



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

① CH 663 034 A5

⑤ Int. Cl.⁴: C 12 P 19/62
C 07 H 17/08
A 61 K 31/71

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

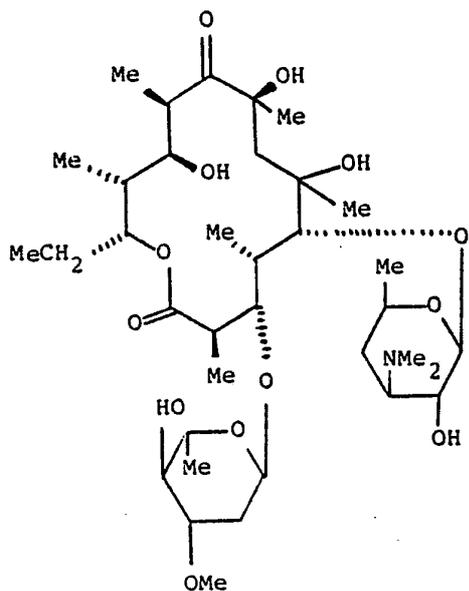
⑲ Numero della domanda: 97/82	⑲ Titolare/Titolari: Pierrel S.p.A., Napoli (IT)
⑳ Data di deposito: 08.01.1982	⑳ Inventore/Inventori: Cappelletti, Leonardo M., Fayetteville/NY (US) Spagnoli, Roberto, Milano (IT) Toscano, Luciano, Milano (IT)
㉑ Priorità: 09.01.1981 IT 19081/81	
㉒ Brevetto rilasciato il: 13.11.1987	
㉓ Fascicolo del brevetto pubblicato il: 13.11.1987	㉔ Mandatario: Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder, Zürich

⑤④ **Composti macrolidici ad attività antibiotica, procedimento e microorganismo per la loro preparazione, e relative composizioni farmaceutiche.**

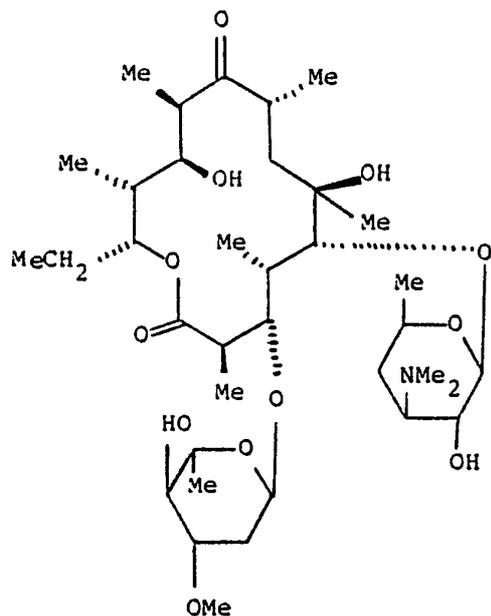
⑤⑦ La fermentazione di un substrato scelto tra eritronolide B, eritronolide A ed eritronolide A ossima con un nuovo mutante, *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771, derivato da un ceppo industriale per la produzione di oleandomicina, detto nuovo mutante essendo incapace di produrre la stessa oleandomicina, porta alla produzione di nuovi antibiotici macrolidici, aventi non soltanto spettro di azione simile a quello dell'eritromicina, ma caratterizzati da una maggiore stabilità in ambiente acido, cosicché per la somministrazione dell'antibiotico non è più necessario il ricorso ad esteri e/o sali fortemente tossici per l'organismo.

RIVENDICAZIONI

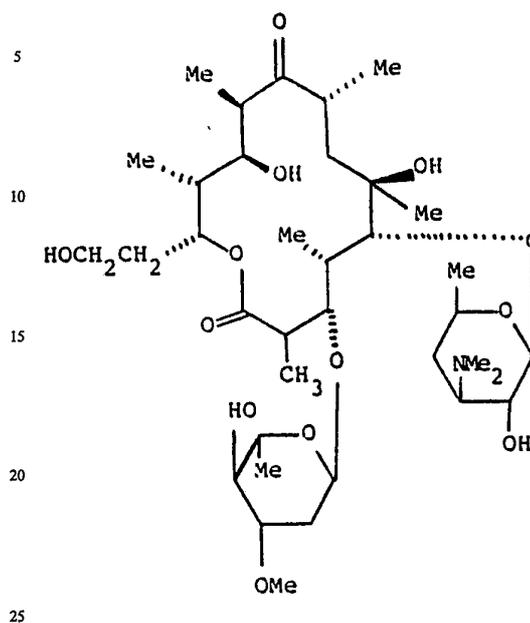
1. 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8-idrossieritronolide B, avente formula



