

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201099 B

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 9/00
A 61 K 37/02

(22) Bejelentés napja: 1986.12.29. (21) 5503/86

(30) Bejelentés elsőbbsége:
(8531846) 1985.12.30. GB

(40) Közzététel napja: 1987.09.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.09.28.

(72) Feltalálók:

SELVA Enrico, Groppello Cairoli (PV),
FERRARI Pietro, Fr. Cassano Centenaro-Ferriere,
GOLDSTEIN Beth P., Milánó,
CASSANI Giovanni, Pavia,
PARENTI Francesco, Lainate,
(IT)

(73) Szabadalmas:

Gruppo Lepetit S.p.A.,
Milánó, (IT)

**(54) ELJÁRÁS A 40926 ANTIBIOTIKUM MANNOZIL-
-AGLIKON ÉS EZT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉ-
SZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás egy új antibiotikum, az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon előállítására oly módon, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet vagy ennek A, B, PA, PB vagy Bo faktorát egy ásványi sav vagy egy erős szerves sav tömény vizes oldatának alkalmazásával hidrolizálják.

HU 201099 B

A leírás terjedelme: 10 oldal, 4 rajz, 4 ábra

A találmány tárgya eljárás egy új antibiotikum, az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon előállítására oly módon, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet vagy ennek A, B, PA, PB vagy Bo faktorát savas reakciókörülmények között hidrolizáljuk.

A találmány tárgya továbbá eljárás az új antibiotikumot tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A szóbanforgó A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon olyan fertőző betegségek kezelésére alkalmas, amelyek az antibiotikumra érzékeny mikroorganizmusokkal kapcsolatosak.

Az A 40926 antibiotikum komplex és faktori Gram-pozitív baktériumok és Neisseria-törzse ellen aktív antibiotikumok, amelyeket Actinomadura törzsek termelnek.

Egy, A 40926 antibiotikumot termelő, az Actinomadura genushoz tartozó törzset 1984. június 8-án helyeztünk letétbe az American Type Culture Collection-nál (ATCC, Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok), a Budapesti Szerződés rendelkezései szerint.

Az A 40926 egy komplex antibiotikum, melynek öt komponensét különítették el és PA, PB, A, és Bo faktorként azonosították ezeket.

Az A 40926 antibiotikumot és faktorait, valamint a termelő mikroorganizmusokat és az ezek előállítására irányuló eljárást a 177 882 számú európai - közzétett - szabadalmi bejelentésben írják le.

Az eljárás során az Actinomadura sp. ATCC 39 727 mikroorganizmus törzset vagy ennek egy A 40926 antibiotikumot termelő variánsát vagy mutánsát aerob körülmények között, vizes táptalajban tenyésztik, majd a fermentléből kinyerik az A 40926 antibiotikum komplexet, melyet kívánt esetben tisztítanak és/vagy valamely ismert módon a komplexből az egyes faktorokat azaz az A, B, PA, PB és Bo faktort elkülönítik.

Értelemszerűen az A 40926 antibiotikum komplex kifejezésen az öt említett faktor egyét értjük.

A fizikokémiai adatok alapján és ismert antibiotikumok szerkezetére való hivatkozással a A 40926 antibiotikum faktoroknak az (I) általános képlet tulajdonítható (a számozás analóg azzal, amelyet J. Williams a JACS 106, 4895-4908, 1984 helyen javasol); e képletben A jelentése -N-(11-12 szénatomos)-acil-amino-glukuronil-csoport és

B jelentése mannozil- vagy acetil-mannozil-csoport,

X₁-X₇, Z₆ és Z₈ jelentése hidrogénatom.

Közelebbről az A 40926 antibiotikum A faktor olyan előbbi képletű vegyület, amelyben A jelentése undekanoil-amino-glukuronil-csoport és B jelentése mannozil-csoport; az A 40926 antibiotikum Bo faktor olyan előbbi képletű vegyület, amelyben A jelentése izododekanoil-amino-glukuronil-csoport és B jelentése mannozil-csoport.

Az A 40926 antibiotikum PA faktor és PB faktor annyiban tér el a megfelelő A és Bo faktortól, hogy a mannoz-egység helyett acetyl-mannóz egységet tartalmaz.

Legalábbis bizonyos fermentációs körülmények között az A 40926 antibiotikum PA és PB faktor az A 40926 antibiotikumot termelő mikroorganizmus fő termékei.

Az A 40926 antibiotikum A, illetőleg B faktor főként az A 40926 antibiotikum PA, illetőleg PB faktor átalakulási terméke és gyakran már a fermentlében jelen van.

