno jednom stehiometrijskom količinom odgovarajuće lužine i sa određenom količinom sredstva kao što je hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrin sa oko 2 do 15 hidroksipropil skupina po molekulu ciklodekstrina. Koristi se količina ciklodekstrina koja je dovoljna za postizanje djelotvornog transfera lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje, uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma.

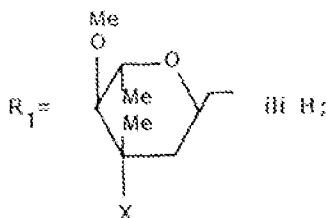
Sažetak izuma

Sadašnji izum osigurava preparat koji sadrži:

(a) lipofilni oligosaharidni antibiotik predstavljen formulom (I):



u kojoj je:

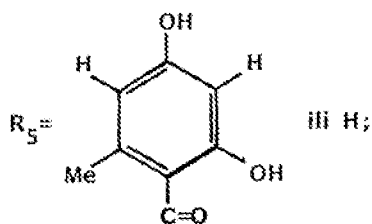


X predstavlja NO₂, NO, NH₂, NHCOCH₃, NHOH, NH(C₂H₅), N(C₂H₅)₂, OH ili vodik;

R₂ je CH₃, COCH(CH₃)₂, COCH₃, CO(CH₂)₃CH₃, COCH₂CH₃ ili vodik;

R₃ je CH₃ ili vodik;

R₄ predstavlja COCH₃, CH(OCH₃)(CH₃), CH(OH)CH₃ ili vodik;



R₆ je CH₃ ili vodik;

R₇ je CH₃ ili vodik;

R₈ predstavlja CH₃, CH₂OH ili vodik;

R₉ je CH₃ ili vodik;

Y je OH, CH₃ ili vodik;

W je klor ili vodik; i

Z je klor ili vodik.

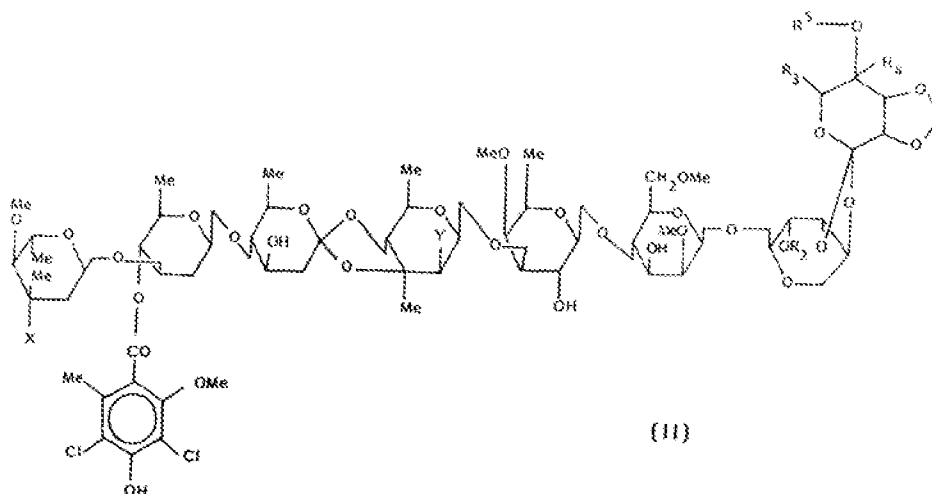
(b) najmanje jednu približno stehiometrijsku količinu lužine koja je sposobna da gradi farmaceutski prihvatljivu sol sa lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom formule (I);

(c) određenu količinu dimetilsulfoksida, glicerola, sorbitan mono-9-oktadekanoatnog derivata poli(oksi-1,2-etandiila), ili hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina u kome je prosječan broj hidroksipropil supstituenata u navedenom α , β ili γ -ciklodekstrinu u opsegu od oko 2 do oko 15, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

(d) od 0 do 6.0 mas.% [na bazi količine antibiotika formule (I)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

Poželjnije, sadašnji izum osigurava preparat koji sadrži:

(a) lipofilni oligosaharidni antibiotik predstavljen formulom (II):



u kojoj:

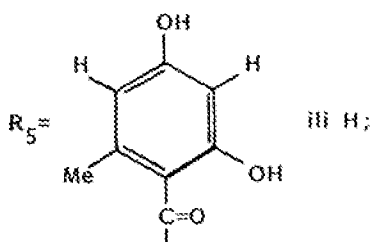
X predstavlja NO₂, NO, NHOH, NH₂, NHCOCH₃, NHC₂H₅, N(C₂H₅)₂, OH ili vodik;

Y je OH, CH₃ ili vodik;

R₂ je CH₃ ili vodik;

R₃ je vodik;

R₄ predstavlja CH(OCH₃)(CH₃) ili vodik; i



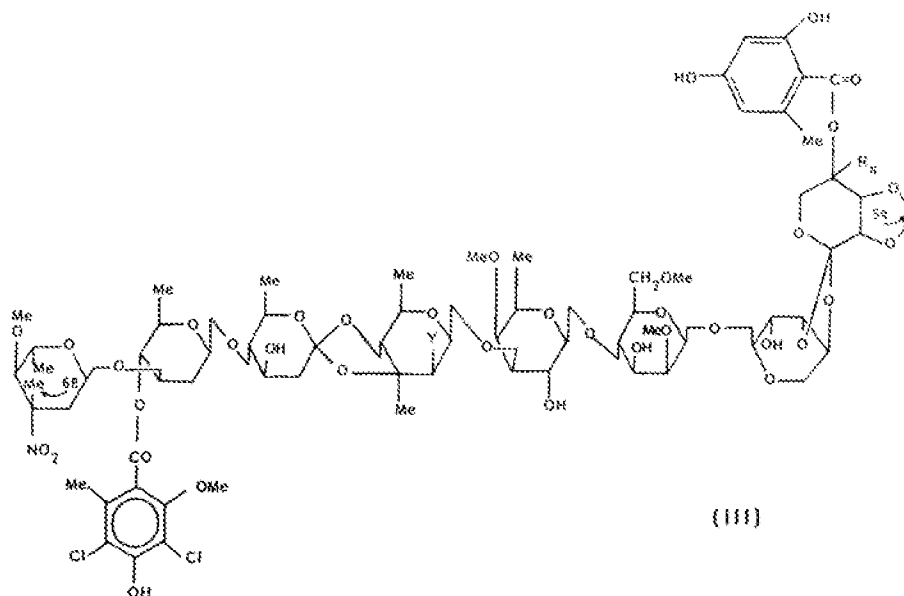
(b) najmanje jednu približno stehiometrijsku količinu lužine koja je sposobna da gradi farmaceutski prihvatljivu sol sa lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom formule (II);

(c) određenu količinu hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina u kome je prosječan broj hidroksipropil supstituenata u navedenom α , β ili γ -ciklodekstrinu u opsegu od oko 2 do oko 15, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

(d) od 0 do 6.0 mas.% [na bazi količine antibiotika formule (II)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

Sadašnji izum, dalje, osigurava preparat koji sadrži:

(a) antibiotski spoj predstavljen formulom (III):



(b) najmanje oko dva ekvivalenta lužine [na svaki mol spoj formule (III)] koja je sposobna da gradi farmaceutski prihvatljivu sol spoja formule (II);

(c) izvjesnu količinu hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina sa oko 2 do oko 15 hidroksipropil skupina po molekuli navedenog α , β ili γ -ciklodekstrina, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

(d) od 0 do 6.0 mas.% [na bazi količine antibiotika formule (II)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

Osigurane su farmaceutske formulacije dobivene miješanjem preparata koji sadrži spoj formule (I), (II) ili (III), najmanje približno jednu stehiometrijsku količinu lužine sposobne da gradi farmaceutski prihvatljivu sol tog spoja i izvjesnu količinu hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina, sa farmaceutski prihvatljivim nosačem, kao i metode za korištenje ovakvih farmaceutskih formulacija za tretiranje ili prevenciju podložnih gram pozitivnih i gram negativnih bakterijskih infekcija kod životinja, naročito kod sisavaca kojima je takav tretman potreban.

Poželjan oblik izuma predstavlja parenteralno davanje opisanih farmaceutskih formulacija, a naročito in vivo intravenozno (I.V.) davanje ljudima.

Sadašnji izum osigurava i metodu za sprečavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma kod životinja, nakon parenteralnog ubrizgavanja lipofilnog oligosaharidnog antibiotika formule (I), (II) ili (III), uz istodobno davanje antiinfektivne količine takvog antibiotika životinji, pri čemu se metoda sastoji u parenteralnom davanju takvoj životinji određene, za opisanu svrhu dovoljne količine preparata iz sadašnjeg izuma zajedno sa farmaceutski prihvatljivim nositeljem.

Sadašnji izum dalje osigurava korištenje lipofilnih oligosaharidnih antibiotika formule (I) u dobivanju lijekova za tretiranje ili prevenciju podložnih gram pozitivnih i gram negativnih bakterijskih infekcija kod životinja, a naročito kod sisavaca kojima su takav tretman ili prevencija potrebni.

Kratak opis crteža

Slika 1 grafički ilustrira napredovanje, u ovisnosti o vremenu, tipične fermentacije organizma *Micromonospora carbonacea* var. *africana*, NRRL 15099, ATCC 39149.

Detaljan opis izuma i poželjnih realizacija

Lipofilni oligosaharidni antibiotici, na primjer everninomicinski antibiotici, pokazuju korisno antibakterijsko djelovanje *in vitro*, ali teško grade kompletne vodene otopine pogodne za sigurno i djelotvorno davanje *in vivo* (tj. davanje koje ne bi bilo praćeno nepoželjnim reakcijskim sindromom). Osim toga, soli ovih antibiotika, dobivene miješanjem najmanje jedne približno stehiometrijske količine lužine korisne u ovom izumu, na primjer baze N-metilglukamina ("NMG"), ne grade kompletne vodene otopine na korisnim pH vrijednostima. Kada su navedene soli dodane u vodu u korisnim koncentracijama, zapazili smo jedino oblikovanje koloidnih disperzija. Ove koloidne disperzije imale su tendenciju da stvaraju agregate i konačno su se pretvorile u gel, naročito u prisustvu adsorbiranog ugljičnog dioksida i kada je pH takvih koloidnih disperzija bilo niže od oko 9.3. Zapazili smo da su kompletne vodene otopine dobivene povećavanjem molskog odnosa NMG prema spoju formule (III) od 2:1 ili 3:1 sve do 12:1, ali je otopina dobiven s molskim odnosom 12:1 imao neželjeno visoko pH, bio je visoko puferiran i imao je nadražujuće djelovanje. Naše je zapažanje bilo da parenteralno davanje vodene formulacije koja sadrži 12 mola NMG po molu spoja formule (III), štakorima ili višim primatima kao što su majmuni, nije dovelo do nepoželjnog reakcijskog sindroma [vjerojatno izazvanog geliranjem i taloženjem spoja formule (III)]. Formulacija je nakon ubrizgavanja imala nadražujuće djelovanje, koje je vjerojatno uvjetovano velikom količinom lužine NMG i odgovarajućim visokim pH na mjestu davanja injekcije. Međutim, parenteralno davanje preparata koji sadrži 3 do 5 mola NMG po molu spoja formule (III) dovelo je do nepoželjnog reakcijskog sindroma. Iako je poznato da različita ciklodekstrinska sredstva pomažu da se dobiju otopine pojedinih lijekova (na primjer kao u opisanim referencijama Bodor-a i Pitha-e), korištenje reprezentativnih sredstava iz ove klase samih po sebi nije dalo željene rezultate sa lipofilnim oligosaharidnim antibioticima. Tako, na primjer, korištenjem konkretnog ciklodekstrinskog derivata i konkretnog hidroksipropil-β-ciklodekstrina po molu antibiotika everninomicinskog tipa, formule (III), nije dobivena prava vodena otopina, čak ni sa 6 mola konkretnog hidroksipropil-β-ciklodekstrina po molu antibiotika everninomicinskog tipa, formule (III). Mi smo sa iznenađenjem otkrili da preparat koji sadrži lipofilni oligosaharidni antibiotski spoj formule (III), izvjesnu količinu određene baze, na primjer NMG i određenu količinu određenog sredstva, na primjer hidroksipropil-β-ciklodekstrina, kada se pomiješa sa farmaceutski prihvatljivim nosačima, naročito vodom, daje formulaciju koja može sigurno i djelotvorno da se koristi za davanje *in vivo*. Sa iznenađenjem smo otkrili, kada se 1 mol lipofilnog oligosaharidnog antibiotika, na primjer spoja formule (III), pomiješa sa najmanje 2 pa sve do oko 12 mola pogodne baze, na primjer NMG, u vodi i sa 6 mola hidroksipropil-β-ciklodekstrina, na primjer ciklodekstrina sa oko 3 do 7.5 hidroksipropil skupina po molekuli, dobivene bistre vodene otopine kompleksa (mjereno preko nefelometrijskog rasipanja svjetlosti i preko širine linije u protonskoj NMR; vidjeti Primjer 4), kao i da parenteralno davanje takvih kompleksa životinjama nije izazvalo nepoželjni reakcijski sindrom čak ni pri visokim dozama, tj. na 800 mg takvog kompleksa po kilogramu tjelesne mase. Vidjeti Tablicu 4.

