



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 05.06.65 (P. 175343)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 31.05.73

Opis patentowy opublikowano: 15.08.1977

MKP
C07c 49/38
C07c 35/22

Int. Cl.²
C07C 49/38
C07C 35/22

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
P. R. L.

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Biochemie Gesellschaft m.b.H., Wiedeń (Austria)

Sposób wytwarzania nowych pochodnych antybiotyku pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych pochodnych antybiotyku pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia o wzorze 1, w którym X oznacza grupę $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ albo $-\text{CH}=\text{CH}_2$, Z oznacza atom wodoru albo grupę o wzorze 2 i p oznacza liczbę całkowitą 1 - 12, a Y oznacza grupę hydroksylową albo atom chlorowca, oraz ich soli.

Wytworzone według wynalazku nowe pochodne pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia o wzorze 1 są w wodzie nierozpuszczalne, jednakże w postaci ich soli są rozpuszczalne. Nierozpuszczalne w wodzie pochodne nadają się bardzo dobrze jako dodatki do mieszanek gotowych środków paszowych, ponieważ stanowią bardzo dobrą postać transportu antybiotyku pleuromutiliny lub jego produktu uwodornienia.

Zaletą stosowania nowych pochodnych antybiotyku pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia o wzorze 1 oraz ich soli jako dodatku do mieszanek gotowych środków paszowych polega na tym, że uwolniony po rozczepieniu pochodnych w żywym organizmie antybiotyk pleuromutilina lub produkt jej uwodornienia, w ilościach zwykle przyjętych w mieszanekach gotowych środków paszowych, nie zostaje resorbowana i dlatego nie trzeba obawiać się rozwoju kultur bakterii, które są odporne na działanie antybiotyków, stosowanych dla człowieka.

Według wynalazku można otrzymać pochodną antybiotyku pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia oraz ich sole, poddając antybiotyk pleuromutilinę lub produkt jej uwodornienia o wzorze 3, w którym X ma wyżej podane znaczenie, reakcji z halogenkami lub bezwodnikami kwa-

2

sów dwukarboksylowych o wzorze $(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_p-(\text{COOH})$, w którym p ma wyżej podane znaczenie i przeprowadzając ewentualnie otrzymane związki o wzorze 1 w ich sole.

5 Wyżej opisane reakcje przeprowadza się w znany sposób.

Nowe związki o wzorze 1 są wprawdzie nierozpuszczalne w wodzie, jednak można je przeprowadzić w związki rozpuszczalne w wodzie przez reakcję z zasadami.

10 Reakcję związków o wzorze 3 z wyżej wymienionymi halogenkami albo bezwodnikami kwasów dwukarboksylowych, np. bezwodnikiem kwasu bursztynowego, przeprowadza się w znany sposób, np. w zasadowym rozpuszczalniku organicznym, jak np. pirydyna albo w mieszaninie toluenu i trójetyloaminy, węglanu potasu i acetonu albo w mieszaninie benzenu i pirydyny albo dioksanu i pirydyny w temperaturze od temperatury pokojowej do temperatury wrzenia mieszaniny reakcyjnej. Korzystnie reakcję przeprowadza się w pirydynie w temperaturze około 100°C. Otrzymane przy tym związki o wzorze 1 wydobywa się w znany sposób, np. przez usunięcie rozpuszczalnika i oczyszcza w znany sposób, np. przez przekrystalizowanie.

20 Stosowany do powyższych reakcji jako związek wyjściowy antybiotyk pleuromutilinę (związek o wzorze 3, $\text{X}=-\text{CH}=\text{CH}_2$) otrzymuje się hodując w wodnych roztworach pożywek, zawierających źródło azotu i źródło węglowodanów, drobnoustroj Clitopilus passeckerianus (Pil.) Sing. (rodzina Tricholomataceae, rząd Agaricales, klasa Basidiomycetes), zdeponowany pod numerem 3100 w US-Departament of Agricultura (Northern

Utilisation Research and Development Division), Peoria, 111., lub jego warianty albo mutanty. Hodowlę można przeprowadzić w ten sposób, że wyżej podany drobnoustroj poddaje się fermentacji w kulturze wstępnej, zawierającej źródło węglowodanów i azotu, ekstrakt słodowy, a ponadto mąkę fasolową, ekstrakt drożdżowy, agar, pepton oraz sole mineralne i otrzymaną przy tym papkę fermentacyjną przenosi się następnie dla dalszej hodowli do roztworu fermentacyjnego, który zawiera jako źródło węglowodanów glikozę, a jako źródło azotu produkt autolizy drożdży piwnych oraz sole mineralne.