Azt találtuk, hogy az A 40926 antibiotikum PA faktor átalakítható A 40926 antibiotikum A faktorrá, és az A 40926 antibiotikum PB faktor átalakítható A 40926 antibiotikum B faktorrá, ha bázisos körülményeket alkalmazunk.

Következésképpen ha a fermentlevet, vagy annak egy - az A 40926 antibiotikumot tartalmazó - kivonatát vagy koncentrátumát bizonyos időn át bázisos körülmények között állni hagyjuk (például egy éjjelen át, egy nukleofil bázis vizes oldatában, pH 9 fölött), olyan A 40926 antibiotikum komplexhez jutunk, amely feldúsult az A 40926 antibiotikum A faktor és B faktor tekintetében és amelyet AB komplexnek nevezünk.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon a következő tulajdonságokkal jellemezhető

A) az 1. ábra szerinti UV abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	λ _{max} (nm)
a) 0,1 n HCl	280
b) pH 7,38 foszfát puffer	280; 300 (váll)
c) 0,1 n káliumhidroxid	298
d) pH 9,0 foszfát puffer	282; 300 (váll)

B) a 2. ábra szerinti IR abszorpciós spektrum, amely a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm⁻¹):

3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1655; 1620-1540; 1505; 1460; (nujol); 1375 (nujol); 1350-1250; 1210; 1150; 1020; 970; 850; 810

C) a 3. ábra szerinti ¹H-NMR spektrum, amely a következő jel-csoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en DMSO-d₆-ban (hexadeutero-dimetil-szulfoxid (CF₃COOH hozzáadásával felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm; multiplicitás; azonosítás):

2,51, s (DMSO_d); 2,50, s (NCH₃); 2,88, m (Z₂); 3,30, m (Z'₂); 4,08, m (X₆); 4,44, d (X₅); 4,49, d (X₇); 4,83, m (X₂); 5,02, s (4F); 5,08, s (Z₆); 5,31, s (a mannoz anomer protonja); 5,53, d (X₄); 5,78, s (4b); 6,08, d (X₃); 7,70, s (6b); 6,44-8,52 (aromás és peptid NH-k)

d = dublett

m = multiplett

s = szingulett

D) retenciós idő (R_t) 1,18 az L 17054 antibiotikumhoz (TA3-1) viszonyítva ($R_t = 8,78$ perc), az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μ m) Altex (Beckman) 4,6 mm (belső átmérő) x 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μ m)

A eluálószer:

CH ₃ CH	10%
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (2,5 g/l)	90%
pH 6,0-ra beállítva	

B eluálószer:

CH ₃ CN	70%
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (2,5 g/l)	30%
pH 6,0-ra beállítva	

eluálás: lineáris gradiens (5%-60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,6 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: L 17054 antibiotikum (TA3-1) (Gruppe Lepetit S. p. A.)

E) R_f érték 0,39 a következő kromatográfiás rendszerben:

5 g/l NaH₂PO₄.H₂O-t

tartalmazó 1M NaCl	70
acetonitril	30

pH 6,0-ra beállítva, szilanizált szilikagél lemezeket - szilikagél 60, F254 Merck lemezek, rétegvastagság 0,25 mm - alkalmazva

Kimutatás:

- UV fény
- sárgaszín Pauly reagenssel, azaz diazotált szulfanilsavval (J. Chromatog. 20, 171, 1965; Z. Physiol. Chem. 292, 99, 1953)
- bioautográfia B. subtilis ATCC 6633 alkalmazásával minimális Davis táptalajon

F) gyors atombombázásos (FAB) tömegspektrum, amelyben M + M' kb. 1374-nél helyezkedik el.

A Davis táptalaj összetétele: 1000 ml vízben 1 g (NH₄)₂SO₄, 3 g KH₂PO₄, 7 g K₂HPO₄, 0,5 g Na-citrát, 0,1 g MgSO₄, 10,0 g glükóz és 15,0 g agar; pH 7).

A fizikokémiai jellemzők alapján és az ugyanebbe az osztályba sorolható ismert antibiotikumok szerkezetére vonatkoztatva az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikonnak olyan előbbi (I) általános képlet tulajdonítható, amelyben A jelentése hidrogénatom és B jelentése mannozil-csoport.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont úgy állítjuk elő, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet, az A faktorban és B faktorban feldúsult A 40926 antibiotikum komp-

lexet azaz az AB komplexet, vagy az A, B, Bo, PA vagy PB faktort vagy ezek keverékeit ellenőrzött reakciókörülmények között savas hidrolízisnek vetjük alá.