Kao što će se vidjeti iz rezultata testova *in vivo*, sažeto prikazanih u Tablici 1, parenteralne injekcije vodene disperzije soli, na primjer NMG soli antibiotika everninomicinskog tipa formule (III) miševima i majmunima, dovele su do pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma. Pojava nepoželjnog reakcijskog sindroma u potpunosti je izbjegnuta tek kada su životinjama ubrizgane vodene otopine jednog od preparata iz sadašnjeg izuma, tj. preparata koji sadrže određeno sredstvo za kompleksiranje, na primjer hidroksipropil-β-ciklodekstrin sa oko 3 do 7.5 hidroksipropil skupina po molekuli, zajedno sa NMG soli antibiotika everninomicinskog tipa, formule (III).

Tablica 2 pokazuje da se nepoželjni reakcijski sindrom može smanjiti ili potpuno izbjeći kada se miševima parenteralno ubrizgavaju bistre vodene otopine NMG soli antibiotika everninomicinskog tipa, formule (III) sa određenim, na primjer hidroksi-β-ciklodekstrinskim sredstvima iz izuma.

Tablica 3 ilustrira pojavu da povećavanje molskog odnosa lužine prema antibioticima everninomicinskog tipa, formule (III), od 2:1 na 9:1, nakon parenteralnog davanja miševima, u potpunosti eliminira pojavu nepoželjnog reakcijskog sindroma u svim testiranim koncentracijama.

KOMPARATIVNI PRIMJER**TABLICA 1**

POJAVA NEPOŽELJNOG REAKCIJSKOG SINDROMA NAKON DAVANJA VODENIH FORMULACIJA SA 1
MOLOM SPOJA (III) I 2 MOLA NMG, SA I BEZ HP- β -CD¹

Miševi (Koncentracija ubriz- ganog spoja III: 80 mg/ml)	% Nepoželjnog reakcijskog sindroma ² pri sljedećim DOZAMA (MPK ³)			
	<u>100³</u>	<u>200³</u>	<u>500³</u>	<u>800³</u>
III ⁴ : 2NMG	100	--	--	--
III : 2NMG : 6HP β CD ⁵	0	0	0	0
Majmuni Cynomolgus (koncentracija ubrizganog spoja III: 50 mg/ml)				
	<u>10⁶</u>	<u>40⁶</u>	<u>80⁶</u>	
III: 2NMG	50	--	--	
III: 5NMG	--	33	50	
III: 2NMG : 6HP β CD ⁵	--	0	0	

Napomene uz Tablicu 1:

1. HP- β -CD je hidroksipropil-b-ciklodekstrin sa 7.4 hidroksipropil skupina po molekuli β -CD.
2. Simptomi nepoželjnog reakcijskog sindroma su kod životinja zapaženi u prve 2 minute nakon I.V. injekcije (pojedinačna doza).
3. MKP je broj mg lijeka po kg tjelesne mase miša (skupine od 5 do 10, CF-1, prosječna masa 20g, Harlan Sprague-Dawley, držani bez hrane 18 sati).
4. III je antibiotički spoj everninomicinskog tipa predstavljen formulom III.
5. Formiran je kompleks. Vidjeti Primjere 3 i 4.
6. MKP je broj mg lijeka po kg tjelesne mase majmuna *Cynomolgus* (masa od 2.9 do 9.6 kg, kolonija Schering Corporation, držani bez hrane 18 sati). U eksperimentu sa 40 MPK, 5NMG korištena su 3 majmuna, a u ostalim eksperimentima po 2 majmuna.

TABLICA 2

NEPOŽELJNI REAKCIJSKI SINDROM (NRS) NAKON DAVANJA VODENIH FORMULACIJA SA 1 MOLOM
SPOJA III, 2 MOLA NMG I ODABRANIM ADITIVIMA

5

Ubrizgan lijek formule (III)		% ARS pri sljedećim dozama (MPK2) lijeka formule (III) (20 mg/ml) kod miševa			
		<u>100</u>	<u>200</u>	<u>250</u>	<u>300</u>
Tween³					
(koncentracija)					
III:2NMG	0	10	100		100
III:2NMG	0.1%	10	100		100
III:2NMG	0.25%	80	100		100
III:2NMG	0.5%	100	100		100
III:2NMG	1%	100	100		100
III:2NMG	2%	--	0	0	40
III:2NMG	3%	0	0	0	0
DMSO⁴					
(koncentracija)					
III:2NMG	0	0	90		100
III:2NMG	1%	0	40	100	100
III:2NMG	5%	0	10	20	50
III:2NMG	10%	0	0	10	50
Glicerol					
(koncentracija)					
III:2NMG	0	0	100		100
III:2NMG	5%	0	90	90	100
III:2NMG	10%	0	60	100	100
Dekstran 40⁵					
(koncentracija)					
III:2NMG	0	0	100		--
III:2NMG	1%	20	100		--
III:2NMG	10%	0	50	70	100
Dekstran 70⁶					
(koncentracija)					
III:2NMG	6%	0	90	100	--
HP β CD⁷					
(molski odnos)		<u>100</u>	<u>200</u>	<u>250</u>	<u>300</u>
III:2NMG	0	0	100		100
III:2NMG	1:0.5		0		50
III:2NMG	1:1.5		0		60
III:2NMG	1:2.5		0		30
III:2NMG	1:3		0		10
III:2NMG	1:3				10
III:2NMG	1:6				0

Primjedbe uz Tablicu 2:

1. Simptomi nepoželjnog reakcijskog sindroma zapaženi su kod miševa (skupine 5 do 10, CF-1, prosječna masa 20 g, Harlan Sprague-Dawley, držani bez hrane 18 sati) u prve 2 minute nakon I.V. injekcije (pojedinačna doza).
2. MPK je broj mg ljekovite supstancije formule (III) po kg tjelesne mase životinje.
3. Tween je sorbatan mono-9-oktadekanoat poli(oksi-1,2-etandiil), ili Polysorbate 80, a nabavlja se od ICI Americas Inc., Wilmington, Delaware pod trgovačkim nazivom Tween 80.
4. DMSO je dimetil sulfoksid.
5. Dextran 40 je visokomolekularni (40 000) polimer glukoze koji se nabavlja kod Sigma Chemicals.
6. Dextran 70 je visokomolekularni (70 000) polimer glukoze koji se nabavlja kod Sigma Chemicals.
7. HP β CD je hidroksipropil- β -ciklodekstrin sa 7.4 hidroksipropil skupine po molekuli CD.

TABLICA 3

UČINCI KONCENTRACIJE NMG SOLI LIPOFILNOG OLIGOSAHARIDNOG ANTIBIOTIKA I MOLSKOG
ODNOSA NMG PREMA ANTIBIOTIKU NA NEPOŽELJNI REAKCIJSKI SINDROMI KOD MIŠEVA

5

Lijek formule (III)	%ARS ¹ u sljedećim dozama (MPK ²):				
(Koncentracija lijeka)					
	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>	<u>400</u>
III ³ :2NMG	--	--	50	--	--
(10 mg/ml)					
III:2NMG	--	20	100	--	--
(20 mg/ml)					
III:2NMG	70	100	--	--	--
(50 mg/ml)					
III:3NMG	--	--	0	0	20
(20 mg/ml)					
III:3NMG	--	--	0	15	40
(40 mg/ml)					
III:3NMG	--	--	100	--	--
(80 mg/ml)					
III:5NMG	--	--	0	0	--
(20 mg/ml)					
III:5NMG	--	--	0	--	40
(50 mg/ml)					
III:9NMG	--	--	0	0	0
(20 mg/ml)					
III:9NMG	--	--	0	0	0
(40 mg/ml)					
III:9NMG	--	--	0	--	0

Primjedbe uz Tablicu 3:

1. Simptomi nepoželjnog reakcijskog sindroma zapaženi su kod miševa (skupine 5 do 10, CF-1, prosječna masa 20 g, Harlan Sprague-Dawley, držani bez hrane 18 sati) u prve 2 minute nakon I.V. injekcije (pojedinačna doza).
2. MPK je broj mg lijeka formule (III) po kg tjelesne mase.
3. III je antibiotski spoj everninomicinskog tipa, predstavljen formulom (III).

10

Sa možda još većim iznenađenjem smo primijetili da su, za kompleks koji sadrži 3 do 6 mola hidroksipropil- β -ciklodekstrina ("HP β CD") u kombinaciji s 1 molom spoja formule (III) i 2 ili 3 mola NMG, minimalne inhibitorne koncentracije ("MIC") u *in vitro* modelima, kao i vrijednosti 50% zaštitne doze ("PD₅₀") u *in vivo* modelu zaštite na miševima, bile suštinski iste kao i MIC i PD₅₀ vrijednosti za spoj formule (III) i za NMG sol spoja formule (III) sa HP β CD u ovim modelima. Proteinsko vezivanje je, za kompleks 2 ili 3 mola NMG po molu spoja formule (III) sa 6 mola HP β CD, zadržalo 96-98% vrijednosti vezivanja zapaženog kod soli spoja formule (III) sa 2 mola NMG.

15

Sa iznenađenjem smo, prema tome, otkrili farmaceutski prihvatljive preparate koji sadrže lipofilni oligosaharidni antibiotik i koji omogućavaju djelotvorno unošenje takvog antibiotika u serum životinje kao što je sisavac, a naročito čovjek, oboljele od bakterijske infekcije podložne tretiranju takvim lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom formule (I), (II) i (III).