Po zakończeniu fermentacji utworzoną przy tym pleuromutilinę wyodrębnia się w znany sposób.

Otrzymana w ten sposób pleuromutilina jest łatwo rozpuszczalna w alkoholu, eterze, octanie butylu, acetonie, metyloizobutyloketonie, czteroglikolu i chloroformie, trudno rozpuszczalna w wodzie, eterze naftowym i cykloheksanie. Jej temperatura topnienia wynosi 167° (krystalizowana z mieszaniny $H_2O : C_2H_5OH = 4 : 1$), skręcalność optyczna ($\alpha_D^{20} = + 32^\circ$ (10%-owy roztwór w chloroformie). Antybiotyk pleuromutilina ma charakterystyczne maksima w widmie ultrafioletowym w pasmach 205 μm i 293 μm (w eterze), lub 209 μm i 290 μm (w 60%-owym etanolu), oraz charakterystyczne pasma adsorpcyjne w widmie podczerwonym 3400, 3000, 1235 i 1095 cm^{-1} (pastylki z bromku potasowego) i przy 3570, 3610, 1730, 1740 i 1630 cm^{-1} (w roztworze w chlorku metylenu).

Przez katalityczne uwodornienie antybiotyku pleuromutiliny w znany sposób otrzymuje się jej dwuhycrozwiązek (związek o wzorze 3, $X = -CH_2-CH_3$).

Otrzymane sposobem według wynalazku pochodne antybiotyku pleuromutiliny oraz produktu jej uwodornienia o wzorze 1 stanowią, jak już wyżej przedstawiono, wartościowe dodatki do mieszanek środków paszowych. Wielka zaleta przy stosowaniu pochodnych antybiotyku pleuromutiliny, jak również produktu jej uwodornienia polega na tym, że nie są one atakowane przez pozostałe składniki mieszanek gotowych środków paszowych, jak suche grzybnie, w szczególności z produkcji penicyliny, mąki z krwi i/lub substancje mineralne i/lub witaminy, a w szczególności koncentraty białkowe, np. mączka rybna.

Zawartość pochodnych antybiotyku pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia o wzorze 1 powinna wynosić na 1 kg mieszanki gotowych środków paszowych dla drobiu 2,5 – 50 mg i dla świń 10 – 50 mg w przeliczeniu na ilość antybiotyku pleuromutiliny. Cielętom i wołom tucznym mieszanek gotowych środków paszowych powinno się podawać w takiej ilości, aby zostało przyjętych dziennie 25 – 70 mg substancji czynnej.

Przy dodatku większych ilości pochodnych antybiotyku pleuromutiliny albo produktu jej uwodornienia uzyskuje się korzystne działanie przeciwko zoopatogenicznym drobnoustrojom, tak że możliwe jest stosowanie tych związków w lecznictwie zwierząt.

Następujące przykłady wyjaśniają wynalazek nie ograniczając jego zakresu.

Przykład 1. Wytwarzanie antybiotyku pleuromutiliny. Kulturę *Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100 na pożywce agarowej splukuje się wyjałowionym fizjologicznym roztworem soli kuchennej i 3 ml otrzymanej zawiesiny przeszczepia do 500 ml szerokoszyjnej kolby stożkowej, napełnionej 60 ml jałowego roztworu pożywki.

Pożywka do skosów agarowych: mąki fasolowej 10,0 g, KH_2PO_4 0,5 g, 1%-owego roztworu $FeCl_3$ 1,0 ml, ekstraktu drożdżowego 0,1 g ekstraktu słodowego 50,0 g, peptonu

1,0 g, agaru 15,0 g, dopełnić wodą destylowaną do 1000 ml, pH naturalne.

