(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **156071 B**

(21) Patentansøgning nr.: **4469/85**

(51) Int.Cl.[4] **C 07 H 17/08**

(22) Indleveringsdag: **02 okt 1985**

(24) Løbedag: **13 sep 1979**

(41) Alm. tilgængelig: **02 okt 1985**

(44) Fremlagt: **19 jun 1989**

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: **3829/79**

(30) Prioritet: **14 sep 1978 JP 113023/78** **27 feb 1979 JP 22340/79**

(71) Ansøger: ***TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA; 632-1, Mifuku; Ohito-cho; Tagata-gun; Shizuoka-ken, JP**

(72) Opfinder: **Tatsuro *Fujiwara; JP, Tetsuo *Matsuda; JP, Osamu *Okegawa; JP**

(74) Fuldmægtig: **Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.**

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af 3,3'',4''-triacyltylosinderivater

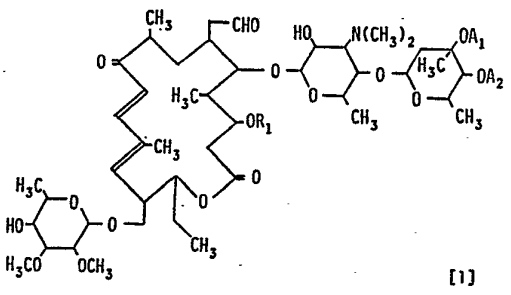
(56) Fremdragne publikationer

———

(57) Sammendrag:

4469-85

3, 3'', 4''-triacyl-tylosinderivater med formlen I



[I]

hvor R_1 betegner en lavmolekylær alkanoylgruppe, A_1 og A_2 er grupper, hvor den ene er R_2 og den anden er R_3, og R_2 og R_3 er alkanoylgrupper med 2-6 carbonatomer, eller salte deraf, fremstilles ved en række omsætninger.

Forbindelserne er macrolidantibiotika med god virkning og uden den bitre smag, som findes hos beslægtede forbindelser.

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte 3, 3", 4" triacyltylosinderivater med den i kravets indledning angivne almene formel 1 eller salte deraf med antibiotisk virkning.

Ved salte skal forstås fysiologisk acceptable salte. Foretrukne eksempler på salte er uorganiske salte såsom hydrochlorid, sulfat eller phosphat eller organiske salte såsom acetat, propionat, tartrat, citrat, succinat, malat, asparaginat eller glutiminat. Andre ikke-toksiske salte kan medtages.

De hidtil ukendte forbindelser (1) har de ækvivalente niveauer for antibakteriel aktivitet for det hidtil kendte antibiotiske tylosin og har også forøget antibakteriel virkning mod alle macrolidantibiotikumresistente stammer såsom macrolidresistent A-gruppestammer (kliniske isolater af erythromycin-, oleandomycin- og 16-led-macrolidantibiotikumresistente stammer), B-gruppestammer og C-gruppestammer. Navnlig har de hidtil ukendte forbindelser overlegen antibakteriel aktivitet mod resistente stammer i sammenligning med det kendte 4"-acyltylosin eller 3-acetyl- eller -propionyl-4"-acyltylosin, som er effektive mod de stammer, som er resistente over for macrolidantibiotika.Desuden nedsættes den stærke vedvarende bitre smag, som er en generel egenskab hos macrolidantibiotika, og således fremstilles der fortrinsvis sirup til børn, som man ikke kan give tabletter eller kapsler. De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede antibiotika (1) forventes at vise en udmærket klinisk infektionsterapeutisk virkning. Desuden er disse antibiotika egnede til veterinære formål og som foderadditiver.

