

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWAURZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63 498

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 31.I.1967 (P 118 775)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 20.XI.1971

Kl. 12 q, 24

MKP C 07 d, 7/02

UKD

Właściciel patentu: Rhône — Poulenc S.A., Paryż (Francja)

Sposób otrzymywania nowej pochodnej trójacetylowej
spiramycyny I

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowej pochodnej trójacetylowej spiramycyny I.

Spiramycyna jest antybiotykiem przeciwbakteryjnym złożonym z trzech składników spiramycyny I, spiramycyny II i spiramycyny III, których wzory strukturalne ustalili R. Paul i S. Tchelitcheff, Bull. Soc. Chim. (3/650/1965)

Spośród tych spiramycyn szczególne zainteresowanie przedstawia spiramycyna I ze względu na możliwość bezpośredniego otrzymywania metodą fermentacyjną w skali przemysłowej.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się nową pochodną trójacetylową spiramycyny I, której wzór strukturalnie nie został jeszcze ustalony.

Pochodną czteroacetylową spiramycyny I otrzymuje się przez działanie bezwodnika kwasu octowego na spiramycynę I w temperaturze 50—150°C, korzystnie w temperaturze 100°C, ewentualnie w obecności trzeciorzędowej zasady organicznej, takiej jak pirydyna. W zależności od temperatury reakcja trwa 5—70 godzin. Reakcja ta wywołuje jednocześnie estryfikację spiramycyny I i modyfikację jej budowy, której nie można było ustalić dokładnie.

Sposobem według wynalazku nową pochodną trójacetylową spiramycyny I otrzymuje się przez metanolizę pochodnej czteroacetylowej. Reakcję prowadzi się działając mieszaniną wody i metanolu, korzystnie w temperaturze wrzenia, pod

2

chłodnicą zwrotną, można również stosować ogrzewanie poniżej temperatury wrzenia mieszaniny reakcyjnej, ale wówczas należy przedłużyć czas trwania reakcji. Podczas metanolizy następuje odłączenie się jednej z czterech grup acetylowych związanych ze spiramycyną I.

Nową pochodną trójacetylową spiramycyny I można stosować bezpośrednio albo po oczyszczeniu. Oczyszczanie prowadzi się metodami klasycznymi, zwłaszcza przez bezpośrednią krystalizację w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, takim jak eter izopropylowy, ekstrakcję przeciwpłdową, chromatografię, ekstrakcję mieszaniną wody z organicznym rozpuszczalnikiem przy odpowiedniej wartości pH.

Nowa pochodna trójacetylowa spiramycyny I jest bardziej trwała w środowisku kwaśnym niż spiramycyna I albo mieszanina spiramycyn. Pochodna ta zachowuje całkowitą aktywność przeciwbakteryjną po działaniu w ciągu 5 godzin 10 n kwasem solnym, natomiast spiramycyna I albo mieszanina spiramycyn w tych samych warunkach traci 90% aktywności.

Nowa pochodna spiramycyny I otrzymana sposobem według wynalazku wykazuje, tak jak spiramycyna I, aktywność przeciwbakteryjną. Badania prowadzone na myszach wykazały, że nowa pochodna jest szczególnie korzystna, ponieważ stosowana doustnie wykazuje aktywność przeciwbakteryjną na zakażenie paciorkowcami i pneumoko-

kami 2—3-krotnie wyższą niż spiramycyna I lub mieszanina spiramycyn. Ze względu na lepszą trwałość w środowisku kwaśnym i na większą aktywność przeciwbakteryjną *in vivo*, nowy produkt przedstawia pewien postęp w stosunku do spiramycyn.

Trójacetylospiramycyna otrzymana sposobem według wynalazku ma wzór sumaryczny $C_{51}H_{82}O_{18}N_2$ i następujące cechy fizykochemiczne: wygląd: proszek o barwie kremowej; temperatura topnienia: 156—157°C; $[\alpha]_D^{20} = 97^\circ$ ($c=1$, etanol); analiza elementarna: C 60—60,5%, H 8,2—8,4%, O, 28,3%, N 2,6—2,65%, CH CO 12,5—12,9% widmo w nadfiolecie (oznaczenie z roztworu w etanolu) maksimum absorpcji przy 230 m μ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 280$), widmo w podczerwieni (oznaczenie w tablecie mieszaniny z KBr). Widmo w podczerwieni przedstawiono na rysunku, na którym odcięta oznacza długość fal w mikronach (skala dolna) oraz liczby falowe w cm^{-1} (skala górna), a rzędna gęstość optyczną.