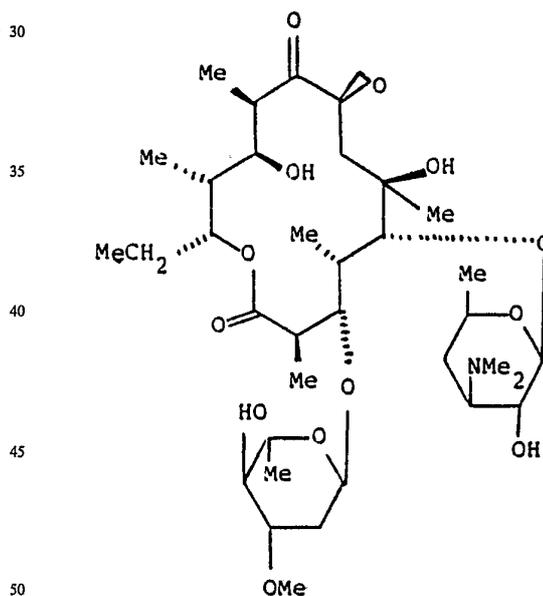
2. 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B, avente formula



3. 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-15-idrossieritronolide B, avente formula



4. 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8R)-8,19-epossieritronolide B, avente formula



5. Procedimento per la preparazione di antibiotici macrolidici, caratterizzato dal fatto che si prepara una brodocoltura vegetativa di *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 e nel caso di una fermentazione attuata, viene aggiunta di un substrato scelto tra eritronolide B, eritronolide A ed eritronolide A ossima, procedendo quindi all'isolamento dei singoli antibiotici individuali mediante tecniche di TLC.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto substrato è eritronolide B e l'incubazione viene effettuata per 100 ore, dopo di che in un campione della brodocoltura si verificano la presenza e l'identità degli antibiotici prodotti, mediante TLC e bioautografia oppure spruzzatura delle piastre con reattivo all'ansaldeide, il brodo di fermentazione essendo quindi sottoposto a filtrazione, salatura ed estrazione con un solvente organico, con separazione di una fase acquosa e di una fase organica.

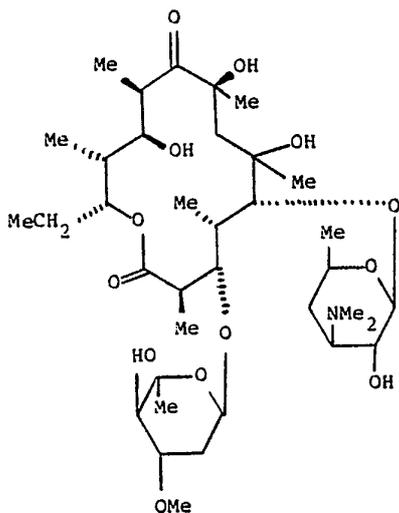
scopo ancora della presente invenzione è quello di fornire una composizione ad attività antibiotica per il trattamento di malattie e disturbi indotti da germi e batteri sensibili all'azione dell'eritromicina e di antibiotici ad essa simili.

Questi scopi vengono conseguiti con i nuovi antibiotici macrolidici ed il relativo procedimento di preparazione secondo la presente invenzione che si caratterizza per il fatto che per la fermentazione, condotta in modo di per se noto, si utilizza un substrato scelto tra eritronolide B, eritronolide A ed eritronolide A ossima e, quale agente di fermentazione, lo *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771.

L'agente di fermentazione anzidetto, ossia lo *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 viene derivato dallo *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891 mediante trattamento mutageno con raggi ultravioletti, con un massimo di emissione a 254 nm e ad una dose da uccidere circa il 99,6% delle spore, il microorganismo desiderato essendo inoltre caratterizzato dalla incapacità di produrre oleandomicina.

Esaminando in maggiore dettaglio i nuovi antibiotici macrolidici della presente invenzione, essi vengono qui di seguito individuati in base al substrato dal quale vengono ottenuti ed in base alle caratteristiche di analisi cromatografica (essendo indicato tra parentesi il riferimento proprio della Richiedente).

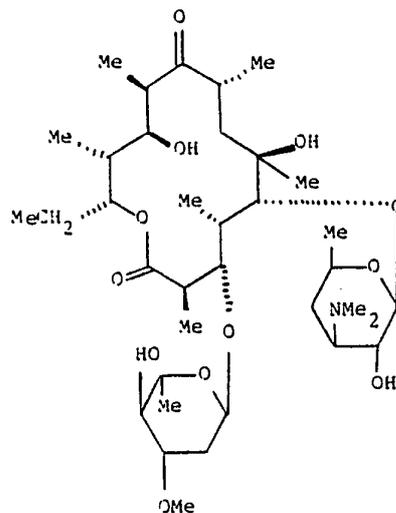
1) 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8-idrossieritronolide B (P 15148) avente formula



È ottenuto con il microorganismo dell'invenzione da eritronolide B; all'analisi cromatografica su strato sottile (TLC) presenta R_{st} di 0.8 rispetto all'oleandomicina e R_{st} di 0.75 rispetto all'eritromicina A. Utilizzando il reattivo all'ansaldeide (al quale la oleandomicina si colora di viola e l'eritromicina A di marrone) questo antibiotico appare di colore porpora.