Roztwór pożywki fermentacyjnej: glikozy 50,0 g/l, N-autolizatu drożdży piwnych 1,0 g/l, KH_2PO_4 1,0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l, $Ca(NO_3)_2$ 0,5 g/l, NaCl 0,1 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g/l, dopełnić wodą destylowaną do 1000 ml, pH przed sterylizacją 6,0.

Po 120 godzinach fermentacji w temperaturze 24°C na wytrząsarce obrotowej o skoku 40 mm i 250 obrotach na minutę, zawartość 500 ml szerokoszyjnej kolby stożkowej nabiera konsystencji gęstej brei. Z niej 10 ml stosuje się do zaszczepienia 2 l szerokoszyjnej kolby stożkowej, o pojemności 2 l, napełnionej 200 ml powyższego roztworu jałowej pożywki fermentacyjnej. Hodowlę prowadzi się w tych samych warunkach, jak przy prowadzeniu pierwszego etapu wstępnego. Po upływie 48 godzin otrzymaną papkę fermentacyjną zaszczepia się wypełnioną 10 l wyżej podanego jałowego roztworu pożywki fermentacyjnej kadzi fermentacyjnej typu New-Brunswick-Submers, wyposażoną w układ przegród. Fermentację prowadzi się w ciągu 120 godzin przy przepływie powietrza 0,5 l/l roztworu pożywki na minutę i szybkości obrotowej mieszadła tarczowego 350 obrotów na minutę.

Następnie całą zawartość kadzi fermentacyjnej odparowuje się do sucha w wyparce próżniowej w temperaturze pokojowej i otrzymany placek miele na drobno.

W ten sposób otrzymuje się z użytych 10 l roztworu pożywki 200 g suchego proszku o zawartości 5 g pleuromutiliny.

Przykład II. Produkt reakcji pleuromutiliny z bezwodnikiem kwasu bursztynowego. 1 g bezwodnika kwasu bursztynowego ogrzewa się z 3,7 g pleuromutiliny w bezwodnej pirydynie w ciągu 5 godzin do temperatury 100°C. Po usunięciu rozpuszczalnika pod obniżonym ciśnieniem pozostałość przekrystalizowuje się z benzenu. Otrzymuje się 3 g bursztynianu pleuromutiliny. Związek ma wzór sumaryczny $C_{26}H_{38}O_8$ (solwat benzenowy), temperatura topnienia wynosi 83° – 85°C. Wolny kwas ma silną skłonność do tworzenia solwatów i tak przy elektrometrycznym miareczkowaniu w 50%-owym alkoholu otrzymuje się jako ciężar równoważnikowy wartość 545, przy teoretycznej wartości 556.

Z wolnego kwasu wytwarza się sól sodową przez rozpuszczanie go w eterze, wytrząsanie fazy organicznej z równoważnikową ilością 3%-owego roztworu wodnego $NaHCO_3$ i następnie zliofilizowanie fazy wodnej.

Dalsza droga do wytworzenia soli sodowej z wolnego kwasu jest następująca: kwas pobiera się w alkoholu butylowym, roztwór zadaje się równoważnikową ilością octanu sodowego w butanolu, zatęża całość pod zmniejszonym ciśnieniem, ochładza i pobudza krystalizację przez zaszczepienie lub zacieranie. Wytrąconą sól sodową odsącza się, przemywa najpierw butanolem, a następnie eterem. Otrzymuje się bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie bursztynian pleuromutiliny.

Przykład III. Produkt reakcji dwuwodoropleuromutiliny z bezwodnikiem kwasu bursztynowego. Otrzymaną przez uwodornienie pleuromutiliny według przykładu II dwuwodoropleuromutilinę przeprowadza się przez reakcję z bezwodnikiem kwasu bursztynowego w bursztynian dwuhydropheuromutiliny.

Produkt ten jest jednak również dostępny w ten sposób, że najpierw pleuromutilinę estryfikuje się bezwodnikiem kwasu bursztynowego i otrzymany bursztynian pleuromu-

tiliny przeprowadza się nad tlenkiem platyny w bursztynian dwuhydropleuromutiliny.