W tablicy podano główne pasma absorpcyjne nowego związku.

Tablica

Rozmieszczenie pasm	Częstotliwość w liczbach falowych cm^{-1}	
3420 tF	1370 F	1040 tF
2960 ép	1335 ép	1020 ép
2920 F	1292 m	985 m
2850 F	1270 f	965 m
2820 ép	1230 tF	945 ép
2770 m	1170 ép	930 ép
1730 tF	1150 F	900 m
1625 F	1115 F	850 m
1590 ép	1080 m	835 m
1450 F	1060 ép	800 f

tF = Pasma bardzo ostre

F = Pasma ostre

m = Pasma rozciągnięte

f = Pasma bardzo rozciągnięte

ép = intensywność zmienna

Spiramycynę I, czteroacetylospiramycynę i krystaliczną trójacetylospiramycynę I rozdzielono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na tlenku glinu.

Zastosowano warstwę tlenku glinowego o grubości 0,3 mm osadzoną na szklanej płytce. Po wysuszeniu płytki z nośnikiem w ciągu 12 godzin w temperaturze otoczenia nośnik aktywowano przez ogrzewanie w temperaturze 100°C w ciągu 1 godziny, a następnie naniesiono na linii startowej nośnika po 10 μl roztworu benzenowego badanego produktu o stężeniu 0,1 mg/ml, czyli w ilości 0,1 μg badanego związku. Chromatogram rozwinięto za pomocą mieszaniny benzenu i octanu etylu (60:40 obj.), przy czym czoło fazy ruchomej osiągnęło linię 15—17 cm od linii startowej. Następnie chromatogramy suszono w ciągu 15 minut w ciepłym prądzie powietrza, po czym wywołano drogą biologiczną na płytce agaru z kulturą *Bacillus subtilis*. Otrzymano następujące wartości R_f : 0 dla spiramycyny I, 0,6 dla czteroacety-

lospiramycyny I i 0,5 dla krystalicznej trójacetylospiramycyny I.

Sposób według wynalazku wyjaśnia następujący przykład nie ograniczający jego zakresu, przy czym aktywność określono przez oznaczenie biologiczne metodą dyfuzyjną stosując *Bacillus subtilis* jako wrażliwy drobnoustroj i w stosunku do próbki spiramycyny czystej jako wzorca. Aktywność ta jest wyrażona w jednostkach na mg, przy czym jednostka jest najmniejszą ilością produktu rozpuszczonego w 1 ml odpowiedniego podłoża hamującego wzrost *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P w warunkach określonych.

Przykład. Roztwór 1000 g spiramycyny I w 5400 g mieszaniny acetylującej, otrzymanej przez zmieszanie 4752 g pirydyny i 648 g bezwodnika octowego, ogrzewano w temperaturze 100°C w ciągu 24 godzin, po czym wiano do 10 kg wody z lodem i doprowadzono mieszaninę do wartości pH = 7,5 przez dodanie 800 ml roztworu 10 n sodu i poddano dwukrotnej ekstrakcji chloroformem użytym w ilości 2 l i 1 l. Połączone ekstrakty przemyto 4 razy po 4 l wody, odsączono i odparowano. Otrzymaną pozostałość, po wysuszeniu pod ciśnieniem 1 mm Hg rozpuszczono w 30 l cykloheksanu. Otrzymany roztwór odsączono w temperaturze 28°C, a następnie przesącz odparowano. Stałą pozostałość wysuszono pod ciśnieniem 1 mm Hg, otrzymując 1150 g czteroacetylospiramycyny I, o mianie 1185 jednostek na mg; temperatura topnienia 148—152°C $[\alpha]_D^{22} = 106^\circ$ ($c=2$, etanol); $\text{CH}_3\text{CO} = 17,0\%$.