In HPLC (cromatografia in fase liquida ad alta pressione) il picco corrispondente a P 15148 ha un tempo di ritenzione relativo all'eritromicina A di 0.69 e relativo all'oleandomicina di 1.08.

2) 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B (P 15149), avente formula

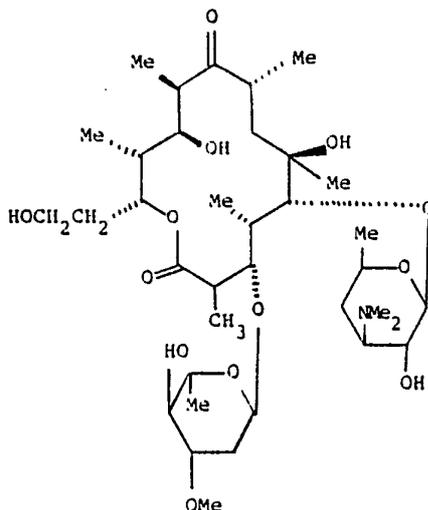


È anch'esso ottenuto per fermentazione di eritronolide B, e presenta R_{st} di 0.9 rispetto all'oleandomicina e R_{st} di 0.85 rispetto all'eritromicina A.

Nella prova all'ansaldeide risulta anch'esso colorato di color viola.

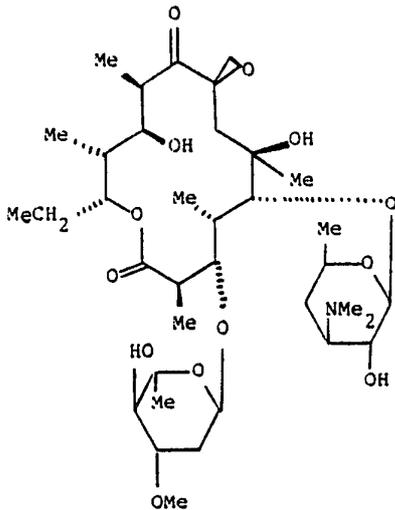
In HPCL il picco corrispondente a P 15149 ha un tempo di ritenzione relativo all'eritromicina A di 0.79 e relativo all'oleandomicina di 1.22.

3) 3-O-oleandrosyl-5-O-desosaminil-15-idrossieritronolide B (P 15150), avente formula



È derivato per fermentazione con *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 da eritronolide B quale substrato e presenta R_{st} di 0.47 rispetto all'oleandomicina e R_{st} di 0.44 rispetto all'eritromicina A. Nella prova all'ansaldeide risulta di color porpora. In HPLC il picco corrispondente a P 15150 ha un tempo di ritenzione relativo all'eritromicina A di 0.52 e relativo all'oleandomicina di 0.80.

4) 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8R)-8,19-epossieritronolide B (P 15153), avente formula



È ottenuto per fermentazione con il microrganismo dell'invenzione da eritronolide B; all'analisi cromatografica su strato sottile (TLC) presenta R_{st} di 0,8 rispetto all'oleandomicina e R_{st} di 0,75 rispetto all'eritromicina A. Utilizzando il reattivo all'ansaldeide questo antibiotico appare di color viola.

In HPLC il picco corrispondente a P 15153 ha un tempo di ritenzione relativo all'eritromicina A di 0,64 e relativo all'oleandomicina di 0,99. Per questi quattro antibiotici, ottenuti in miscela da eritronolide B, dopo 100 ore di fermentazione e prima dell'isolamento, l'attività antibiotica totale espressa come attività di eritromicina A risulta essere di circa 120-150 mcg/ml.

5) P 15151: si ottiene dalla fermentazione con lo *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 da eritronolide A e presenta R_{st} di 0,88 rispetto all'oleandomicina ed R_{st} di 0,8 rispetto all'eritromicina A.

5 Dall'analisi della brodocoltura, dopo 90 ore di fermentazione, si trova un'attività antibiotica espressa come attività di eritromicina A di circa 70 mcg/ml.

6) P 15152: ottenuto da eritronolide A ossima, presenta R_{st} di 0,47 rispetto all'oleandomicina e di 0,44 rispetto all'eritromicina A.