Przykład IV dwuetyloaminoetanowa jednobursztynianu pleuromutiliny. 380 g pleuromutiliny, 100 g bezwodnika kwasu bursztanowego, 140 ml trójetyloaminy i 2 l toluenu wytrząsa się na wytrząsarce firmy Janke i Kunkel, w ciągu 8 godzin, przechylając najpierw kolbę lub butelkę ręcznie aż do rozpuszczenia się składników reakcji. Bardzo szybko zaczyna się wydzielać krystaliczny produkt reakcji. Po odstaniu w ciągu nocy przenosi się osad do rozdzielacza, dodaje około 2,5 l wody i 110 g NaHCO₃ i wytrząsa do momentu rozpuszczenia się. Wtedy oddziela się toluen i fazę wodorowęglanową przemywa jeden raz eterem. Teraz ekstrahuje się dwukrotnie eterem, zakwaszając rozcieńczonym kwasem fosforowym do pH 2, przemywa ekstrakt eterowy i osusza za pomocą Na₂SO₄. Po przesączeniu objętość wynosi 3740 ml. Liczba kwasowa 2,65.

Po dodaniu 116 ml dwuetyloaminoetanolu w 200 ml eteru wydziela się lepki olej, który po zacieraniu łopatką krystalizuje. Masę można dobrze odsączyć, po czym po przemyciu niewielką ilością eteru suszy się ją w suszarce próżniowej w niskiej temperaturze. Temperatura topnienia 122 – 126°C.

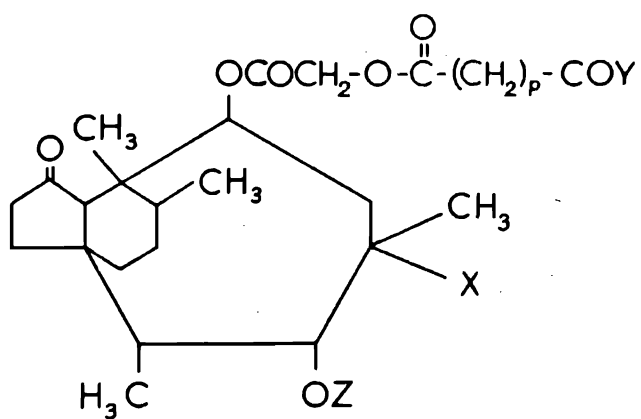
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych pochodnych pleuromutiliny lub produktu jej uwodornienia o wzorze 1, w którym X oznacza grupę -CH₂-C(CH₃)₃ albo -CH=CH₂, Z oznacza atom wodoru albo grupę o wzorze 2 i p oznacza liczbę całkowitą 1 – 12 a Y oznacza grupę hydroksylową albo atom chlorowca, oraz ich soli, **znamienny tym**, że pleuromutilinę lub produkt jej uwodornienia o wzorze 3, w którym X ma wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji z halogenkami albo bezwodnikami kwasów dwukarboksylowych o wzorze (COOH)-(CH₂)_p-(COOH), w którym p ma wyżej podane znaczenie i otrzymane w ten sposób związki o wzorze 1 ewentualnie przeprowadza się następnie w ich sole przez reakcję z zasadami.

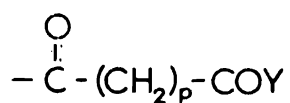
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pleuromutilinę poddaje się reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dwuhydropleuromutilinę poddaje się reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego.

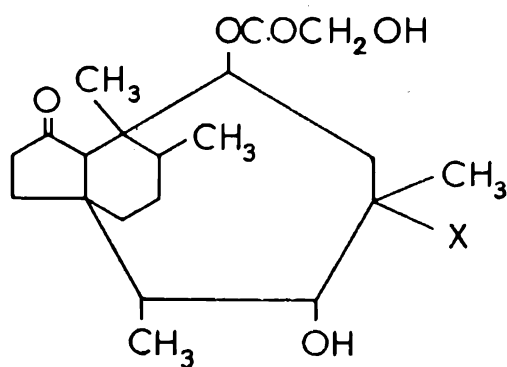
90719



WZÓR 1



WZÓR 2



WZÓR 3



Skład wykonano w DSP, zam. 1230
Druk w UP PRL, nakład 125 + 20 egz.

Cena zł 10,-