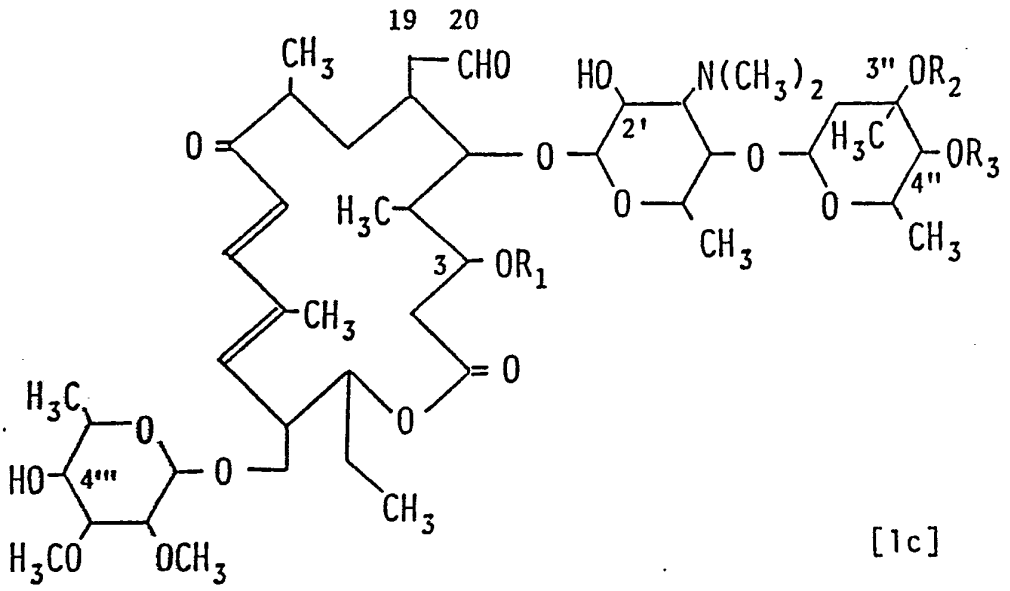
Tylosin har fem hydroxylgrupper i stillingerne 3,2', 3",4" og 4"'. Blandt disse acyleres hydroxylgrupperne i stillingerne 3,2',4" og 4"' let, medens hydroxylgruppen i 3"-stil-

lingen er mere inaktiv. Hvis hydroxylgruppen i 3"-stillingen acyleres, så acyleres de andre stillinger med højaktive hydroxylgrupper også, og derfor har en selektiv acylering af begge stillingerne 3" og 4" været umulig ved den kendte tekniks acyleringsmetoder.

Ved en acylering af hydroxylgruppen i 3"-stillingen acyleres andre hydroxylgrupper, nemlig i stillingerne 2' og 4"', med beskyttelsesgrupper, som selektivt fjernes efter acyleringen af hydroxylgruppen i 3"-stillingen. Disse beskyttelsesgrupper er lavmolekylære alkanoylgrupper for hydroxylgruppen i 2'-stillingen og lavmolekylære alkanoylgrupper eller halogenerede acetylgrupper for hydroxylgruppen i 4"-stillingen.

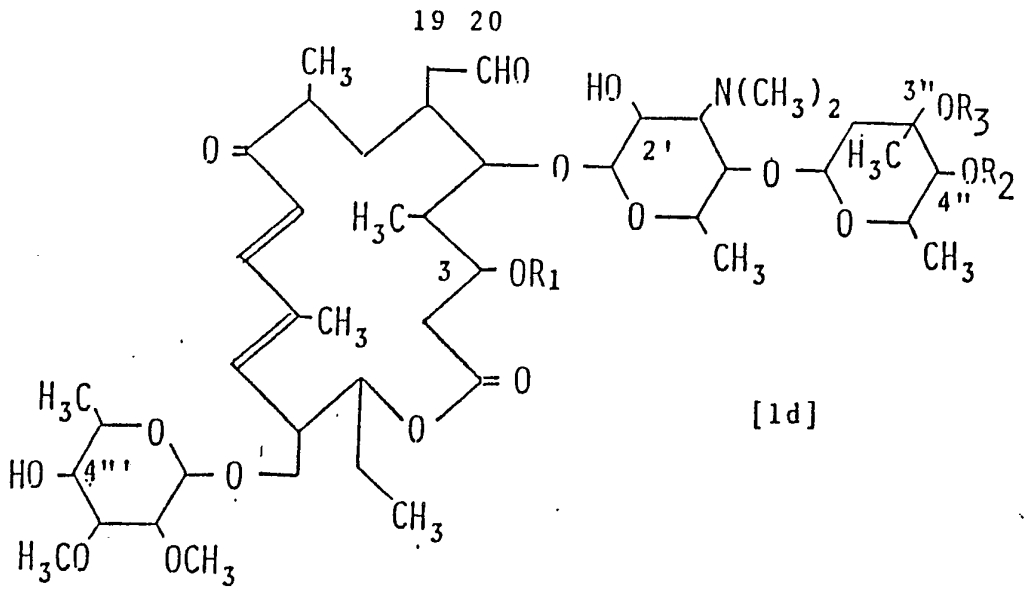
Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

Der dannes i det første tilfælde som slutprodukt en forbindelse med formlen(1c)



[1c]

hvor R_1, R_2 og R_3 har samme betydning som i kravet. I det andet tilfælde fås som slutprodukt en forbindelse med formlen (1d)



[1d]

hvor R_1, R_2 og R_3 har samme betydning som i kravet.