Dall'analisi della brodocoltura, dopo 90 ore di incubazione, si rivela un'attività antibiotica totale di circa 50 mcg/ml (espressa come attività di eritromicina A), questa attività essendo tuttavia riferita alla miscela di P 15152 e di un altro antibiotico, ottenuto concomitantemente, che risulta essere lo stesso già descritto in J. Antib. (1976), 29, 728.

Passando ora a considerare i nuovi antibiotici macrolidici 20 ottenuti secondo la presente invenzione, essi si caratterizzano tutti per uno spettro batteriologico simile a quello dell'eritromicina e per la stabilità in ambiente acido, cosicché è possibile la somministrazione diretta per via orale, senza dover ricorrere ad esteri e/o sali, con i sopra menzionati inconvenienti e problemi. 25 Ciò è confermato dalla tabella 1 che segue, in cui sono riportati i valori della MIC, indicanti il potere batteriostatico e dalla tabella 2 che fornisce invece le stabilità in ambiente acido. Senza che ciò debba essere inteso in senso limitativo, sembra plausibile attribuire la maggiorata stabilità degli antibiotici macrolidici 30 secondo l'invenzione alla presenza nella molecola dell'antibiotico dello zucchero neutro oleandrosio (J. Antib. (1976) XXIX (7), 728).

TABELLA 1

Potere batteriostatico in terreno solido di Eritromicina A, Eritromicina B, Oleandomicina P 15149-P 15148-P 15153-P 15150 su ceppi batterici aerobi ed anaerobi, Gram positivi e Gram negativi. Concentrazioni minime inibenti espresso in mcg/ml

Microorganismo	Prodotto	Eritromicina A	Eritromicina B	oleandomicina	P 15149	P 15148	P 15153	P 15150
1. AEROBI								
A. GRAM POSITIVI								
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	LRP 39	0,049	0,097	0,39	0,78	1,56	0,195	3,12
» »	LRP 14**	0,049	0,095	0,39	0,78	1,56	0,195	3,12
» » » 14154	LRP 78*	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Streptococcus faecalis	LRP 7	0,097	0,195	1,56	0,78	0,78	0,78	6,25
» » sub. zymogenes ATCC 12958	LRP 61	0,195	0,195	1,56	0,78	0,78	0,39	3,12
Streptococcus pneumoniae ATCC 6303	LRP 35	0,012	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,195
» »	LRP 52	0,012	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,195
» »	LRP 53	0,012	0,024	0,195	0,097	0,097	0,024	0,39
» pyogenes ATCC 8668	LRP 34	0,012	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,097
» »	LRP 197	0,012	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,097
Corynbacterium diphteriae	LRP 24	0,006	0,012	0,097	0,049	0,097	0,024	0,097
Micrococcus Luteus ATCC 9341	LRP 6	0,006	0,006	0,049	0,097	0,049	0,024	0,195
» » ATCC 15957	LRP 193*	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Bacillus subtilis	LRP 25	0,049	0,049	0,39	0,39	0,78	0,195	3,12
B. GRAM NEGATIVI								
Haemophilus influenzae ATCC 19418	LRP 213	3,12	6,25	>25	6,25	>25	12,5	>25
Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424	LRP 214	0,049	0,097	0,195	0,195	1,56	0,195	0,195
Escherichia coli	LRP 50	6,25	25	>25	>25	>25	25	>25

TABELLA 1 (continuazione)

Microorganismo	Prodotto	Eritromicina A	Eritromicina B	oleandomicina	P 15149	P 15148	P 15153	P 15150
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LRP 54	25	25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	LRP 13	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LRP 9	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Salmonella typhi</i>	LRP 8	12,5	25	>25	>25	25	25	25
<i>Shigella sonnei</i>	LRP 5	12,5	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>Acholeplasma laidlawii</i> ATCC 23206	LRP 204	0,097	0,097	6,25	12,5	6,25	1,56	6,25
<i>Mycoplasma hominis</i> I ATCC 14027	LRP 211	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
2. ANAEROBI								
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624	LRP 206	1,56	1,56	3,12	12,5	>25	3,12	6,25
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745	LRP 205	0,195	0,195	0,39	3,12	6,25	6,25	>25
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 27852	LRP 210	1,56	6,25	6,25	>25	>25	25	>25

Legenda: * eritromicina resistente
** penicellina resistente

TABELLA 2

Stabilità in ambiente acido a 25°C dei nuovi antibiotici in confronto con eritromicina A

Eritromocina A	30		
pH	2.0	3.0	4.0
t $\frac{1}{2}$ (minuti)	2	6	120
P 15148			
pH	2.0	3.0	4.0
t $\frac{1}{2}$ (ore)	27	>100	>100
P 15149			
pH	2.0	3.0	4.0
t $\frac{1}{2}$ (ore)	18	>100	>100
P 15150			
pH	2.0	3.0	4.0
t $\frac{1}{2}$ (ore)	>100	>100	>100
P15153			
pH	2.0	3.0	4.0
t $\frac{1}{2}$ (ore)	65	>100	>100

Nota bene: t $\frac{1}{2}$ rappresenta il tempo di dimezzamento dell'antibiotico determinato mediante cromatografia in fase ad alta pressione (HPLC).