20

2-Hidroksipropil derivati α -, β - i γ -ciklodekstrina korisni u sadašnjem izumu imaju od oko 2 do 11 hidroksipropil skupina po molekuli ciklodekstrina i lako se dobivaju reakcijom α -, β - ili γ -ciklodekstrina sa 1,2-propilen oksidom u prisustvu lužine, pri čemu se reakcija vrši tako da se dobiju višekomponentne, amorfne smjese kao što su one opisane kod J. Pitha-e u Američkom patentu 4,727,064, kod J. Pitha-e i suradnika u *International Journal of Pharmaceutics* (1986), 29, str. 73-82 ili kod Muller-a u Američkom patentu 4,870,060. Proizvodi auto-kondenzacije propilen oksida se uklanjaju, pa se stupanj supstitucije, tj. broj hidroksipropil skupina po molekuli ciklodekstrina, pogodno određuje protonskom nuklearnom magnetnom rezonancijom i/ili masenom spektroskopijom u skladu sa metodama koje su opisali Pitha u Američkom patentu 4,727,064 i u *International Journal of Pharmaceutics* (1986) 29, str. 73-82 ili C.T. Ras i suradnici u *Pharmaceutical Research* (1990) 7, (Br. 6), str. 612-615. 2-Hidroksipropil- α -, β - i γ -ciklodekstrini sa oko

30

2 do 15, poželjno oko 3 do 9 i još poželjnije oko 5 do 7.5 hidroksipropil skupina po molekuli α -, β - ili γ -ciklodekstrina lako se dobivaju na uobičajeni način, a mogu se nabaviti i na tržištu od tvrtke Cyclolab u sastavu Farmaceutskog i kemijskog kombinata CHINOIN, 1325 Budapest, Mađarska; od tvrtke Walker-Chemie GmbH, Division L. Biotechnology, Prinzregentenstrabe 22, D-8000 MUNCHEN, SR Njemačka; od tvrtke American Maize, HAMMOND, Indiana, U.S.A.; od tvrtke Pharmatec Inc., P.O. Box 730, ALACHUA, Florida 32615, U.S.A.; i od tvrtke Janssen, Biotech N.V., Lammerdries 55, B-2430 OLEN, Belgija.

Količine navedenih hidroksipropil- α -, β - i γ -ciklodekstrina koje su potrebne da bi se postiglo djelotvorno unošenje lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje, a naročito čovjeka, uz istodobno sprečavanje pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma nakon davanja injekcije farmaceutskog preparata koji sadrži lipofilni oligosaharidni antibiotik formule (I), (II) ili (III), barem jednu stehiometrijsku količinu odabrane lužine i određenu količinu hidroksipropil- α -, β - i γ -ciklodekstrina u skladu s izumom, date su odmah u daljnjem tekstu.

Navedena količina hidroksipropil- α -ciklodekstrina ("HP- α -CD") iznosi oko 5 do 15 mola HP- α -CD po molu lipofilnog oligosaharidnog antibiotika formule (I). Za hidroksipropil- β -ciklodekstrin ("HP- β -CD"), navedena količina iznosi oko 1 do 9, poželjno oko 2 do 6 mola HP- β -CD po molu lipofilnog oligosaharidnog antibiotika formule (II) ili (III); dok za hidroksipropil- γ -ciklodekstrin ("HP- γ -CD"), navedena količina iznosi oko 2 do 8, poželjno oko 3 do 5 mola HP- γ -CD po molu lipofilnog oligosaharidnog antibiotika formule (I). Soli lipofilnog oligosaharidnog antibiotika predstavljenog formulom (III) izuzetno su pogodne za formiranje kompletnih otopina u vodi sa širokim opsegom hidroksipropil- α -, β - i γ -ciklodekstrina sa oko 2 do 15 hidroksipropil skupina po molekuli HP- α -CD, HP- β -CD ili HP- γ -CD. Kao što je prikazano u Tablici 4, široki opseg HP- β -CD koji sadrže od 3.9 do 7.5 hidroksipropil skupini po molekuli HP- β -CD suštinski je, u modelu sa miševima, spriječio pojavu nepoželjnog reakcijskog sindroma nakon parenteralnog davanja kompleksa sa jednim molom spoja formule (III), 2 mola NMG i 6 molova HP- β -CD.

TABLICA 4

Nepoželjni reakcijski sindrom¹ nakon parenteralnog davanja (800 MPK, 80 mg spoja formule (III) po ml) miševima vodene otopine kompleksa 1 mola spoja formule (III), 2 mola NMG i 6 molova HP- β -CD sa 3.9 do 7.5 hidroksipropil skupina

Broj hidroksipropil skupina po molekuli HP- β -CD	% Nepoželjnog reakcijskog sindroma
Bez HP- β -CD	90
7.4	0
7.5	0
7.4	0
7.4	0
7.2	0
6.9	0
6.7	10
6.3	0
6.2	0
5.2	0
4.5	0
4.4	0
4.1	10
3.9	0

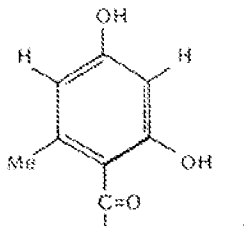
¹ Nepoželjni reakcijski sindrom zapažen kod miševa (skupine od 10 CF-1, prosječna masa 20 g, Harlan Sprague-Dawley, držani bez hrane 18 sati) u prve 2 minute nakon I.V. injekcije (pojedinačna doza).

Tijekom razvoja preparata iz sadašnjeg izuma, pripremali smo ih dodavanjem lipofilnog oligosaharidnog antibiotika, na primjer spoja formule (III), u barem jednu stehiometrijsku količinu, na primjer u 2 do 3 mola poželjne lužine, N-metil glukamina i u dovoljnu količinu dimetilsulfoksida, glicerola, poli(oksi-1,2-etandil)derivata sorbitan mono-9-oktadekanoata kao što su polisorbata 80 ili Tween 80, ili dekstrana kao što su polisaharidi sa oznakom Dextran 40 ili 70 proizvedeni djelovanjem bakterija gajenih na saharoznom supstratu koji sadrži osnovne jedinice D-glukoze vezane pretežno u položaju α -D (1 $\rightarrow$ 6). Dekstran 40 i 70 (prosječne molekulske težine 40 000 odnosno 70 000) predstavljaju polisaharide proizvedene djelovanjem *L. mesenteroides* na saharozu; primijećeno je da ovakva dovoljna količina dimetilsulfoksida, glicerola, polisorbata 80 ili dekstrana omogućava djelotvorno unošenje lipofilnog oligosaharidnog

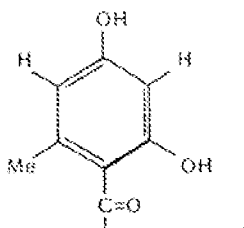
antibiotika u serum životinje uz istodobno smanjenje ili izbjegavanje pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma. Vidjeti rezultate u Tablici 2. Povećavanje količine DMSO i glicerola (do 10 mas.%) smanjilo je pojavu nepoželjnog reakcijskog sindroma; dovoljne količine DMSO i glicerola iznose oko 5 do 10 mas.%, odnosno oko 10 mas.%. Povećavanje količine dekstrana 40 i 70 također je smanjilo pojavu nepoželjnog reakcijskog sindroma; ovakve dovoljne količine dekstrana 40 i 70 iznose oko 2 do 10 mas.%, odnosno najmanje oko 6 mas.%. Količine Tween 80 od oko 0.1 do oko 1 mas.% pojačale su pojavu nepoželjnog reakcijskog sindroma, ali su količine Tween 80 veće od oko 2 do oko 3 mas.% dovele do gotovo potpunog nestanka nepoželjnog reakcijskog sindroma. Količine Tween 80 veće od oko 2 do oko 3 mas.% se prema tome smatraju dovoljnim (svi mas.% su u odnosu na ukupnu masu preparata). Korištenje hidroksipropil- α -, - β - ili - γ -ciklodekstrina je, međutim, poželjno za farmaceutske preparate iz sadašnjeg izuma. Vidjeti Tablicu 2 u ranijem tekstu.

Lužine koje su se pokazale pogodnim za primjenu u sadašnjem izumu su one koje grade farmaceutske prihvatljive soli lipofilnih oligosaharidnih antibiotika formule (I), (II) ili (III), a mogu biti organske i neorganske lužine. Pogodne organske lužine obuhvaćaju primarne, sekundarne i tercijarne alkil amine, alkanolamine, aromatične amine, alkilaromatične amine i ciklične amine. Primjeri organskih amina su farmaceutske prihvatljive lužine odabrane od hloroprocaina, procaina, piperazina, glukamina, N/metilglukamina, N,N-dimetilglukamina, etilendiamina, dietanolamina, diizopropilamina, dietilamina, N-benzil-2-feniletilamina, N,N'-dibenziletildiamina, holina, klemizola, tris(hidroksimetil)aminometana ili D-glukozamina. Poželjne organske lužine uključuju N-metil glukamin ("NMG"), dietanolamin i tris(hidroksimetil) aminometan ("TRIS"). Korištenje NMG u izumu je najpoželjnije. Vidjeti Tablice 2 i 3. Pogodne neorganske lužine obuhvaćaju hidrokside alkalnih metala kao što je natrijev hidroksid. Lužine koje su se pokazale kao korisne u dobivanju preparata iz sadašnjeg izuma daju vodene otopine sa pH od najmanje oko 9.3. Lizin gradi vodene otopine sa pH manjim od 9.3, pa stoga nije pogodna lužina za sadašnji izum. Hidroksidi divalentnih metala, kao što su zemnoalkalni hidroksidi, kalcijev i barijev hidroksid, nisu gradili vodene otopine lipofilnih oligosaharidnih antibiotika formule (I), (II) ili (III) u prisustvu 6 molova HP- β -CD koji bi imali pH od najmanje oko 9.3, pa su zato bili neprihvatljivi kao lužine koje bi se koristile u sadašnjem izumu.

Izraz "najmanje oko jedne stehiometrijske količine", u vezi s lužinama korisnim za primjenu u sadašnjem izumu, označava količinu lužine koja je potrebna za potpunu (tj. više od 99% završenu) reakciju sa kiselim fenolnim vodikovim atomima u lipofilnom oligosaharidnom antibiotiku formule (I), (II) ili (III) sa jednim, dva ili tri fenolna vodika spoj formule (III) ima tri fenolna vodika od kojih su samo dva kiselina. Za spojeve formule (I) i (II) gdje je $R_5 = H$, postoji samo jedan kiseli fenolni vodik po molekuli, pa će stehiometrijska količina farmaceutske prihvatljive lužine iz sadašnjeg izuma iznositi najmanje oko 1, pa sve do 12 molova takve lužine. U spojevima formule (I) i (II) u kojima R_5 predstavlja



kao i u spojevima formule (III), u molekuli ima po dva kiselina fenolna vodika, pa će stehiometrijska količina lužine potrebna za kompletno reagiranje sa dva kiselina fenolna vodika iznositi najmanje 2 pa sve do 12 mola farmaceutske prihvatljive lužine korisne u sadašnjem izumu. Za poželjne lipofilne oligosaharidne antibiotike formule (I), formule (II) u kojoj je R_5



kao i formule (III), poželjno je da se koristi oko 2 do oko 6 molova, poželjnije oko 2 do oko 3.5 mola i najpoželjnije oko 2 do oko 3 mola farmaceutske prihvatljive lužine kao što je NMG, kako bi se pH vodene otopine održalo na oko 9.3 za razliku od otopina koje imaju više pH i koje su visoko puferirane kada se koristi 6 do 12 molova NMG.

Izraz "lipofilni oligosaharidni antibiotik", kako se koristi u ovom tekstu, označava odabrane lipofilne predstavnike ortozomicinske porodice antibiotika, a bliže flambamicin, everninomicine, antibiotike everninomicinskog tipa, kuramicin i avilamicine A-N.

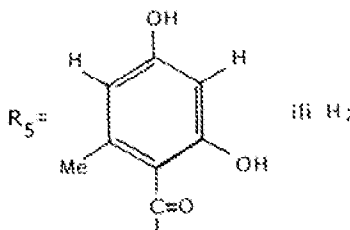
- 5 Flambamicin, lipofilni oligosaharidni antibiotik koji proizvodi *Streptomyces hygroscopicus* DS 23230, čija strukturna formula odgovara formuli (I) u kojoj su $R_1=R_5=H$, $Y=OH$, $R_2=COCH(CH_3)_2$, $R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=CH_3$, $R_4=COCH_3$ i $W=Z=Cl$, opisao je W.O. Ollis u *Tetrahedron*, (1979), 35, str. 105-127.