Udgangsmaterialet 5 er normalt et kendt 2'-acyltylosin. Acylgruppen fjernes i en efterfølgende reaktion og er en C_{2-6}-alkanoylgruppe, fortrinsvis acetyl, propionyl eller butyryl.

Hydroxylgruppen i 4"'-stillingen i ovennævnte 2'-acyltylosin kan valgfrit beskyttes med en C_{2-6}-alkanoylgruppe eller en lavmolekylær halogenalkanoylgruppe, især sidstnævnte såsom chloracetyl, dichloracetyl eller trichloracetyl, men den skal ikke nødvendigvis beskyttes før fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Ovennævnte 2'-acyltylosin underkastes 3,4"-acylering ved hjælp af tilsvarende aliphatiske carboxylsyrehalogenider. Acyleringen udføres ved omsætning med tilsvarende carboxylsyrehalogenider i et indifferent organisk opløs-

ningsmiddel i nærværelse af tertiær organisk amin. Eksempler på tertiære organiske aminer er pyridinforbindelser såsom pyridin, picolin eller collidin. Andre kendte tertiære organiske aminer såsom triethylamin, dimethylanilin, diethylanilin, N-methylpiperidin, N-methylmorpholin, quinolin eller isoquinolin kan benyttes. Eksempler på aliphatiske carboxylsyrehalogenider er aliphatiske C_{2-6}-carboxylsyrehalogenider såsom acetylchlorid, propionylchlorid,butyrylchlorid, isobutyrylchlorid, valerylchlorid, isovalerylchlorid eller hexanoylchlorid. Acylgrupper til 3-stillingen er lavmolekylære grupper såsom acetylchlorid eller propionylchlorid. Reaktionen kan foretages ved stuetemperatur, og det er derfor ikke nødvendigt at opvarme, eller man kan opvarme til højst 30-50°C. Reaktionsprocessen kan kontrolleres ved tyndtlagschromatografi på silicagel, og den er afsluttet i løbet af 1-10 timer.

Ved ovenstående acyleringsreaktion acyleres ikke blot hydroxylgrupperne i stillingerne 3 og 4", men også en fri hydroxylgruppe i 4"'-stillingen acyleres. Derfor kan mængden af aliphatisk carboxylsyrehalogenid bestemmes ved det antal hydroxylgrupper, som skal acyleres.

Hvis endvidere stillingerne 3 og 4" skal acyleres med forskellige acylgrupper, benyttes en lidt mindre mængde aliphatisk carboxylsyrehalogenid til opnåelse af først den 4"-acylerede forbindelse, og derefter acyleres denne forbindelse i 3-stillingen ved hjælp af det ønskede aliphatiske carboxylsyrehalogenid.

Den således opnåede forbindelse (6) kan isoleres på den måde, at når reaktionsopløsningsmidlet er et med vand blandbart organisk opløsningsmiddel, så indstilles reaktionsblandingen ved hjælp af alkali til en pH-værdi på 8-10 i vand til udfældning og filtrering, og når reaktionsopløsningsmidlet er et med vand ikke blandbart organisk opløsningsmiddel, så hældes reaktionsblandingen i vand og ind-

stilles til en pH-værdi på 8-10 og ekstraheres derpå med et passende med vand ikke blandbart organisk opløsningsmiddel. Yderligere rensning kan foretages ved chromatografi under anvendelse af silicagel, aktivt aluminiumoxid eller adsorptionsharpiks under eluering med f.eks. benzen og acetone.

Acylering af forbindelsen (6) i 3"-stillingen kan foretages ved omsætning med et tilsvarende aliphatisk carboxylsyreanhydrid i nærværelse af base under opvarmning. Eksempler på base er alkalimetalcarbonat såsom kaliumcarbonat eller natriumcarbonat og tertiære organiske aminer som f.eks. pyridinforbindelser såsom pyridin, picolin eller collidin, men dette udgør ikke nogen begrænsning, og alle kendte alkalimetalcarbonater, alkalimetalhydrogencarbonater eller tertiære organiske aminer kan benyttes. Opvarmningstemperaturen er f.eks. 50-120°C, fortrinsvis 80-100°C. Reaktionstiden varierer afhængende af reaktionstemperaturen, og da reaktionen kan kontrolleres ved tyndtlagschromatografi på silicagel, kan slutpunktet for reaktionen bestemmes ved forsvinden af forbindelse (6) i reaktionsblandingen, og tidsrummet er af størrelsesordenen 1-100 timer.