Gli esempi che seguono illustrano a titolo non limitativo la preparazione del microorganismo *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771, e dei nuovi antibiotici dell'invenzione.

Esempio 1

Ottentimento del mutante *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771

Una sospensione di spore di *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891, produttore di oleandomicina, è stata sottoposta a trattamento mutageno con raggi ultravioletti (massimo di emissione a 254 nm) ad una dose tale da uccidere circa il 99.6% delle spore (circa 3000 erg/cm²).

Le spore sopravvissute sono state piastrate su un terreno nutritivo e le colonie risultanti sono state analizzate per la loro incapacità di produrre oleandomicina utilizzando la tecnica descritta da A. KELNER (1949) J. Bact. 57, 73.

I mutanti bloccati nella sintesi della oleandomicina (circa il 2% dei sopravvissuti) sono stati quindi analizzati per la loro capacità di riconoscere e trasformare i substrati eritronolide B, eritronolide A ed eritronolide A ossima in nuovi composti ad attività antibiotica.

Esempio 2

Preparazione degli antibiotici 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8-idrossieritronolide B (P 15148), 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B (P 15149), 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8R)-8,19-epossieritronolide B (P 15153) e P 15150.

Metodo A

Il mutante *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 viene mantenuto su coltura agarizzate a becco di clarino («slants») del seguente terreno:

— Peptone	0.2	grammi per 100 ml
— Glicerina	0.5	» » » »
— Melasso di canna	0.5	» » » »
— K ₂ HPO ₄	0.1	» » » »
— MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	» » » »
— NaCl	0.5	» » » »
— FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001	» » » »

— CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.002	grammi per 100 ml
— Agar	2.0	» » » »
— Acqua distillata	a volume	
— pH corretto a 7.0		

Con una ansata di spore di uno slant si inocula una beuta Erlenmeyer da 500 ml contenente 50 ml di terreno vegetativo della seguente composizione:

— Destrosio	1.5	grammi per 100 ml
— Farina di soia	3.0	» » » »
— Autolisato di lievito	0.1	» » » »
— MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	» » » »
— Calcio carbonato	1.0	» » » »
— Olio di soia	0.6	» » » »
— Acqua distillata	a volume	

La beuta viene incubata a 28°C su shaker rotativo a 220 rpm per 24 ore. Dopo tale periodo, con 15 ml di tale coltura si inocula un fermentatore in vetro da 10 litri contenente 5 litri del suddetto terreno.

Si incuba tale fermentatore a 28°C, con una agitazione di 800 rpm ed un flusso d'aria di 0.6 V/V/minuto per 16 ore. Al termine di tale periodo, 3,5 litri della suddetta coltura vengono utilizzati per inoculare un fermentatore in acciaio da 200 litri contenente 100 litri del seguente terreno:

— Destrosio	5.0	Grammi per 100 ml
— Farina di soia	2.0	» » » »
— Lievito di birra secco	0.4	» » » »
— Farina di mais	1.6	» » » »
— Calcio carbonato	3.0	» » » »
— NaCl	0.3	» » » »
— Olio di lardo	1.0	» » » »
— Acqua di rete	a volume	

L'incubazione viene effettuata a 28°C con una agitazione di 250 rpm ed una aereazione di 1 V/V/minuto.

Dopo 32 ore di crescita si aggiungono alla coltura 75 grammi di eritronolide B e si protrae l'incubazione per altre 68 ore.

Al termine di tale periodo un campione della brodocoltura viene filtrato ed estratto a pH 8.5 con pari volume di CH₂Cl₂.

L'estratto viene analizzato per TLC su lastre al gel di silice sviluppate per 2 ore col sistema: CH₂Cl₂: Metanolo 95%: NH₄OH conc. (90:10:1).

Su tale piastra si effettua una bioautografia contro *Micrococcus luteus*. (*Sarcina lutea*) ATCC 9341 o alternativamente le piastre possono essere spruzzate con un reattivo alla anisaldeide (0.5% V/V di anisaldeide in una miscela di metanolo: acido acetico glaciale: acido solforico conc., 85/10/5) e riscaldate a 120°C per 5 minuti.

Nelle condizioni di fermentazione suddette e, parallelamente all'utilizzo dell'eritronolide B, vengono prodotte quattro nuove sostanze ad attività antibiotica denominata P 15148, P 15149, P 15150 e P 15153. In TLC queste presentano R_{st} di 0.8, 0.9, 0.47 e 0.8 rispetto all'oleandomicina.