- 10 Curamicin A je flambamicinski antibiotik čija strukturna formula odgovara formuli (I) u kojoj su R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , W i Z isti kao kod flambamicina, R_2 je $COCH_3$, a Y je vodik. Vidjeti kod O.L. Galamarine-a i suradnika, *Tetrahedron* (1961), 15, str. 76 i kod V. Deulofer-a i suradnika, *Anales de Quimica* (1972), 68, str. 789.

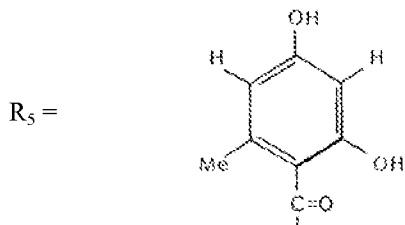
- 15 Avilamicini A-N su lipofilni oligosaharidni antibiotici izolirani iz antibiotskog kompleksa koji proizvode kulture organizma *Streptomyces viridochromogenes*, NRRL 2860. Vidjeti kod J.L. Mertz-a i suradnika u *The Journal of Antibiotics* (srpanj 1986) Vol. 39 (Br. 7), str. 877-887. Strukturne formule avilamicina A-N predstavljene su formulom (I) u kojoj su $R_1 = R_5 = H$, $Y = H$, $R_2 = COCH(CH_3)_2$, $COCH_3$, $CO(CH_2)_3CH_3$, $COCH_2CH_3$ ili H , $R_3 = CH_3$, $R_4 = COCH_3$, $CH(OH)CH_3$ ili CHO ; $R_6 = CH_3$ ili H ; $R_7 = CH_3$ ili H ; $R_8 = CH_3$, CH_2OH ili H ; $R_9 = CH_3$ ili H ; $W = H$ ili Cl ; i $Z = Cl$.

- 20 Everninomicinski antibiotici korisni u sadašnjem izumu obuhvaćaju everninomicine B, C i D, izolirane iz antibiotskog kompleksa koji proizvodi organizam *Micromonospora carbonacea* var. *carbonacea* NRRL 2972, kao i varijetet *M. carbonacea* var. *aurantiaca* NRRL 2997, kao što je opisano u Američkom patentu 3,499,078. Derivati everninomicina sa nitrozo, hidroksilamino ili amino skupinom umjesto nitro skupine u everninomicinima B, C i D, mogu se dobiti redukcijom nitro skupine u everninomicinima B, C i D u skladu sa postupcima iz Američkog patenta 4,006,225.
- 25 Poželjni everninomicin je N-acetilaminoeverninomicin-D, koji je predstavljen formulom (II) u kojoj su $X = NHCOCH_3$; $Y = H$; $R_4 = CH(OCH_3)(CH_3)$; $R_3 = R_5 = H$; i $R_2 = CH_3$. N-Acetilaminoeverninomicin-D i njegova di-N-metilglukaminska sol mogu se dobiti postupcima iz Američkog patenta 4,129,720, u kome je opisana redukcija nitro skupine u everninomicinu B, C i D da bi se dobili amino derivati koji se zatim prevode u N-acil derivate, na primjer u N-acetil, N-alkil kao što je $NH(C_2H_5)$, ili N,N-dialkil kao što je $N(C_2H_5)_2$. Opisano je i dobivanje derivata N-acil-N-hidroksilamino everninomicina B, C i D, kao i njihovih farmaceutski prihvatljivih soli. Dobivanje everninomicina 7, predstavljenog formulom (II) u kojoj su $X = OH$, $Y = H$, $R_4 = CH(OCH_3)(CH_3)$, $R_5 = H$ i $R_2 = CH_3$, opisali su A.K. Ganguly i suradnici u *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1980, str. 56-58.

- 35 Antibiotici "everninomicinskog tipa" su oni lipofilni oligosaharidni antibiotici formule (II) u kojima su $X = NO_2$, $NONH_2$, OH , $NHCOCH_3$, NHC_2H_5 , $N(C_2H_5)_2$, $NHOH$ ili H ; $Y = OH$; $R_2 = CH_3$ ili H ; $R_3 = H$; $R_4 = CH(OCH_3)(CH_3)$ ili H i



Spojevi formule (II) u kojoj su $X=NO_2$ ili NH_2 ; $Y=OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$; i



40

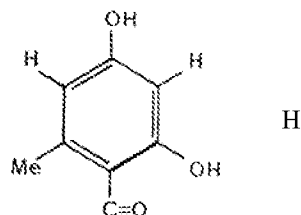
- izolirani su iz antibiotskog kompleksa 13-384 koji se dobiva fermentacijom organizma *Micromonospora carbonacea* var. *africana*, NRRL 15099, ATCC 39149. Antibiotička komponenta 1 Formula (II), $X = NO_2$, a Y , R_2 , R_3 , R_4 i R_5 kao što je definirano gore za kompleks 13-384, i komponenta 5 Formula (II), $X = NH_2$, a Y , R_2 , R_3 , R_4 i R_5 kao što je definirano gore za kompleks 13-384, opisane u Američkim patentima 4,597,968 i 4,735,903, imaju strukturne formule koje su opisali A.K. Ganguly i suradnici u *Heterocycles* (1984) Vol. 28 (Br. 1), str. 83-88. Antibiotici

45

everninomicinskog tipa formule (II) u kojoj je $X = H, NHOH, NHCOCH_3$, kao i njihovi acil i alkil derivati, opisani su u Američkim patentima 4,622,314 i 4,767,748.

Poželjni preparati prema izumu sadržavaju spojeve formule (II) u kojima je $R_3 = H$,

a	$\frac{X}{NO_2}$	$\frac{Y}{OH}$	$\frac{R_4}{CH(OCH_3)(CH_3)}$	$\frac{R_5}{H}$	i	$\frac{R_2}{CH_3}$ su:
	OH	H	"	"		"
	NO ₂	H	H	"		"
10	NO ₂	H	CH(OCH ₃)(CH ₃)	"		"
	NHCOCH ₃	H	"	"		"



	NO ₂	OH	H		H
	H	"	"	"	"
15	NHOH	"	"	"	"
	NHCOCH ₃	"	"	"	"
	NH ₂	"	"	"	"
	NHC ₂ H ₅	"	"	"	"
20	N(C ₂ H ₅) ₂	"	"	"	"

Najpoželjniji antibiotik everninomicinskog tipa označen je kao 56-dezacetil-57-demetil-45-O-de(2-metil-1-oksopropil)-12-O-(2,3,6-tridezoksi-3-C-metil-4-O-metil-3-nitro- α -L-arabino-heksopiranozil)-flambamicin 56-(2,3-dihidroksi-6-metilbenzoat), ima molekulsku formulu $C_{70}H_{97}NO_{38}Cl_2$, molekulsku težinu 1629 i predstavljen je formulom (III).

Poželjno se spoj formule (III) može dobiti fermentacijom organizma *Micromonospora carbonacea* var. *africana* NRRL 15099, ATCC 39149 ili, još poželjnije, fermentacijom poboljšane vrste dobivene kao što će biti opisano u daljnjem tekstu.

Korištenjem vrste SCC 1413 kulture NRRL 15099, ATCC 39149, poželjan se spoj formule (III) može na pogodan način dobiti postupcima navedenim u Primjeru 1 Američkog patenta 4,597,968. U konkretnom primjeru prema ovom postupku, početni inokulum za fermentaciju vrste SCC 1413 dobiven je unošenjem 2.5 ml zamrznute kompletne juhe od 50 ml germinacionog medija u Erlenmajerove posude od 250 ml. Medij za germinaciju je sadržavao 0.3% ekstrakta goveđeg mesa; 0.5% triptona; 0.1% dekstroze; 2.4% krumpirovog škroba; 0.5% ekstrakta kvasca; i 0.2% kalcijevog karbonata. pH medija je, prije steriliranja, prilagođeno na 7.5. Inkubacija Erlenmajerovih posuda vršena je na 30°C, u žiro-miješalici brzine 250 obrtaja u minuti, tijekom 48 sati. Za drugi stupanj germinacije, Erlenmajerove posude od 2 litre koje sadržavaju po 500 ml istog medija, inokulirane su sa po 5% volumena iz prvog stupnja germinacije. Uvjeti inkubacije bili su isti kao i prije. Treći stupanj inokula korišten je za sve fermentacije u miješanim fermentorima, a dobiven je 24-satnom inkubacijom kulture pod istim uvjetima kao i u drugom stupnju.

Fermentiranja u zapremini od 10 litara su prvo vršena u laboratorijskim fermentorima NBS, nominalnog volumena 14 litara, u mediju za fermentiranje koji je sadržavao 0.5% ekstrakta kvasca; 0.5% hidrolizata kazeina; 1% cereleze; 2.0% topljivog škroba; 0.4% kalcijevog karbonata; i 0.24% kobaltovog klorida. pH medija je prije sterilizacije prilagođeno na 6.7, a prije inokuliranja na 7.0. Za iniciranje fermentiranja korišten je treći stupanj inokula (2.5%), a fermentiranje je vršeno na 30°C sa 0.35 vvm zraka, uz miješanje brzinom od 350 obrtaja u minuti.

Proizvodnja antibiotika kontrolirana je tijekom fermentiranja na svaka 24 sata, biološkim ispitivanjem kompletne juhe u odnosu na *Staphylococcus aureus* 209P (pH agara 7.0) i *Escherichia coli* ATCC 10536 (pH agara 8.0). Također su, povremeno ili stalno, kontrolirani rast proizvodnog organizma (volumen pakiranih stanica), pH i nivo otopljenog kisika. Tipično fermentiranje u volumenu od 10 litara u fermentoru ilustrirano je na Slici 1.

Poboljšanu vrstu iz SCC 1413, NRRL 15099, ATCC 39149, razvili smo uz korištenje standardnih sredstava za mutagenezu, a tako dobivena vrsta proizvodila je poboljšane prinose poželjnog antibiotika everninomicinskog tipa, formule (III). U konkretnom primjeru, osnovna vrsta, SCC 1413, NRRL 15099, ATCC 39149, izložena je količini sredstva za mutagenezu, N-nitrozoguanidina (NTG) dovoljno da ubije 90% kulture SCC 1413, NRRL 15099, ATCC 39149. 1500 preživjelih izolata ispitano je na poboljšanu biološku aktivnost protiv *S. aureus* i *E. coli*, da bi se utvrdilo

koji izolati pokazuju poboljšanu proizvodnju željenog antibiotika formule (III). Postupak testiranja korištenog da bi se odredila poboljšana aktivnost bila je sljedeća: izolati pojedinačnih kolonija germinirani su u epruvetama koje sadržavaju po 10 ml medija za germinaciju iz Primjera 1 Američkog patenta 4,597,968, uz miješanje u žiro-miješalici brzine 250 obrtaja u minuti, tijekom 48 sati na 30°C. Ispitivanje fermentiranja započeto je prebacivanjem po 2.5 ml inokula u Erlenmajerove posude od 250 ml koje sadržavaju po 50 ml medija za fermentiranje, nakon čega je inkubacija vršena 96 sati na 30°C, uz miješanje na žiro-miješalici brzine 250 obrtaja u minuti. Poboljšana proizvodnja antibiotika dobivenog fermentiranjem je zatim ispitana određivanjem aktivnosti protiv *S. aureus* i *E. coli*, pa su identificirani izolati koji daju poboljšane prinose željenog antibiotika. Rezultati za reprezentativni poboljšani izolat, označen u ovom tekstu kao vrsta SCC 1631, dati su u Tablici 5.