Ved ovennævnte reaktion omarrangeres den hidtidige acylgruppe R^2 i 4"-stillingen til 3"-stillingen, og acylgruppen R^3 indføres i 4"-stillingen.

Den således opnåede forbindelse (7) kan isoleres på den måde, at når reaktionsopløsningsmidlet er et med vand blandbar organisk opløsningsmiddel, indstilles reaktionsblandingen ved hjælp af alkali til en pH-værdi på 8-10 i vand til udfældning og filtrering, og når reaktionsopløsningsmidlet er et med vand ikke-blandbart organisk opløsningsmiddel, hældes reaktionsblandingen i vand, og man indstiller pH-værdien på 8-10, og man ekstraherer med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel. Yderligere rensning kan foretages ved chromatografi under anvendelse af sili-

cagel, aktivt aluminiumoxid eller adsorptionsharpiks under eluering med f.eks. benzen og acetone.

Fjernelse af beskyttelsesgrupperne i forbindelsen (7) udføres ved behandling med methanol eller ethanol indeholdende ammoniak til fjernelse af beskyttelsesgruppen i 4"'-stillingen. Reaktionen forløber ved stuetemperatur og kan afsluttes ved forsvinden af forbindelsen (7) ved kontrol ved tyndtlagschromatografi på silicagel. Ammoniak og alkohol afdestilleres fra den således opnåede reaktionsblanding, og blandingen opvarmes i methanol, som kan indeholde vand, til fjernelse af acylgruppen i 2'-stillingen. Der foretages opvarmning under tilbagesvaling af methanol. Reaktionsprocessen kan kontrolleres ved tyndtlagschromatografi på silicagel til afslutning af reaktionen.

Forbindelsen (1c) kan fås ved isolation og rensning af reaktionsblandingen efter afdestillation af methanol.

Forbindelsen (6) kan også acyleres i 3"-stillingen ved hjælp af et tilsvarende aliphatisk carboxylsyrehalogenid. Acyleringen udføres ved omsætning med tilsvarende aliphatisk carboxylsyrehalogenid i nærværelse af tertiær organisk amin i et indifferent organisk opløsningsmiddel under opvarmning. Eksempler på indifferente organiske opløsningsmidler er acetone, methylethylketon, ethylacetat, dimethoxyethan, tetrahydrofuran, dioxan, dichlorethan, benzen eller toluen. Eksempler på tertiære organiske aminer er pyridinforbindelser såsom pyridin, picolin eller collidin, men de øvrige kendte tertiære organiske aminer såsom triethylamin, dimethylanilin, diethylanilin, N-methylpiperidin, N-methylmorpholin, quinolin, isoquinolin eller tribenzylamin kan benyttes selektivt. Tilsvarende carboxylsyrehalogenider er aliphatiske C_{2-6}-carboxylsyrehalogenider såsom acetylchlorid, propionylchlorid, butyrylchlorid, isobutyrylchlorid, valerylchlorid, isovalerylchlorid eller hexanoylchlorid.

Opvarmningstemperaturen kan være 50-120°C. Reaktionstiden kan variere afhængende af reaktionstemperaturen, og da processens fremadskriden kan kontrolleres ved tyndtlagschromatografi på silicagel, kan afslutningen bestemmes inden for området 1-150 timer.

Den opnåede forbindelse (8) kan isoleres på samme måde som forbindelse (7).

Derefter fjernes beskyttelsesgrupperne i stillingerne 2' og 4"' i forbindelsen (8) til opnåelse af forbindelsen (1d). Denne fjernelse kan udføres ved den samme fjernelsesreaktion for beskyttelsesgrupperne som ved forbindelse (7) ovenfor. Forbindelsen (1d) kan fås ved isolation og rensning som beskrevet nedenfor fra produktet efter fjernelse af methanol.

Isolation af den ønskede forbindelse (1) kan udføres ved kendt isolation og rensning af macrolidantibiotika, f.eks. inddampning, ekstraktion, vaskning, overføring og krystallisation samt chromatografi under anvendelse af silicagel, aktivt aluminiumoxid eller adsorbent såsom adsorbent harpiks.