Rispetto all'eritromicina A tali R_{st} sono 0.75, 0.85, 0.44 e 0.75.

Utilizzando il reattivo all'ansaldeide, i prodotti P 15148, P 15150 e P 15153 appaiono color porpora, mentre P 15149 risulta viola (l'oleandomicina risulta viola, mentre l'eritromicina A risulta marrone).

Un campione dell'estratto organico viene controllato anche all'HPLC, a tal scopo viene evaporato a secchezza, ripreso con acetonitrile e iniettato in colonna (RP8 10 µm 25 cm; fase mobile tampone fosfato 0.01 M pH7/acetoneitrile 36:64; flusso 2 ml/min; temperatura colonna 40°C). Per le nuove sostanze P 15148, P 15149, P 15150 e P 15153 si evidenziano picchi con

tempi di ritenzione relativi all'eritromicina A di 0.69, 0.79, 0.52 e 0.64 e relativi all'oleandomicina di 1.08, 1.22, 0.80 e 0.99.

Dopo 100 ore di fermentazione l'attività antibiotica totale espressa come attività dell'eritromicina A risulta essere di circa 120-150 mcg/ml. L'agitazione viene ridotta al minimo sospendendo l'erogazione di aria e la temperatura viene abbassata a 15°C.

Metodo B

Si prepara una coltura fermentativa di *Streptomyces erythreus* NRRL 2338 nelle condizioni descritte nella domanda di brevetto tedesca pubblicata (OS) 1900647 del 13.8.1970. Con l'aggiunta di n-propanolo al 4% V/V, dopo 144 ore di fermentazione, si ottengono nella brodocoltura circa 500 mcg/ml di eritronolide B e tracce di eritromicina (meno di 20 mcg/ml).

A tale età la coltura viene centrifugata ed il sovratanante limpido viene sterilizzato per filtrazione.

Si prepara una coltura vegetativa di *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 seguendo le modalità descritte nel metodo A.

Si effettua un secondo passaggio vegetativo nelle medesime condizioni inoculando con 1 ml di coltura vegetativa una seconda beuta Erlenmeyer da 500 ml contenente 50 ml di terreno vegetativo del metodo A.

Con 1,0 ml di coltura di secondo vegetativo si inocula una beuta Erlenmeyer da 500 ml contenente 30 ml del seguente terreno fermentativo:

— Destrosio	5.0	grammi per 100 ml
— Farina di soia	2.0	» » » »
— Lievito di birra	0.2	» » » »
— Farina di mais	0.3	» » » »
— Calcio carbonato	2.0	» » » »
— Acqua di rete	a volume	

La beuta si incuba a 28°C su shaker rotativo a 250 rpm. Dopo 32 ore di incubazione si aggiungono alla beuta 10 ml del sovratanante limpido sopra descritto e si prosegue l'incubazione per ulteriori 64 ore.

La coltura viene analizzata secondo le modalità descritte nel metodo A. Si ottiene una attività antibiotica totale di circa 30 mcg/ml (espressa come attività di eritromicina A) e mediante HPLC si rivela la presenza dei quattro nuovi antibiotici P 15148, P 15149, P 15150, P 15153 e tracce di eritromicina A.

Nelle beute di controllo dove non è stata effettuata aggiunta del filtrato contenente eritronolide B, l'attività antibiotica è assente.

Esempio 3

Purificazione degli antibiotici 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8-idrossieritronolide B (P 15148), 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B (P 15149), 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8R)-8,19-epossieritronolide B (P 15153) e P 15150.

Alla miscela di fermentazione finale, riportata nell'esempio 2 (metodo A), vengono aggiunti sotto agitazione 30 litri di una soluzione di ZnSO₄ al 10% P/V e 30 litri di NaOH al 2% P/V in acqua.

Dopo aggiunta di un coadiuvante di filtrazione, i solidi vengono rimossi per filtrazione su filtro rotativo sotto vuoto dopo lavaggio in continuo degli stessi sul pannello del filtro.

I solidi lavati vengono scartati e, alla fine della filtrazione, si recuperano 150 litri di filtrato limpido.

Il filtrato viene quindi salato con un opportuno sale quale NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ od altri aggiunto in ragione del 15-25% P/V onde facilitare la successiva estrazione con un opportuno solvente non miscibile in acqua. Il pH del filtrato viene corretto tra 5.4-6.2 con acidi diluiti, quali ad esempio fosforico od acetico.

In questa operazione si ha precipitazione di solidi inattivi che vengono eliminati per filtrazione.

Un opportuno solvente non miscibile in acqua quale butile acetato, cloroformio, metilisobutilchetone, metilene cloruro o dicloroetano viene messo in contatto mediante un estrattore centrifugo operante in continuo con il filtrato limpido, in un rapporto compreso tra il 20 ed il 50% V/V.