Opisani postupak razvoja nove vrste ponovljen je podvrgavanjem reprezentativnog poboljšanog izolata, SCC 1631, daljnjem kontaktu sa NTG, ponovo u količini dovoljnoj da ubije 90% kulture, nakon čega je vršena selekcija izolata na agar pločama koje sadrže 150 µg/ml everninomicina D. Izolati koji daju poboljšanu proizvodnju željenog antibiotika su ponovo selekcionirani određivanjem njihove biološke aktivnosti protiv *S. aureus* i *E. coli*. Jedan takav izolat, ovdje označen kao vrsta SCC 1756, korišten je nakon toga za proizvodnju poželjnog antibiotika formule (III).

Daljnja mutageneza vrste SCC 1756 korištenjem NTG dala je našu sadašnju proizvodnu vrstu, SCC 2146.

U navedenim mutacijskim postupcima, protokoli za oba ispitivanja bili su kao što je već opisano. Za posljednja dva mutacijska ispitivanja, juhe za fermentiranje su ekstrahirane etil acetatom i koncentratu su kromatografirani na tankoslojnim pločama Whatman LKGDF, u sustavu otapala kloroform:metanol (9:1 zapr/zapr.), nakon čega je slijedila bioautografija protiv *S. aureus* i *E. coli* kako bi se potvrdila proizvodnja svih komponenti antibiotskog kompleksa. Da bi se pratili povećani titri spojeva formule (III), tankoslojne ploče su ispitivane uz korištenje skenera TLC ploča Shimadzu CS-930, a kvantifikacija ekstrakta sa višim nivoima proizvodnje izvršena je pomoću HPLC. Kombinirani titri su definirani kao zbroj spoja formule (III) (antibiotik 13-384, komponenta 1 iz Američkog patenta 4,597,968) i nitrozo analoga navedene komponente 1, tj. antibiotika 13-384, označenog kao komponenta 1a.

Preliminarna promatranja su ukazala da je, iako osnovna vrsta SCC 1413 brzo raste na 34°C, proizvodnja antibiotika bila optimalna ukoliko je temperatura bila niža. Ova pojava je bliže ispitana radi optimiziranja fermentiranja. Rezultati proučavanja ovisnosti o temperaturi pokazali su da je optimalna proizvodnja dobivena snižavanjem temperature sa 34°C na 30°C, nakon 24 sata inkubacije. Svaki daljnji rad u fermentorima slijedio je sljedeći protokol fermentiranja: inkubacije tijekom 24 sata na 34°C, a zatim snižavanje temperature na 30°C i njeno održavanje tijekom cijelog fermentiranja.

U vezi sa izoliranjem poboljšanih proizvodnih vrsta vršeno je i ispitivanje medija. Ispitivani su supstituti za izvore ugljika i dušika, kao i dodavanje minerala i drugih kompleksnih hranljivih tvari. Zamjena hidrolizata kazeina peptonom iz mesa ili iz ribe, kao i zamjena krumpirovog dekstrina (PDP 650) topljivim škrobom, poboljšale su proizvodnju antibiotika u kojoj su korištene vrste SCC 1413 i SCC 1631. Daljnja poboljšanja proizvodnje spoja formule (III), u proučavanjima s vrstom SCC 1756, zapažena su nakon dodatka tekućine od natapanja kukuruza i nikl(II) klorida. Trenutačno korišten proizvodni medij za fermentiranje (4I + 1/2 Ni) optimiziran za spoj formule (III) sadržava 2.2 mas.% glukoze; 4.0 mas.% dekstrina PDP 650; 0.5 mas.% ekstrakta kvasca; 0.6 mas.% peptona iz mesa; 0.5 vol.% tekućine od natapanja kukuruza; 2.5×10^{-6} M nikl klorida; i 0.4 mas.% kalcijevog karbonata. pH medija je prilagođeno na 6.7 prije dodavanja kalcijevog karbonata. Tablica 6 prikazuje usporedbu titara za vrste SCC 1413, SCC 1631, SCC 1756 i SCC 2146, dobivene postupkom u miješanim Erlenmajerovim posudama (50 ml opisanog proizvodnog medija u Erlenmajerovim posudama od 250 ml, 30°C, 96 sati, 300 obrtaja u minuti). Jasno se vidi izrađeno poboljšanje titra (15 puta u odnosu na osnovnu vrstu SCC 1413). Tijekom fermentiranja u fermentorima, u volumenu od 100 litara, uz korištenje opisanog proizvodnog medija i naše najbolje proizvodne vrste, SCC 2146, dostignuti su titri od 555-750 µg/ml zbroj spoja formule (III) i njegovog nitrozo derivata (vidjeti Tablicu 7).

TABLICA 5

Usporedba vrsta SCC 1413 i SCC 1631 u fermentiranjima -prikazane su zone inhibicije (mm) na agar-pločama¹

TEST 1			TEST 2			
Soj	<i>S.aureus</i> pH 7		<i>E.coli</i> pH 8		<i>S.aureus</i> pH 7	
SCC	Nerazbl.	1:20	Nerazbl.	Nerazbl.	1:20	<i>E.coli</i> pH 8
1631	28,7, 28,7	22,0	20, 17,5	28,1, 28,8	23,3, 23,1	14,8 C ² , 15,0 C ²
1413	28,7, 28,7	19,0	12 H ³ , 12 H ³	23,8, 23,1	20,5, 19,8	12 H ³ , 12 H ³

- Po potrebi dvostruko određivanje
- Bistra zona
- Mutna zona.

TABLICA 6

Usporedba vrsta SCC 1413, 1631, 1756 i 2146 organizma *Micromonospora carbonacea* var. *africana*, NRRL 15099, ATCC 39149, u Erlenmajerovim posudama

Kultura	Titar spoja formule (III) (1) i nitrozo analoga (1A) (µg/ml)		
	1 (NO ₂)	1a (NO)	zajedno (1 + 1a)
SCC 1413	5	3	8
SCC 1631	14	4	18
SCC 1756	17	16	33
SCC 2146	39	85	124

TABLICA 7

Fermentiranje vrste SCC 2146 u volumenu od 100 litara

Medij	Titar spoja formule (III) (1) i nitrozo analoga (1A) (µg/ml)		
	1 (NO ₂) ¹	1a (NO) ²	zajedno (1 + 1a)
4I	105	315	420
4I	135	170	305
4I + 1/2Ni ³	55	500	555
4I + Ni ⁴ 150		575	725
4I + 1/2Ni ³	100	650	750
4I + 1/2Ni ³	130	470	600

Primjedbe uz Tablicu 7

- Antibiotik everninomicinskog tipa, formule (III)
- Nitrozo analog antibiotika formule (III)
- Koncentracija nikla (1/2 Ni) = $2,5 \times 10^{-6}$ M
- Koncentracija nikla (Ni) = 5×10^{-6} M.

Izoliranje lipofilnog oligosaharidnog antibiotskog kompleksa koji sadržava spoj formule (III) i njegov nitrozo analog izvršeno je korištenjem postupka iz Primjera 1C Američkog patenta 4,597,968. pH juhe za fermentiranje je prilagođen na 7, pa je izvršena dvostruka ekstrakcija sa volumenom etil acetata dva puta većom od volumena juhe za fermentiranje. Kombinirani etil acetatni ekstrakti su koncentrirani, pa su količine spoja formule (III) i njegovog nitrozo analoga određene pomoću HPLC. Nitrozo analog je preveden u nitro spoj formule (III) korištenjem sredstva za oksidaciju kao što je tercijarni butil- hidroperoksid (t-BuO₂H) sa vanadil acetilacetonom otopljenim u aprotičnom organskom otapalu, na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije je praćen sa, na primjer, HPLC. Reakcija je prekinuta trialkilfosfitom, pa je sirovi proizvod pročišćen standardnim kromatografskim tehnikama, na primjer kromatografijom na stupcu silikagela (acetone/CH₂Cl₂) ili stupcu koji sadržava polihidroksivinil polimer kao što je Fractogel (Toyo Pearl) koji se nabavlja od tvrtke Toyo Haas, PHILADELPHIA, Pennsylvania, U.S.A.

Farmaceutski prihvatljivi preparati iz sadašnjeg izuma mogu sadržavati, osim (a) antibiotika formule (I), (II) ili (III), (b) lužine sposobne da gradi farmaceutski prihvatljivu sol takvog antibiotika i (c) određene količine, na primjer, hidroksipropil- α -, β - ili γ -ciklodekstrina sa 2 do 15 hidroksipropil skupina po molekuli ciklodekstrina, od oko 0 do oko 6.0 mas.% na bazi mase antibiotika formule (I), (II) ili (III) farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva. Kada se farmaceutski prihvatljivo neionsko površinski aktivno sredstvo koristi, ono će poželjno predstavljati poli(oksi-1,2-etandiil) derivat sorbitan mono-9-oktadekanoata kao što je Tween 80. Može se, međutim, koristiti i bilo koje drugo neionsko površinski aktivno sredstvo koje gradi farmaceutski prihvatljive preparate, tj. preparate koji, kada se otope u farmaceutski prihvatljivom nosaču, suštinski ne dovode do замуćenja, neprozirnosti i stvaranja čestičnog materijala koji bi se mogli mjeriti standardnim analitičkim tehnikama, na primjer nefelometrijom. Naročito su poželjni preparati iz sadašnjeg izuma koji sadrže od 2.85 do 5.70 mas.% sredstva Tween 80 i antibiotski spoj formule (III).

Biolško djelovanje

Sa iznenađenjem smo našli da poželjan preparat iz sadašnjeg izuma, koji se sastoji od 1 mola spoja formule (III), 2 mola NMG i 6 molova 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina sa 7.4 hidroksipropil skupine po molekuli β -ciklodekstrina, ima suštinski istu geometrijsku sredinu za vrijednost MIC (GMM) protiv različitih bakterija i suštinski iste vrijednosti vezivanja za protein u serumu, kao i spoj formule (III) samo po sebi. Očekuje se da će se na sličan način ponašati i svi drugi preparati iz sadašnjeg izuma.

Testovi antibakterijskog djelovanja *in vitro* vršeni su uz korištenje standardnih metoda razblaženja u agaru, na Mueller-Hinton-ovom agaru. GMM za navedeni poželjni preparat iz sadašnjeg izuma i za sam spoj formule (III) određeni su u odnosu na različite bakterije, na primjer gram pozitivne i gram negativne bakterije. Izraz "podložne gram pozitivne i gram negativne bakterijske infekcije" obuhvaća širok spektar gram pozitivnih bakterijskih infekcija, na primjer stafilokoke otporne i neotporne na meticilin, različite vrste streptokoka i enterokoka, kao i neke gram negativne bakterijske infekcije, na primjer *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* i *Pseudomonas*. Spoj formule (III) imalo je odlično djelovanje (desetostruko snažnije nego vankomicin) kako protiv stafilokoka otpornih na meticilin (GMM 0.1 $\mu\text{g/ml}$), tako i protiv stafilokoka koje nisu otporne na meticilin (GMM 0.5 $\mu\text{g/ml}$). Spoj formule (III) je također pokazao dobro djelovanje (dvostruko bolje nego vankomicin) protiv *Enterococcus faecalis*-a (GMM 0.49 $\mu\text{g/ml}$) i dobro djelovanje (MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$) protiv različitih vrsta streptokoka i enterokoka otpornih na vankomicin (MIC ≤ 128 $\mu\text{g/ml}$). Spoj formule (III) bio je vrlo aktivan protiv *Borrelia burgdorferi* (MIC ≤ 0.49 $\mu\text{g/ml}$), kao i protiv *Legionella pneumophila* i *L. longbeacheae* (MIC 2.5 $\mu\text{g/ml}$), ali je pokazao samo neznatnu aktivnost protiv gram-negativnih bakterija (GMM ≥ 760 $\mu\text{g/ml}$), *Trichomonas vaginalis*-a (MIC ≥ 192 $\mu\text{g/ml}$) i *Mycoplasma sp.* (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$). Nije zapaženo ukrštanje rezistencije sa drugim antibioticima.