I tabel I er anført de minimale inhiberende koncentrationer (MIC) på mikroorganismer for en af forbindelserne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Det fremgår, at forbindelsen (1) er effektiv mod macrolidresistente A-gruppemikroorganismer.

Nedenstående eksempler illustrerer fremstillingen af forbindelserne (1) ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Rf-værdierne i eksemplerne er målt ved følgende tyndtlagschromatografi:

Bærer: Silicagel 60 (Merck Co.)

Fremkalder:

A: n-hexan: acetone: benzen: ethylacetat: methanol, 30:10:25:20:10

B: benzen: acetone, 3:1

C: benzen: acetone, 4:1

MIC µg/ml	Forbindelse efter fremgangsmåden ifl.opfindelsen			Kontrol
Forbindelse	4"-stilling	Bu	H	Bu
Forsøgsorganisme	3"-stilling	Ac	H	H
Staph.aureus ATCC6538P		0,8	0,8	0,8
Staph. aureus MS353		1,6	1,6	3,1
Staph. aureus MS353AO*		50	>100	50
Staph. aureus 0116*		25	>100	25
Staph. aureus 0119*		100	>100	50
Staph. aureus 0127*		100	>100	100
Strept. pyogenes N.Y.5		0,2	0,2	0,2
Strept. pyogenes 1022*		25	>100	12,5

Ac: acetyl, Bu: butyryl.

* Erythromycin-, oleandomycin- og 16-led-macrolidresistente stammer af kliniske isolater (macrolidresistente A-gruppe-stammer).

Eksempel 1

3,3''-diacetyl-4''-butyryltylosin

Eddikesyreanhydrid (8,5 ml) sættes til tylosin (10 g) opløst i tør acetone (50 ml) og omrøres i 4 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen hældes i vand (200 ml), indstilles til pH 9,5 ved tilsætning af ammoniakvand og ekstraheres 2 gange med chloroform (200 ml). Ekstrakten tørres ved tilsætning af vandfrit magnesiumsulfat og tørres i vakuum til opnåelse af 2'-acetyltylosin (10,2 g). Tyndtlagschromatografi: Rf_B = 0,12, Rf_C = 0,06 (tylosin: Rf_A = 0,20, Rf_B = 0,01, Rf_C = 0,01).

Tørt pyridin (8,05 ml) og acetylchlorid (6,4 ml) sættes til ovennævnte stof (10 g) opløst i tør acetone (50 ml) og omrøres i 150 min. ved 45°C. Reaktionsblandingen hældes i vand (200 ml), indstilles til pH 9,5 ved tilsætning af ammoniakvand, og udfældningen filtreres til opnåelse af 3,2', 4'', 4'''-tetraacetyltylosin (8,44 g). Tyndtlagschromatografi: Rf_B = 0,40, Rf_C = 0,22.

Smørsyreanhydrid (1 ml) sættes til ovennævnte stof (2,0 g) opløst i tørt pyridin (10 ml) og omrøres i 4 dage ved 100°C. Reaktionsblandingen hældes i vand (50 ml), indstilles til pH 9,5 ved tilsætning af ammoniakvand og ekstraheres med chloroform (50 ml). Ekstrakten vaskes 2 gange med 0,1 N HCl (50 ml) og 1 gang med fortyndet ammoniakvand, tørres med vandfrit magnesiumsulfat og tørres i vakuum til opnåelse af råt 3,2', 3'', 4'''-tetraacetyl-4''-butyryl-tylosin. Tyndtlagschromatografi: Rf_B = 0,81, Rf_C = 0,66.

Methanol mættet med ammoniak (10 ml) sættes til dette råprodukt opløst i methanol og omrøres 3 timer under isafkøling. Reaktionsblandingen hældes i vand (100 ml) og ekstraheres med chloroform (100 ml). Ekstrakten tørres ved tilsætning af vandfrit magnesiumsulfat og tørres i vakuum.

Resten opløses i methanol (50 ml), tilbagesvales i 17 timer og tørres i vakuum til opnåelse af råt 3,3''-diacetyl-4''-butyryltylosin, som renses ved silicagelsøjlechromatografi under eluering med benzen og acetone (10:1), hvorved man får den rensede forbindelse (1,2 g). Tyndtlagschromatografi: RF_A = 0,73.