L'operazione è ripetuta due volte e le fasi organiche sono riunite insieme. Le fasi organiche riunite contengono prevalentemente P 15149. Nella fase acquosa sono presenti P 15148, P 15150, P 15153 e P 15149 residuo, non estratto completamente dalla fase organica.

La fase organica (circa 100 litri) viene distillata sotto vuoto a bassa temperatura fino ad un volume di circa 10 litri.

Sotto vigorosa agitazione si aggiungono 3 litri di tampone acetato 10^{-4} M a pH di circa 4.0 e le fasi vengono successivamente separate. L'operazione viene ripetuta 3 volte ed alla fine tutto il P 15149 è presente nella fase acquosa; il solvente, contenente molte impurezze, viene scartato.

Le fasi acquose riunite sono portate a pH di circa 8.0 con NaOH diluito e sono quindi estratte in tre riprese con 3 litri ciascuna di un solvente organico quale metilisobutilchetone o butile acetato.

La fase acquosa viene scartata e le fasi organiche sono riunite ed essiccate su Na_2SO_4 .

La soluzione essiccata viene distillata sotto vuoto a bassa temperatura sino ad un volume di 500 ml.

A 5 litri di un solvente non polare quale esano od etere di petrolio riscaldati a circa 40°C si aggiungono, sotto agitazione, 500 ml della soluzione concentrata; l'aggiunta viene completata in circa 1 ora.

Al termine dell'aggiunta si sospende il riscaldamento e si raffredda lentamente sino a $+5^\circ\text{C}$.

Dopo circa 2 ore a tale temperatura si completa la precipitazione di P 15149 che era già iniziata intorno ai 18°C .

Il precipitato bianco e fioccoso viene filtrato, lavato con solvente ed essiccato ottenendo 4,2 g di P 15149 il cui controllo HPLC mostra una purezza dell'85%.

Per ottenere un campione analiticamente puro bisogna ulteriormente purificare il solido mediante cromatografia di ripartizione in colonna su gel di silice seguendo il procedimento indicato da N.L. Oleinick in J. Biol. Chem., Vol. 244, N° 3, pag. 727 (1969).

Le frazioni 25-80 contenenti solamente 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B (P 15149) sono riunite, e evaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C , cristallizzate da acetone-n esano per dare g 1.835 di P 15149 con le seguenti caratteristiche: p.f.: $128-131^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -68.2^\circ$ (C = 1 in metanolo); UV (metanolo) 290 nm (ϵ 59.8); IR (KBr) 3490, 1720, 1700 (spalla), 1460, 1380, 1335, 1275, 1250 (spalla), 1180, 1160, 1140, 1105, 1075, 1050, 1000, 945, 920, 890, 830 cm^{-1} (figura 1).

L'analisi per $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{12}$ ha dato i seguenti valori:

calcolato (percento)	C 61.43	H 9.30	N 1.99
trovato (percento)	C 61.34	H 9.38	N 2.05

Le fasi acquose contenenti P 15148, P 15150, P 15153 e P 15149 (non completamente estratto) vengono basificate con NaOH diluito, estratte più volte con pari volume di CH_2Cl_2 . Prima di ogni estrazione il pH della fase acquosa viene riportato a 9.

Mediante controllo TLC e HPLC è possibile evidenziare gli estratti contenenti solamente l'antibiotico P 15150 (più solubile degli altri in fase acquosa) e gli estratti contenenti ancora P 15148, P 15149, P 15150 e P 15153 insieme.

La fasi organiche contenenti solamente P 15150 vengono riunite ed avaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C per dare g 3,4 di P 15150 con le seguenti caratteristiche chimico-fisiche: $[\alpha]_D^{20} -55^\circ$ (C = 1 in metanolo); UV (metanolo) 288 nm (ϵ 42); IR (KBr) 3460, 1715, 1700 (spalla), 1455, 1375, 1330, 1270,

1255, 1240, 1170, 1105, 1070, 1045, 1000, 990, 980, 940, 915, 885, 825 cm^{-1} (figura 2). Il corrispondente cloridrato ha p.f. $160-163^\circ\text{C}$ (acetone).

L'analisi per $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{13} \cdot \text{HCl}$ ha dato i seguenti valori:

calcolato (percento)	C 57.17	H 8.80	N 1.85	Cl 4.69
trovato (percento)	C 59.62	H 8.77	N 1.91	Cl 4.59

Le altre fasi organiche contenenti ancora P 15150 e i rimanenti antibiotici vengono evaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C e il residuo ottenuto viene purificato su colonna di ripartizione in gel di silice seguendo il procedimento di N.L. Oleinick suddetto.