Spoj formule (III) imao je umjereno baktericidno djelovanje protiv različitih kliničkih i laboratorijskih vrsta stafilokoka. Baktericidno djelovanje spoja formule (III) protiv stafilokoka i enterokoka bilo je slično djelovanju vankomicina. Spoj formule (III) imao je dobro djelovanje protiv stafilokoka kod miševa (opseg PD50 od 0.5 do 25.0 mg/kg), slično djelovanju vankomicina (0.7 do 28.5 mg/kg).

Nakon intravenoznog (30 mg/kg) davanja spoja formule (III) sa 2 molekule NMG, kod štakora su primijećeni visoki nivoi u serumu (maksimum oko 90 $\mu\text{g/ml}$), sa dugim beta polu-životom u serumu.

Očekuje se da će farmaceutski prihvatljivi preparati iz sadašnjeg izuma biti aktivni protiv već navedenih podložnih bakterija, protiv spiroheta uključujući *Treponema pallidum*, anaeroba uključujući *Clostridium difficile*, kao i protiv *Pneumocystis*, *Toxoplasma*, protozoa i crijevnih glista.

Na osnovu aktivnosti spoja formule (III) protiv *Borrelia burgdorferi* i *Legionella pneumophila* i *L. longbeacheae*, očekujemo da će preparati koji sadržavaju spoj formule (III) pokazati u humanom modelu djelovanje protiv Lyme-ove bolesti i legionarske bolesti.

Sadašnji izum osigurava metodu za tretiranje ili prevenciju podložnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih infekcija kod životinja, koji se sastoji u davanju takvim životinjama, a naročito čovjeku, oboljelim od takvih infekcija, određene količine farmaceutskog preparata iz sadašnjeg izuma zajedno sa odgovarajućim farmaceutski prihvatljivim nositeljem.

Preparati iz sadašnjeg izuma mogu se kombinirati sa bilo kojim farmaceutski prihvatljivim nositeljem, na primjer sa steriliziranim vodom, vodenom otopinom etanola, biljnim uljima ili poliolima kao što su polietilen glikoli i propilen glikol, i davati se oralno, parenteralno ili lokalno u različitim formulacijama. Poželjno je da se kao nositelj koristi voda. Sterilizirana voda može po potrebi sadržavati farmaceutski prihvatljive supstancije, na primjer natrijev klorid, kalijev

nitrat, glukozu, manitol, dekstrozu, sorbitol, ksilitol ili pufere kao što su fosfatni, acetatni ili citratni pufer, kao i konzervanse.

Preparati iz sadašnjeg izuma dobivaju se miješanjem lipofilnog oligosaharidnog antibiotika formule (I), (II) ili (III) sa barem jednom stehiometrijskom količinom lužine sposobne da sa njim gradi farmaceutski prihvatljivu sol, u pogodnom otapalu kao što je voda i sa određenom količinom, na primjer, hidroksipropil- α -, - β - ili - γ -ciklodekstrina sa oko 2 do 15 hidroksipropil skupina po molekuli ciklodekstrina. Redosljed miješanja nije kritičan, ali će se poželjno vodena otopina konkretnog ciklodekstrina miješati sa lužinom, ili će se alternativno ciklodekstrin dodati nakon miješanja lužine sa lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom. Formiranje vodene otopine može se vršiti na temperaturi od 15 do 35°C. Tako dobivena vodena otopina se filtrira da bi se dobila bistra vodena otopina kompleksa, koji se može upariti ili, poželjno, sušiti zamrzavanjem kako bi se preparat iz sadašnjeg izuma dobio u obliku liofiliziranog praha koji se lako rekonstituirao dodatkom određene količine farmaceutski prihvatljivog nositelja kao što je voda. Farmaceutski prihvatljivo neionsko površinski aktivno sredstvo kao što je Tween 80, kada se koristi, treba dodati u vodenu otopinu prije filtriranja i liofilizacije. Alternativno, vodena otopina se može zamrznuti, otopiti i zatim filtrirati prije nego što će se upotrijebiti, na primjer kao formulacija za intravenozno davanje. Naročita karakteristika sadašnjeg izuma je da farmaceutski preparati iz izuma grade vodene otopine iako sadržavaju manje od oko 20 mas.%, poželjno manje od oko 10 mas.%, a još poželjnije oko 1.0 do 5.0 mas.% količine hidroksipropil- α -, - β - ili - γ -ciklodekstrina. Otkriće da farmaceutski preparati korisni za sigurno i djelotvorno unošenje lipofilnih oligosaharidnih antibiotika u serum životinja oboljelih od podložnih bakterijskih infekcija, naročito podložnih gram pozitivnih i gram negativnih bakterijskih infekcija, se mogu dobiti korištenjem manje od 20 mas.% na primjer hidroksipropil- β -ciklodekstrina, naročito je iznenađujuće kada se imaju u vidu navodi Bodor-ovog Američkog patenta 4,983,586 i Pitha-inog Američkog patenta 4,727,064. Bodor navodi da treba koristiti 20 do 50 mas.% hidroksipropil- β -ciklodekstrina kako bi se spriječilo pretvaranje u gel ili taloženje lijeka, dok Pitha tvrdi da je za solubiliziranje različitih lijekova, uključujući soli retinolske kiseline, potrebno koristiti od 40 do 60 mas.% hidroksipropil- β -ciklodekstrina.

Za oralno davanje, preparati iz sadašnjeg izuma mogu se formulirati u obliku tableta, kapsula, eliksira i slično. Tablete i kapsule mogu sadržavati ekscipijente kao što su škrob ili laktoza; tekući oblici mogu sadržavati sredstva za bojenje ili davanje ukusa. Preparati za lokalno davanje mogu biti u obliku krema, hidrofobnih i hidrofilnih ulja, kao i vodenih, nevodenih ili emulzijskih losiona, a također i u obliku uložaka ili praškova. Tipični nositelji za ovakve formulacije su voda, ulja, masti, poliestri i polioli. Parenteralne formulacije, na primjer dozni oblici za injekcije, obično predstavljaju tekućine kao što su otopine ili suspenzije, pri čemu su tipični nositelji destilirana voda i fiziološka otopina. Poželjne su parenteralne formulacije, a još poželjnije formulacije za intravenozno (I.V.) davanje.

Doza koju treba davati u bilo kojem doznom obliku zavisit će od različitih faktora, kao što su masa, starost i spol životinje, a naročito sisavaca kao što je čovjek koji je podvrgnut tretmanu, podložnost infektivnog organizma djelovanju lipofilnog oligosaharidnog antibiotika, kao i stupanj i ozbiljnost infekcije. U načelu će se lipofilni oligosaharidni antibiotici formule (I), (II) ili (III) davati u dozama od oko 1.0 mg do oko 15 mg po kilogramu tjelesne mase, poželjno oko 5 mg/kg dnevno u podijeljenim dozama, pri čemu je konkretna doza prepuštena odluci liječnika; poželjno je I.V. davanje.

U tretiranju određenih pacijenata preparatima iz sadašnjeg izuma moguće je u iste dozne jedinice uključiti i druge farmaceutski aktivne sastojke.

Primjeri

Primjer 1

A. Fermentiranje

Fermentiranje vrste SCC 2146 organizma *Micromonospora carbonacea var. africana*, NRRL 15099, ATCC 39149 u volumenu od 100 litara, poboljšano kao što je opisano gore, vršeno je u skladu sa postupkom iz Primjera 1B Američkog patenta 4,597,968 osim što je korišten proizvodni medij sastava koji će biti naveden (4I + 1/2 Ni) i što je fermentiranje vršeno na 34°C tijekom 24 sata nakon čega je temperatura snižena na 30°C i održavana na toj vrijednosti tijekom cijelog ciklusa fermentiranja, tj. još 72 sata (ukupno vrijeme fermentiranja iznosilo je 96 sati). Zrak je propuhivan pri 0.35 vvm, a miješanje je vršeno brzinom od 350 obrtaja u minuti.

Proizvodni medij 4I + 1/2 Ni

Glukoza	2.2 mas.%
Dekstrin PDP 650	4.0 mas.%
Ekstrakt kvasca	0.5 mas.%

Pepton iz mesa	0.6 mas. %
Tekućina od natapanja kukuruza	0.5 zapr. %
Nikal klorid	$2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$
Kalcijev karbonat	0.4 mas. %
Obična voda	do 1000 ml.

B. Izoliranje

Juha za fermentiranje iz Primjera 1A je ekstrahirana dva puta sa po 200 litara etil acetata. Etil-acetatni ekstrakti su kombinirani i koncentrirani, da bi se dobio koncentrirani antibiotski kompleks koji (kako je određeno pomoću HPLC) sadržava smjesu spoja formule (III) i njegovog nitrozo analogu.

Primjer 2

A) U 919 g antibiotskog kompleksa dobivenog kao što je opisano u Primjeru 1, koji sadržava 294 g (32%) smjese 3.4 mola nitrozo analogu na svaki mol spoja formule (III), otopljenog u 4.6 litara etil acetata, dodano je 68.8 g NaHCO_3 i 2.98 g 3M vanadil acetalacetona u 2,2,4-trimetilpentanu (0.06 ekvivalenata, nabavljen od tvrtke Aldrich); tako dobivenoj smjesi je nakon pola sata dodano 394 ml 3M t-butilhidroperoksida. U reakcijsku smjesu su, na početku i nakon 1½, 2½, 3½ i 4 sata, dodavane porcije od po 1.45 g (0.03 ekvivalenta) vanadil acetalacetona, tako da je tijekom 4 sata dodano ukupno 0.15 ekvivalenata. Reakcijska smjesa je potopljena u ledeno kupatilo, pa joj je dodano 203 ml (0.5 ekvivalenata) trietilfosfita ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{P}$. Ovako dobivena smjesa je razblažena podjednakom volumenom etil acetata, uz održavanje temperature reakcijske smjese na $\leq 30^\circ\text{C}$. Razblažena etil-acetatna reakcijska smjesa isprana je dva puta vodom. Vodeni sloj je zasoljen i ekstrahiran etil acetatom. Kombinirani organski ekstrakti su sušeni preko MgSO_4 , filtrirani i koncentrirani. Dobiveni ostatak je otopljen u minimalnoj količini acetona i taložen u 7 litara 1:9 (vol/vol.) etil eter/heksana. Ostatak je filtriran, ispran heksanom i sušen pod vakuumom uz zagrijavanje, da bi dao 928 g proizvoda koji sadrži 30% (278 g) nitro spoja formule (III).

B) Ostatak iz Primjera 2A pročišćen je na 5 kg silikagela u stupcu. Stupac je eluiran sa 12 litara CH_2Cl_2 koji je sadržavao, jedno za drugim, 10%, 20%, 30% i 35% (vol/vol.) acetona. Odgovarajuće frakcije su kombinirane i koncentrirane na $\leq 35^\circ\text{C}$. Tako dobiveni ostatak je otopljen u acetonu i taložen u 10 dijelova 10% eter/heksana. Proizvod je filtriran i sušen pod vakuumom bez zagrijavanja. Glavna frakcija je sadržavala 147.5 g spoja formule (III) (čistoće 98.7%). Druge frakcije su sadržavale sirov proizvod i ponovo su podvrgnute višestrukoj kromatografiji na silikagelu, sve dok nije dobiven proizvod čistoće barem 96-98%. Struktura je određena pomoću NMR i MS i pokazala se konzistentnom sa strukturom formule (III).

Primjer 3A

U 5 ml vode pripremljena je otopina koja sadržava 23.97 mg N-metilglukamina ("NMG") i 570.90 mg 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina ("HP β CD") sa 7.4 hidroksipropil skupina po molekuli HP β CD.