Eksempel 2
3,3''-diacetyl-4''-isovaleryltylosin

I eksempel 1 erstattes smørsyreanhydrid med isovalerianesyreanhydrid, hvorved man får 3,3''-diacetyl-4''-isovaleryltylosin. Tyndtlagschromatografi: Rf_A = 0,76.

Eksempel 3
3,3'', 4''-triacetyltylosin

Eddikesyreanhydrid (0,5 ml) sættes til 3,2', 4'', 4'''-tetraacetyltylosin fra eksempel 1 opløst i tørt pyridin (5 ml) og omrøres 2 dage ved 100°C. Reaktionsblandingen hældes i vand (30 ml), indstilles til en pH-værdi på 9,5 ved tilsætning af ammoniakvand og ekstraheres med chloroform (30 ml). Ekstrakten tørres ved hjælp af vandfrit magnesiumsulfat og tørres til sidst i vakuum. Resten opløses i methanol (10 ml) og tilsættes methanol mættet med ammoniak (5 ml), hvorpå man omrører 3 timer under isafkøling. Reaktionsblandingen hældes i vand (100 ml) og ekstraheres med chloroform (100 ml). Ekstrakten tørres ved tilsætning af vandfrit magnesiumsulfat, hvorpå der foretages en tørring i vakuum. Resten opløses i methanol (30 ml), tilbagesvales i 17 timer og tørres i vakuum til opnåelse af råt 3,3'', 4''-triacetyltylosin.

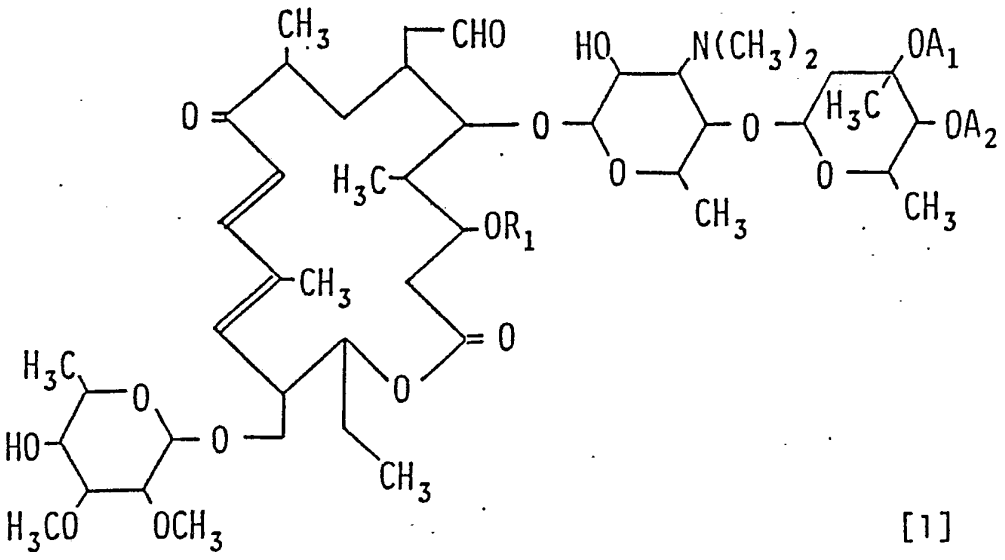
Denne forbindelse renses ved chromatografi på silicagelsøjle under eluering med en blanding af benzen og acetone i forholdet 7:1, hvorved man får den rene forbindelse (700 mg).

Tyndtlagschromatografi: Rf_A = 0,54

Masse: 982 (M 60), 922, 753, 563, 391, 372, 174, 169.