5 Ezeket az ellenőrzött savas körülményeket egy ásványi sav vagy erős szerves sav tömény vizes oldata biztosítja, amelyhez előnyösen egy aprotikus szerves oldószert adagolunk. Az ásványi savakra kitüntetett példa a kénsav vagy a foszforsav.

10 Kitüntetett erős szerves sav a trifluorecetsav.

Kitüntetett aprotikus szerves oldószerek az aliciklusos vagy ciklusos alkil-éterek (pl. a dioxán és a tetrahidrofurán), a rövidszénláncú alkil-szulfoxidok (például a dimetil-szulfoxid) és a rövidszénláncú alkil-amidok (például a dimetil-formamid).

20 A reakció hőmérsékletét általában 0 °C és a reakcióelegy visszafolytatási hőmérséklete között tartjuk. Számos esetben ez 15 °C és 75 °C között helyezkedik el, míg a kitüntetett hőmérséklet 20 °C és 55 °C között választható meg. Legelőnyösebb a szobahőmérséklet.

25 A reakcióidő a reakció konkrét paraméterei függvényében változik és mivel a reakció lefolyása TLC vagy HPLC technikával követhető, a szakember képes a reakció előrehaladásának követésére és annak eldöntésére, hogy a reakció befejezettnek tekinthető-e.

30 A találmány szerinti eljárás egy kitüntetett foganatosítási módját képviseli az A 40926 antibiotikum komplex vagy egy tiszta faktora ellenőrzött hidrolízise - az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon előállítására - 80-95%-os vizes trifluorecetsav jelenlétében, szobahőmérsékleten.

40 A találmány szerinti eljárás egy másik kitüntetett foganatosítási módját képviseli az A 40926 antibiotikum komplex ellenőrzött hidrolízise, 1-2 n vizes kénsav és dioxán 2:1-1:2 arányú elegye jelenlétében.

45 A hidrolízis-lépés végén kinyert nyers A 40926 antibiotikus mannozil-aglikon tisztítása önmagukban ismert eljárások szerint végezhető, amilyen pl. a nem-oldószerek hozzáadása, kicsapás céljából, vagy az oldószeres extrakció és a kromatográfia.

50 A kitüntetett kromatográfiás eljárások közé tartozik az oszlopkromatográfia és a legkisebb kitüntetett kromatográfiás eljárás a fordított fázisú oszlopkromatográfia.

55 Egy megfelelő fordított fázisú folyadék-kromatográfiás eljárás során előnyösen saválló acél oszlopot alkalmazunk mérsékelt nyomáson (5·10⁵-5·10⁶ Pa) vagy nagy nyomáson (10⁷-2·10⁷ Pa). A szilárd fázis lehet egy szilanizált szilikagél, 2-18 szénatomos (legelőnyösebben 18 szénatomos) szénhidrogén-fázissal vagy fenilcsoporttal, az eluálószer pedig egy poláris, vízzel elegyedő oldószert és a gyantával összeférhető pH-jú (előnyösen 65 pH 3-8) vizes puffer elegye.

Jellegzetes példák a poláris, vízzel elegyedő oldószerekre: vízdíszható alkoholok (pl. metanol, etanol, izopropanol, n-butanol), acetone, acetonnitril, alkánkarbonsavak rövidszénláncú alkil-észterei (pl. az etilacetát), tetrahidrofuran, dioxán, dimetil-formamid és ezek elegyei. A leginkább kitüntetett poláris, vízzel elegyedő oldószer az acetonnitril.

Az eluált frakciók antibiotikum-tartalmát a szokásos biológiai vizsgálatok segítségével határozzuk meg, amilyen pl. a papirkorongos vagy az agardiffúziós meghatározás, érzékeny mikroorganizmusok alkalmazásával. Az érzékeny organizmusokra példa a *Bacillus subtilis* és a *S. aureus*.

A tisztítást, akár csak a reakciót, ugyan csak előnyösen TLC vagy HPLC technikával követhetjük.

Kitüntetett HPLC technika az olyan fordított fázisú HPLC eljárás, amelynek keretében 18 szénatomos alkil-csoportokkal funkcionizált szilikagélből előállított, előnyösen 5 mikrométer átmérőjű porózus, gömb alakú részecskével töltött oszlopot alkalmazunk (ilyen pl. az 5 µm-es Ultrasphere[®] ODS Altex, Beckman Co. töltetű oszlop). Az elő-oszlop 18 szénatomos alkil-csoportokkal funkcionizált szilikagél töltetet tartalmaz (amilyen pl. az RP 18, Brownlee Labs); eluálószerként pedig egy poláris, vízzel elegyedő oldószer (pl. az előbbieken leírtak közül) lineáris gradiens elegyét alkalmazzuk egy vízes pufferoldattal.