Ovoj otopini je dodano 100 mg spoja formule (III). Nakon blagog miješanja, dobiven je homogeni kompleks koji sadrži 20 mg/ml spoja formule (III). Molski odnosi tri komponente bili su 1 mol spoja formule (III) prema 2 mola NMG prema 6 molova HP β CD. Tako dobivena otopina je filtrirana kroz membranu od 0.45 μm , liofilizirana i čuvana na suhom mjestu. Za dobivanje farmaceutskog preparata je dodan farmaceutski prihvatljiv nositelj kao što je voda. Slični rezultati su dobiveni kada je korišten HP β CD koji je sadržavao od 3.9 do 7.5 hidroksipropil skupina po molekuli β -ciklodekstrina.

Gradenje bistre vodene otopine homogenog kompleksa dobivenog u skladu sa postupcima iz ovog Primjera provjereno je korištenjem standardnih tehnika, tj. nefelometrije sa rasutom svjetlošću i mjerenja širine linija u protonskoj NMR. Sigurno i djelotvorno davanje farmaceutskih preparata koji sadržavaju bistru vodenu otopinu homogenog kompleksa dobivenog prema postupcima iz sadašnjeg izuma, testirano je u različitim *in vivo* životinjskim modelima navedenim u Tablicama 1-4.

Primjer 3B

Ponovljen je postupak iz Primjera 3A, osim što je u vodenu otopinu 126 mg NMG i 350 mg spoja formule (III) dodano 1750 mg HP β CD koji sadržava 7.4 hidroksipropil skupina po molekuli. Molski odnosi tri komponente u tako dobivenoj homogenoj otopini bili su 1 mol spoja formule (III) na 3 mola NMG i 5 molova HP β CD. Ovoj otopini je dodano 500 mg manitola u granulama čistoće USP¹ i 10 mg Polysorbate-80 (Tween-80) NF. Količina Tween-80 je 2.85

mas.% u odnosu na masu spoja formule (III). Tako dobiveni otopina je filtrirana i liofilizirana kao što je opisano u Primjeru 3A.

Liofilizirani preparat je čuvan u ampulama, na suhom mjestu. Za dobivanje farmaceutskog preparata pogodnog za I.V. davanje dodaje se 20 ml sterilne vode.

Primjer 4

Primjeri koji slijede opisuju primjenu tehnike NMR kemijske mikrotitracije u određivanju konstanti ravnoteže za kompleksiranje 2,4-dihidroksi 6-metil fenil prstena (nekloriranog aromatičnog prstena) i 3,5-dikloro-2-metoksi-4-hidroksi 6-metil fenil prstena (dikloroaromatičnog prstena) iz NMG soli spoja formule (III), sa 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrinom (HP β CD) koji sadrži 7.4 i 3.4 hidroksipropil skupine po molekuli HP β CD i sa 2-hidroksipropil-γ-ciklodekstrinom (HP γ CD) koji sadržava 4.4 hidroksipropil skupine po molekuli HP γ CD. Mjerenja su vršena uz korištenje uređaja Varian XL 400 na 400 MHz, pri 20°C.

A. Pripremljena je otopina koja sadrži 10 mg spoja formule (III) po mililitru D₂O i 3 ekvivalenta N/metilglukamina (NMG). Ovoj otopini su dodavane porcije od po 1 mg HP β CD koji sadrži 7.4 hidroksipropil skupina po molekuli HP β CD. Mjerena je promjena kemijskog pomicanja metil skupine u 68-položaju i metilenskih protona u 54-položaju u formuli (III), u zavisnosti od povećanja količine HP β CD. Konstante ravnoteže za 50% kompleksiranja izračunate su korištenjem standardnih tehnika. Također je određen broj molova HP β CD potreban da bi se dostiglo 90% kompleksiranja, odnosno vezivanja na oba aromatična prstena. Broj molova HP β CD potreban da se dostigne 90% kompleksiranja na oba aromatična mjesta iznosio je 6.6; za dostizanje 50% kompleksiranja bilo je potrebno 2 mola HP β CD. Konstante ravnoteže navedene su u Tablici 8.

B. Ponovljen je postupak iz Primjera 4A, osim što je korišten HP β CD koji sadržava 3.4 hidroksipropil skupine po molekuli HP β CD. Rezultati su dani u Tablici 8. Broj molova HP β CD potreban da se dostigne 90% kompleksiranja na oba aromatična mjesta iznosio je 6.6.

C. Ponovljen je postupak iz Primjera 4A, osim što je korišten HP γ CD koji sadržava 4.4 hidroksipropil skupine po molekuli HP γ CD. Broj molova HP γ CD potreban da se dostigne 90% kompleksiranja na oba aromatična mjesta iznosio je 4.0; za dostizanje 50% kompleksiranja bilo je potrebno 1.4 mola. Rezultati su dani u Tablici 8.

1 USP=United States Pharmacopeia (označava čistoću propisanu za farmaceutsku primjenu; prim.prev.)

TABLICA 8

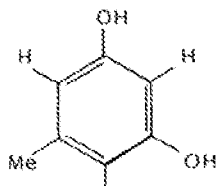
Konstante ravnoteže (litara/mol) za komplekse 1 mola spoja formule (III) i 3 mola NMG sa HP β CD i HP γ CD

<u>Mesto kompleksiranja u spoju (III)</u>	<u>HP β CD n¹=7.4</u>	<u>HP β CD n¹=3.4</u>	<u>HP γ CD n²=4.4</u>
Neklorirani aromatični prsten ³	183 ± 5	188 ± 5	355 ± 9
Dihloro-aromatični prsten ⁴	953 ± 18	983 ± 34	315 ± 28

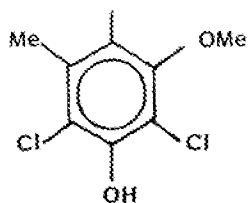
¹n = prosječan broj hidroksipropil skupina po molekuli HP β CD.

²n = prosječan broj hidroksipropil skupina po molekuli HP γ CD.

3 neklorirani aromatični prsten =



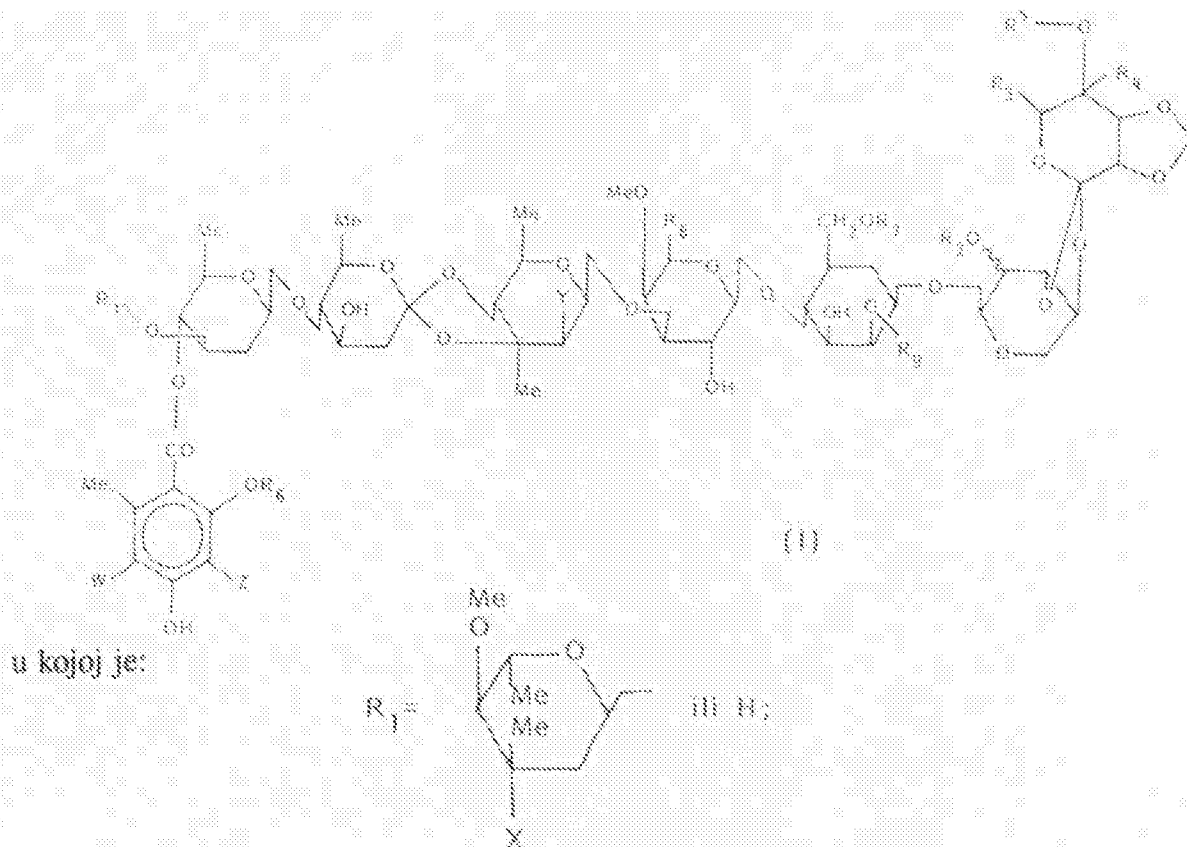
4 dikloroaromatični prsten =



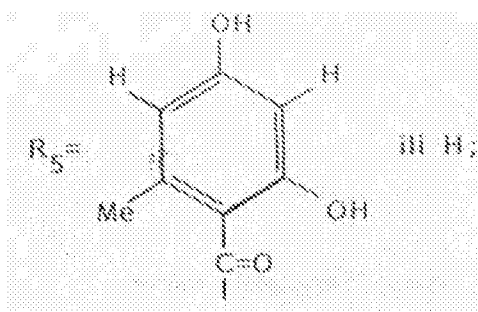
Korištenjem tehnike NMR kemijske mikrotitracije određeno je da količina HP β CD sa 7.4 hidroksipropil skupine po molekuli HP β CD po svakom molu 3:1 NMG soli antibiotika formule (III), potrebna za dostizanje 90% kompleksiranja na obje aromatične skupine u formuli (III) iznosi 6.6 molova, dok je za dostizanje 50% kompleksiranja na obje aromatične skupine u formuli (III) dovoljno 2 mola.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Preparat soli lipofilnih oligosaharidnih antibiotika, **naznačen time**, što sadržava:
 - a) lipofilni oligosaharidni antibiotik predstavljen formulom (I):



X predstavlja NO_2 , NO , NH_2 , NHCOCH_3 , NHOH , $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)$, $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, OH ili vodik; R_2 je CH_3 , $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, COCH_3 , $\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, COCH_2CH_3 ili vodik; R_3 je CH_3 ili vodik; R_4 predstavlja COCH_3 , $\text{CH}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ili vodik;



R_6 je CH_3 ili vodik; R_7 je CH_3 ili vodik; R_8 predstavlja CH_3 , CH_2OH ili vodik; R_9 je CH_3 ili vodik; Y je OH, CH_3 ili vodik; W je klor ili vodik; i Z je klor ili vodik;