Roztwór 1000 g czteroacetylospiramycyny I w 9 l mieszaniny składającej się z 7,2 l metanolu i 1,8 l wody ogrzewano w ciągu 24 godzin pod chłodnicą zwrotną, a następnie ochłodzono, dodano 10 l wody i poddano ekstrakcji 4 l chlorku metylenu. Po zdekantowaniu, roztwór chlorku metylenu odparowano i pozostałość wysuszono pod ciśnieniem 1 mm Hg w temperaturze 60°C do stałej wagi, otrzymując 705 g trójacetylospiramycyny I o mianie 1670 jednostek na mg; temperatura topnienia 148—150°C, $[\alpha]_D^{22} = 86^\circ$ ($c=2$, etanol); $\text{CH}_3\text{CO} = 12,6\%$. Otrzymaną surową trójacetylospiramycynę I oczyszczono dwoma sposobami, przez zwykłą krystalizację z roztworu oraz przez krystalizację frakcyjną w przeciwwądmie.

Oczyszczanie trójacetylospiramycyny I przez krystalizację, 27,5 g surowej trójacetylospiramycyny I rozpuszczono na gorąco, pod chłodnicą zwrotną w 50 ml eteru izopropylowego, po czym poddano krystalizacji oziębiając lodem i mieszając w ciągu 24 godzin. Wytrącony produkt krystaliczny odsączono, przemyto 3 razy po 10 ml eteru izopropylowego i suszono w temperaturze 40°C pod ciśnieniem 2 mm Hg w ciągu 12 godzin. Otrzymano 13,5 g trójacetylospiramycyny I w postaci krystalicznej, o temperaturze topnienia 150—152°C.

Oczyszczanie trójacetylospiramycyny I przez krystalizację frakcyjną w przeciwwądmie, 44,5 g surowej trójacetylospiramycyny I oczyszczano w aparacie Craiga z odbieralnikami o pojemności 50 ml, przez rozdział substancji w przeciwwądmie pomiędzy fazy ciekłe mieszaniny o składzie w proporcjach objętościowych: benzenu 45 części, cy-

kloheksanu 55 części, metanolu 80 części i wody 80 części. Dokonano podziału na 300 frakcji, otrzymując trójacetylospiramycynę I w odbieralnikach o kolejnej numeracji frakcji 140—210 ($l=1,38$).

Zawartość odbieralników frakcji 164—196 połączono i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25°C do objętości 200 ml, otrzymując stężony roztwór wodny, który zalkalizowano do wartości $pH=8,5$ i poddano ekstrakcji dwukrotnie benzenem w ilości po 1 objętości w stosunku do ekstrahowanej cieczy. Połączone ekstrakty przemyto wodą w ilości 20% objętości ekstraktu benzenowego, wysuszono bezwodnym siarczanem sodu i odparowano do suchości w temperaturze 30°C pod ciśnieniem 3 mm Hg. Otrzymano 15,6 g trójacetylospiramycyny I o mianie 2300 jednostek na mg; $[\alpha]_D^{22} = -89,2^\circ$ ($c=1$, etanol).

6,4 g otrzymanego produktu rozpuszczono na gorąco w 140 ml eteru izopropylowego, przesączono i przesącz zateżono do objętości 50 ml, pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oziębieniu lodem, mieszając w ciągu 2 godzin, otrzymano z roztworu bezbarwne kryształy w postaci igieł, które od-

sączono, przemyto 5 ml tlenku izopropylu i wysuszono w temperaturze 40°C pod ciśnieniem 3 mm Hg w ciągu 12 godzin. Otrzymano 5,25 g trójacetylospiramycyny I w postaci krystalicznej o mianie 2300 jednostek na mg i temperaturze topnienia 150—152°C.

3,75 g otrzymanego krystalicznego produktu rozpuszczono na gorąco w 150 ml eteru izopropylowego, przesączono i przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 45 ml. Po krystalizacji w sposób wyżej opisany otrzymano 2,5 g trójacetylospiramycyny I dwukrotnie krystalizowaną o mianie 2300 jednostek na mg, temperaturze topnienia 156—157°C i $[\alpha]_D^{20} = -97^\circ$ ($c=1$, etanol).

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania nowej pochodnej trójacetylowej spiramycyny I, **znamienny tym**, że pochodną czteroacetylową spiramycyny I otrzymaną w znany sposób na drodze estyfikacji spiramycyny I za pomocą bezwodnika kwasu octowego w temperaturze 50—150°C traktuje się mieszaniną metanolu i wody.