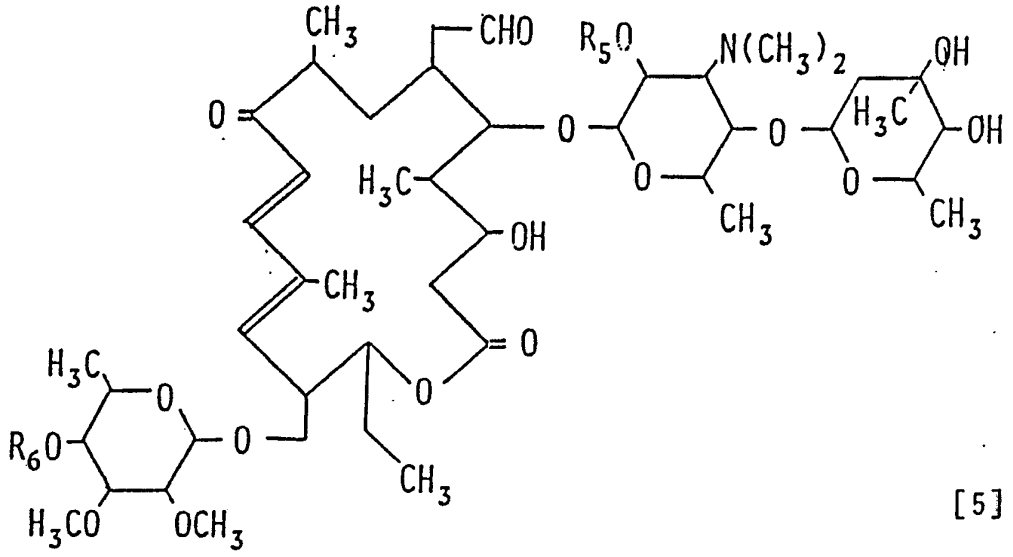
Patentkrav

Fremgangsmåde til fremstilling af 3, 3",4"-triacyltylosinderivater med formlen(1)



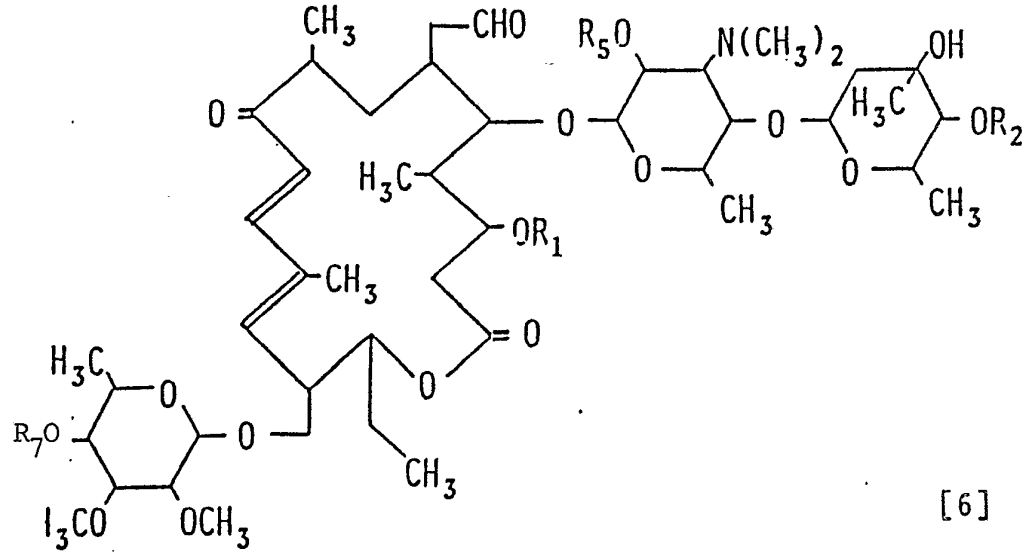
[1]

hvor R_1 betegner en lavmolekylær alkanoylgruppe, A_1 og A_2 er grupper, hvor den ene er R_2 og den anden er R_3, og R_2 og R_3 er alkanoylgrupper med 2-6 carbonatomer, eller salte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter et 2'-acyltylosin med formlen(5)



[5]

hvor R_5 betegner alkanoyl med 2-6 carbonatomer, og R_6 betegner hydrogen, alkanoyl med 2-6 carbonatomer eller lavmolekylært halogenalkanoyl, med tilsvarende aliphatiske carboxylsyrehalogenider i nærværelse af en tertiær organisk amin i et indifferent organisk opløsningsmiddel til opnåelse af en forbindelse med formlen(6)