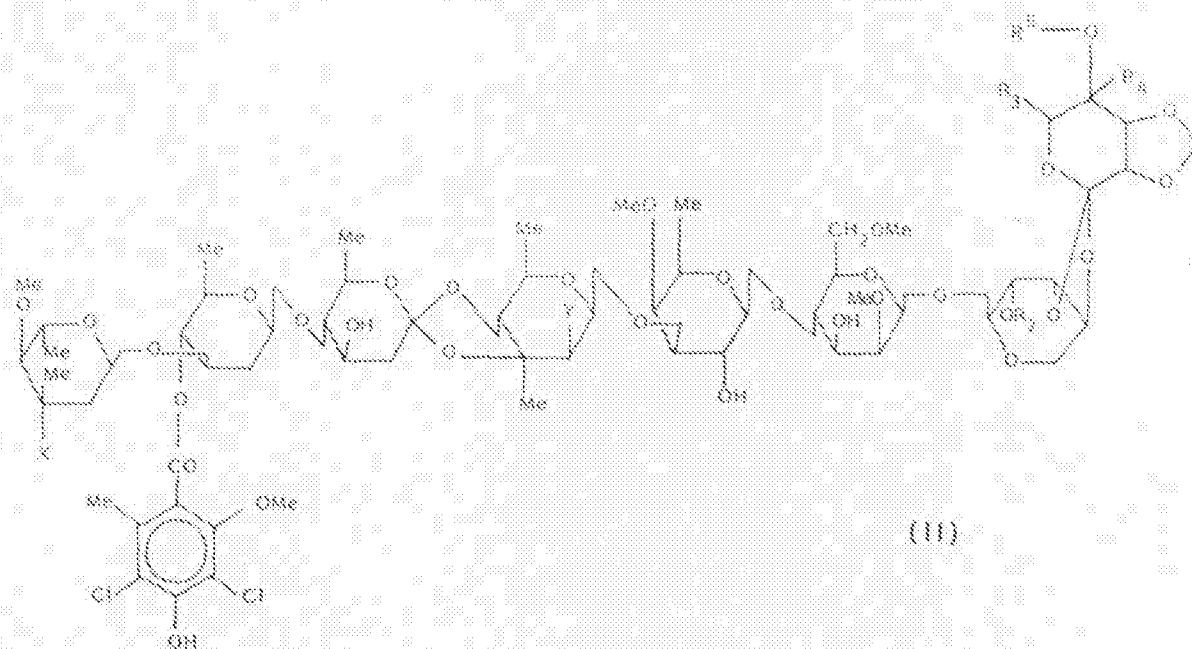
b) najmanje jednu približno stehiometrijsku količinu lužine koja je sposobna da gradi farmaceutski prihvatljivu sol sa lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom formule (I);

c) izvjesnu količinu dimetilsulfoksida, glicerola, sorbitanmono-9-oktadekanoatnog derivata poli(oksi-1,2-etandiila), ili hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina u kome je prosječan broj hidroksipropil supstituenata u navedenom α , β ili γ -ciklodekstrinu u opsegu od oko 2 do oko 15, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

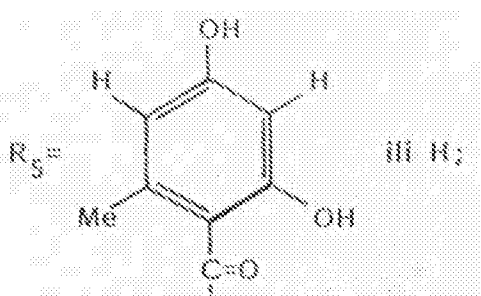
d) od 0 do 6,0 mas. % [na bazi količine antibiotika formule (I)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

2. Preparat soli lipofilnih oligosaharidnih antibiotika, **naznačen time**, što sadrži:

a) lipofilni oligosaharidni antibiotik predstavljen formulom (II):



u kojoj X predstavlja NO_2 , NO, NHOH, NH_2 , NHCOCH_3 , NHC_2H_5 , $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, OH ili vodik; Y je OH, CH_3 ili vodik; R_2 je CH_3 ili vodik; R_3 je vodik; R_4 predstavlja $\text{CH}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)$ ili vodik;



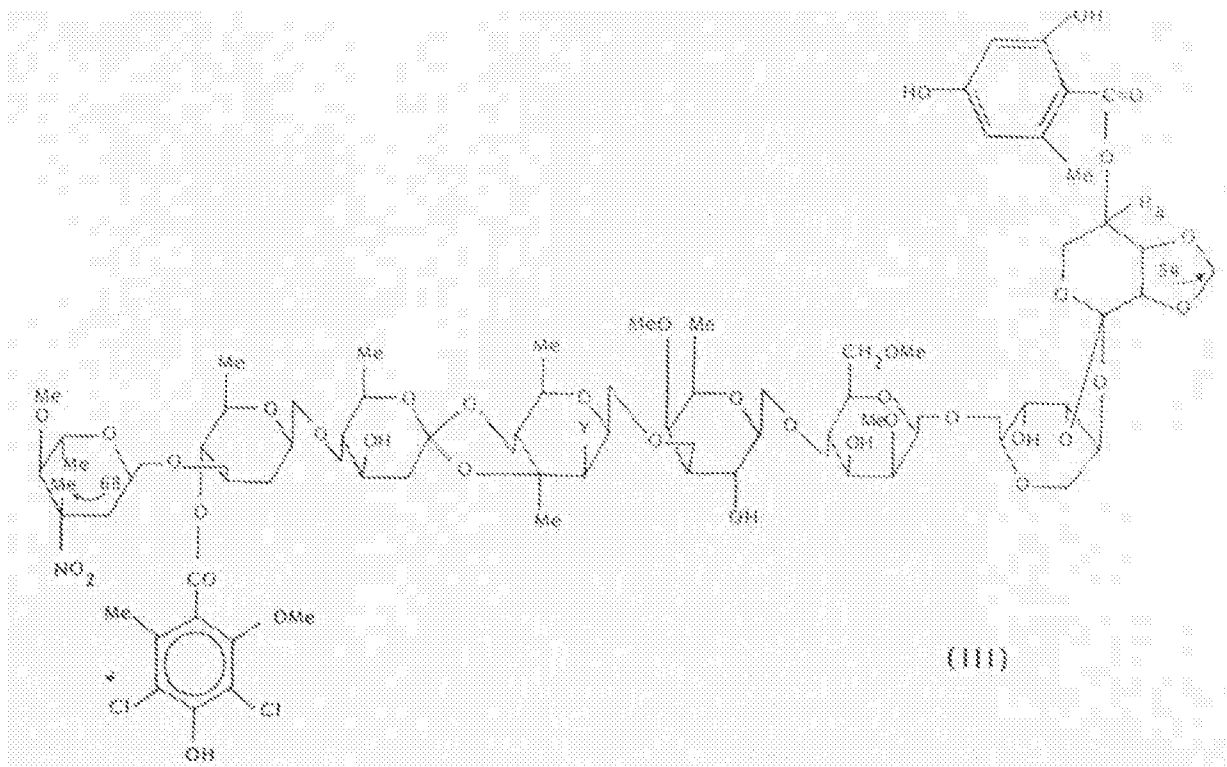
b) najmanje jednu približno stehiometrijsku količinu lužine koja je sposobna graditi farmaceutski prihvatljivu sol sa lipofilnim oligosaharidnim antibiotikom formule (II);

c) izvjesnu količinu hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina u kome je prosječan broj hidroksipropil supstituenata u navedenom α , β ili γ -ciklodekstrinu u opsegu od oko 2 do oko 15, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

d) od 0 do 6,0 mas.% [na bazi količine antibiotika formule (II)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

3. Preparat soli lipofilnih oligosaharidnih antibiotika, **naznačen time**, što sadržava:

a) antibiotski spoj predstavljen formulom (III):



b) najmanje oko dva ekvivalenta lužine [na svaki mol spoja formule (III)] koja je sposobna graditi farmaceutski prihvatljivu sol spoja formule (II);

c) određenu količinu hidroksipropil- α , β ili γ -ciklodekstrina sa oko 2 do oko 15 hidroksipropil skupina po molekuli navedenog α , β ili γ -ciklodekstrina, pri čemu je takva količina dovoljna da se postigne djelotvoran transfer navedenog lipofilnog oligosaharidnog antibiotika u serum životinje uz istodobno izbjegavanje nepoželjnog reakcijskog sindroma; i

d) od 0 do 6.0 mas. % [na bazi količine antibiotika formule (II)] farmaceutski prihvatljivog neionskog površinski aktivnog sredstva.

4. Preparat prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je lipofilni oligosaharidni antibiotik predstavljen formulom (I) odabran od flambamicina, everninomicina, antibiotika everninomicinskog tipa, kuramicina i avilamicina A-N.

5. Farmaceutska formulacija za tretiranje podložnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih infekcija, **naznačen time**, što sadrži antiinfektivnu količinu preparata iz zahtjeva 1, 2 ili 3, zajedno sa odgovarajućim farmaceutski prihvatljivim nositeljem.

6. Metoda za tretiranje podložnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih infekcija kod životinja, **naznačen time**, što se sastoji u davanju djelotvorne količine farmaceutske formulacije iz zahtjeva 5.

7. Metoda za sprečavanje pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma kod životinja, nakon davanja lipofilnog oligosaharidnog antibiotika predstavljenog formulom (I), (II) ili (III), uz istodobno davanje takvoj životinji antiinfektivne količine navedenog antibiotika, **naznačen time**, što se sastoji u parenteralnom davanju takvoj životinji antiinfektivne količine preparata iz zahtjeva 1, 2 ili 3 zajedno sa odgovarajućim farmaceutski prihvatljivim nositeljem.

8. Preparat prema zahtjevu 1, 2 ili 3, **naznačen time**, što je lužina odabrana od hloroprocaina, procaina, piperazina, glukamina, N-metilglukamina, N,N-dimetilglukamina, etilendiamina, dietanolamina, diizopropilamina, dietilamina, N-benzil-2-feniletilamina, N,N'-dibenziletilendiamina, holina, klemizola, tris(hidroksimetil)aminometana, D-glukozamina i natrij evog hidroksida.

9. Preparat prema zahtjevu 1, 2 ili 3, **naznačen time**, stoje lužina N/metilglukamin.

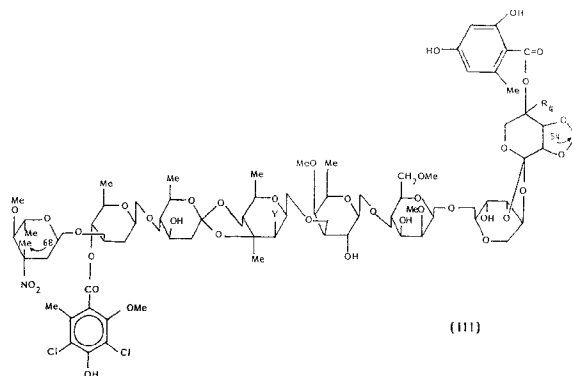
10. Preparat prema zahtjevu 1, 2 ili 3, **naznačen time**, što se koristi hidroksipropil- β -ciklodekstrin.

11. Farmaceutski preparat prema zahtjevu 5, **naznačen time**, što molski odnos komponenata (a):(b):(c) iznosi 1:2-3:1-6.

12. Korištenje preparata iz zahtjeva 1, 2 ili 3 za izradu lijekova za tretiranje ili prevenciju gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterijskih infekcija kod životinja.

SAŽETAK

Opisani su farmaceutski prihvatljivi preparati koji sadrže lipofilni oligosaharidni antibiotik, na primjer antibiotik everninomicinskog tipa formule (III), najmanje jednu stehiometrijsku količinu lužine, na primjer N-metilglukamina, određenu količinu na primjer hidroksipropil-beta-ciklodekstrina i, po potrebi, farmaceutski prihvatljivo neionsko površinski aktivno sredstvo, na primjer Tween 80. Također su opisane farmaceutske formulacije koje sadrže navedene preparate, metode za tretiranje i prevenciju bakterijskih infekcija kod životinja, a naročito ljudi, kao i metode za sprečavanje pojave nepoželjnog reakcijskog sindroma uz istodobno davanje takovoj životinji antiinfektivne količine lipofilnog oligosaharidnog antibiotika kao što je onaj predstavljen formulom (III). Obuhvaćeno je i korištenje opisanih preparata u izradi lijekova za spomenuto tretiranje ili prevenciju.



Slika 1.