Eluendo con il solvente incitato nel procedimento si raccolgono frazioni contenenti solamente P 15149 (Fr 52-110), P 15148 (Fr 130-185), P 15153 (Fr 260-450). Quando dal controllo TLC e HPLC risulta che le frazioni eluite non contengono più P 15153 si cambia il solvente di eluizione. Eluendo con alcool isopropilico-acetone (1:1.5) si raccolgono frazioni contenenti solamente l'antibiotico P 15150.

Le frazioni 52-110 riunite ed evaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C hanno dato g 0,425 di 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminileritronolide B (P 15149) dopo cristallizzazione da acetone-n. esano con caratteristiche chimico-fisiche eguali a quelle riportate per P 15149 isolato precedentemente.

Le frazioni 130-185 riunite ed evaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C hanno dato g 3,2 di 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8-idrossieritronolide B (P 15148) dopo cristallizzazione da acetone caratterizzati da: p.f. $204-6^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -48.35^\circ$ (C = 1 in metanolo); UV (metanolo) 280 nm (ϵ 39.2); IR (KBr) 3590, 3520, 3440 (larga), 3280 (larga), 1725, 1455, 1380, 1365, 1305, 1280, 1270, 1260, 1175, 1155, 1095, 1060, 1050, 1020, 1005, 970, 935, 915, 885, 875, 820 cm^{-1} (figura 3).

L'analisi per $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{13}$ ha dato i seguenti valori:

calcolato (percento)	C 60.05	H 9.10	N 1.94
trovato (percento)	C 60.12	H 8.93	N 1.92

Le frazioni 260-450 riunite ed evaporate a secchezza sotto vuoto a 50°C hanno dato g 10,3 di 3-O-oleandrosil-5-O-desosaminil-(8S)-8,19-epossieritronolide B (P 15153) dopo cristallizzazione da acetone-n. esano con le seguenti caratteristiche chimico-fisiche: p.f. $125-130^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -27.7^\circ$ (C = 1 in metanolo); UV (metanolo) 294 nm (ϵ = 32,7); IR (KBr) 3485, 1720, 1460, 1380, 1330, 1305, 1270, 1170, 1140, 1110, 1075, 1050, 1000, 930, 920, 890, 830, cm^{-1} (figura 4).

L'analisi per $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{13}$ ha dato i seguenti valori:

calcolato (percento)	C 60.23	H 8.85	N 1.95
trovato (percento)	C 60.12	H 8.75	N 1.79

Per evaporazione sottovuoto a 50°C delle frazioni raccolte con alcool isopropilico-acetone (1:1.5) e successiva cristallizzazione da acetone-n. esano si ottengono g 15,4 di P 15150 con le stesse caratteristiche viste precedentemente.

Esempio 4

Preparazione dell'antibiotico P 15151

Ad una coltura fermentativa in beuta di *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 preparata secondo quanto descritto nell'esempio 2, si aggiungono, dopo 30 ore di incubazione, 15 mg di eritronolide A preparato a partire da eritromicina A seguendo la tecnica descritta in J. Med. Chem. (1974), 17, 953.

Dopo ulteriori 60 ore di incubazione si analizza la brodocultura come descritto nell'esempio 2 e si rivela una attività antibiotica di circa 70 mcg/ml (espressi come attività di eritromicina A).

In TLC si rileva una nuova sostanza attiva, P 15151, con Rf 0.8 rispetto all'eritromicina A e 0.88 rispetto alla oleandomicina.

Tale composto è altresì diverso dagli antibiotici P 15148, P 15149, P 15150 e P 15153.

*Esempio 5**Preparazione dell'antibiotico P 15152*

Ad una beuta di *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771, preparata secondo la procedura descritta nell'esempio 4, si aggiungono, a 30 ore di incubazione, 15 mg di eritronolide A ossima preparata chimicamente secondo quanto descritto in J. Med. Chem. (1974), 17, 953.

Dopo ulteriori 60 ore di incubazione si analizza la brodocoltura come descritto nell'esempio 2 e si rivela un'attività antibiotica totale di circa 50 mcg/ml (espressi come attività di eritromicina A).

In TLC si rilevano due sostanze attive delle quali una è la stessa descritta in J. Antib. (1976), 29, 728 (Rf 0.73 rispetto all'oleandomicina), mentre la seconda è nuova e viene denominata P 15152 e mostra un Rf di 0.47 (rispetto all'oleandomicina) e di 0.44 (rispetto all'eritromicina A).

È opportuno precisare che, nell'ambito della presente invenzione, si intendono completare anche le altre possibili applicazioni dello *Streptomyces antibioticus* ATCC 31771 nel senso di introdurre nella molecola di precursori, nuovi o già noti, di antibiotici macrolidici, l'oleandrosio inteso quale agente che conferisce stabilità ad ambiente acido e quindi ne favorisce la somministrazione per via orale.