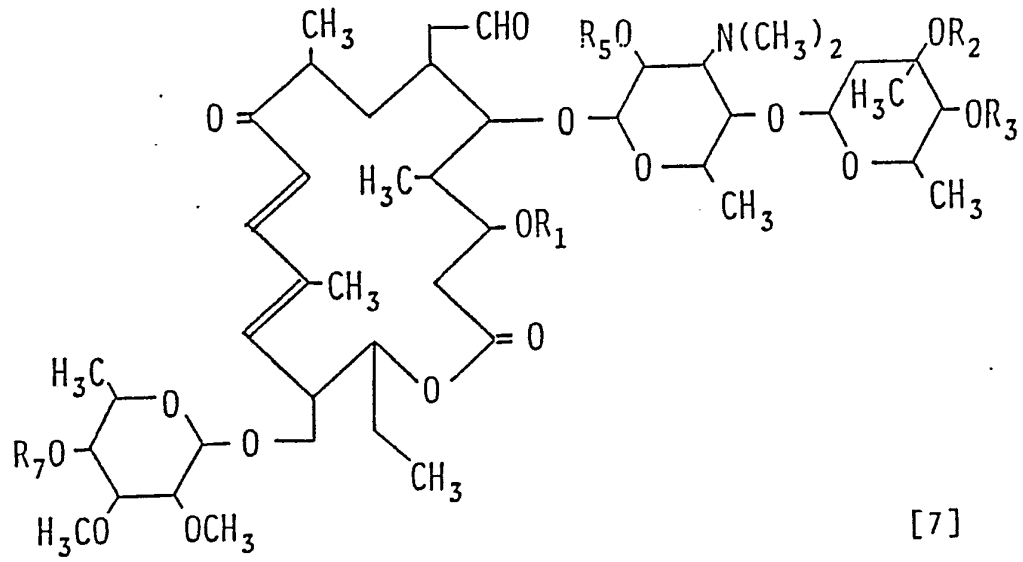


[6]

hvor R_7 betegner alkanoyl med 2-6 carbonatomer eller lavmolekylært halogenalkanoyl, og R_1, R_2 og R_5 har samme be-

tydning som ovenfor, hvorpå man 3"-acylerer ved en af følgende fremgangsmåder, hvor man

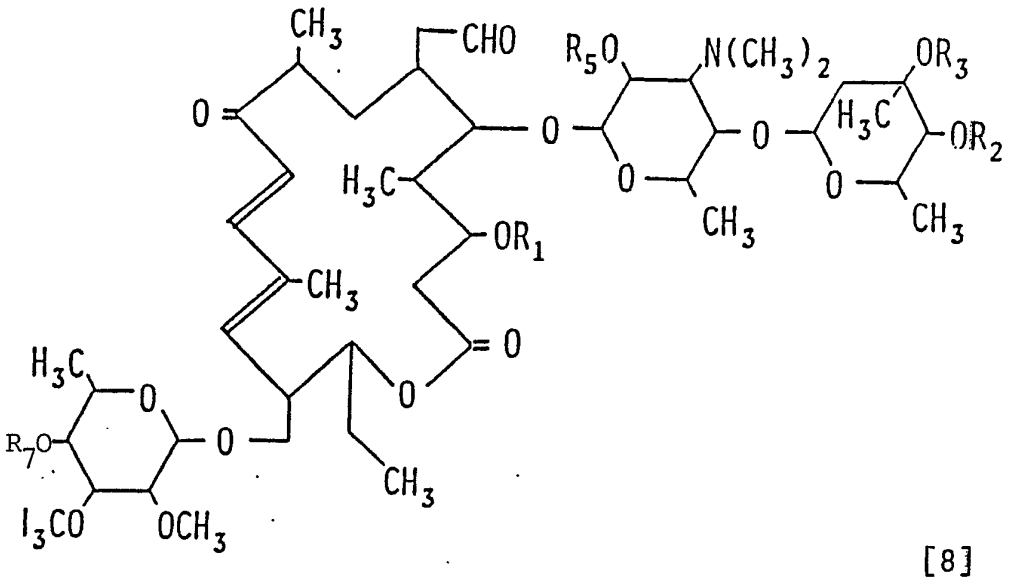
(a) enten omsætter forbindelsen med formlen(6)med et tilsvarende aliphatisk carboxylsyreanhydrid under opvarmning i nærværelse af base til opnåelse af en forbindelse med formlen(7)



[7]

hvor R_1, R_2, R_3, R_5 og R_7 har samme betydning som ovenfor, eller

(b) man omsætter forbindelsen med formlen (6) med et tilsvarende aliphatisk carboxylsyrehalogenid under opvarmning i nærværelse af en tertiær amin i et indifferent organisk opløsningsmiddel til opnåelse af en forbindelse med formlen(8)



[8]

hvor R_1, R_2, R_3, R_5 og R_7 har samme betydning som ovenfor, hvorefter man behandler forbindelsen med formlen (7) eller forbindelsen med formlen(**8**)med en methanol- eller ethanol-opløsning af ammoniak, hvorpå man behandler i methanol under opvarmning.