Ezt az oldatot előnyösen pH 5-7-re állítjuk be. A leginkább kitüntetett oldószer a B eluálószer 5-60%-os lineáris gradiense A eluálószerben, ahol az A eluálószer acetonnitril és egy pH 5-7 vízes puffer 10:90 elegye és a B eluálószer acetonnitril és egy pH 5-7 vízes puffer 70:30 arányú elegye.

Mint ez a szakember számára ismert, belső standardként számos anyag alkalmazható. Ebben az esetben nagyon előnyös az L 17054 antibiotikum, amelynek retenciós ideje ebben a HPLC rendszerben közel áll a találmány szerinti vegyületekéhez. Ez a standard anyag ismert; a O 119 575 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés írja le.

A találmány szerinti vegyületek antibakteriális aktivitása in vitro a szokásos hígítási tesztek segítségével mutatható ki, különböző mikroorganizmus tenyésztetek alkalmazásával.

A MIC (minimális gátló koncentráció) értékek meghatározásához a következő táptalajokat és tenyésztési körülményeket használtuk fel: Isosensitest leves (Oxoid), 24 óra, a staphylococcusok esetében, valamint a *Strep. faecalis* és a Gram-negatív baktériumok (*Escherichia coli*) esetében; Tedd-Hewitt leves (Difco), 24 óra a többi streptococcus-féleség esetében; GC alapleves (Difco) + 1% Isovitalax (BBL), 48 óra, CO₂-ban dúsított atmoszféra a *Neisseria gonorrhoeae* esetében; GB alap-agar (Difco) + 1% Isovitalax + 0,001% hemin, 24 óra a *Haemophilus influenzae* esetében; AC leves

(Difco), 24 óra, anaerób atmoszféra a *Clostridium perfringens* esetében; Wilkins-Chalgren agar (T. D. Wilkins, S. Chalgren, 1976, Antimicrob. Ag. Chemother. 10, 926), 48 óra, anaerób atmoszféra a többi anaerób (*C. difficile*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis*) esetében; PPLO leves (Difco) + 10% lószérum + 1% glukóz, 48 óra a *Mycoplasma gallisepticum* esetében. Az inkubálást 37 °C-on végezzük. Az inokulumok a következők: 1 térf./térf.% 48 órás leves-tenyészet a *M. gallisepticum* esetében; kb. 10⁴-10⁵ telepkepző egység/ml a többi leves-hígításos MIC meghatározás esetében; kb. 10⁴-10⁵ baktérium/folt (többpontos inokulátorral inokulálva) az agar-hígításos MIC meghatározások esetében (*H. influenzae*, *C. difficile*, *P. acnes*, *B. fragilis*).

A következő I. táblázatban mutatjuk be a különböző mikroorganizmusokra vonatkozó minimális gátló koncentrációkat (MIC, µg/ml).

I. táblázat

Törzs	A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon, MIC (µg/ml)
Staph. aureus Teur	0.25
Staph. aureus Teur (L165)	
10 ⁶ telepkepző egység/ml	1
Staph. aureus Teur 30%	
szarvasmarha szérum	2
Staph. epidermidis	
ATCC 12228	0.5
Strep. pyogenes C203	1
Strep. pneumoniae UC41	1
Strep. faecalis ATCC 7080	1
Strept. mitis klinikai izolátum	1
Clostridium perfringens	
ISS30543	0.13
Clostridium difficile	
ATCC 9689	2
Bacteroides fragilis	
ATCC 23745	64
Propionibacterium aenes	
ATCC 6919	1
Neisseria gonorrhoeae	
ISM68/126	32
Haemophilus influenzae	
b típus ATCC 19418	64
Escherichia coli SKF 12140	128 felett
Mycoplasma gallisepticum	
S6 Weybridge	128 felett

A találmány szerinti vegyületek antimikrobiális aktivitását in vitro kísérletekkel is megerősítettük, amelyeket lényegében a R. Pallanza et al. által leírt módon [J. Antimicrob. Chemother. 11, 419 (1983)] végeztünk.

A kísérleti fertőzést egérben úgy idéztük elő, hogy intraperitoneálisan *S. pyogenes* C 203 szuszpenziót vittünk be. Az inokulumokat úgy állítottuk be, hogy a nem kezelt állatok 48 órán belül elpusztuljanak a vérmérgezésben. Az állatokat kb. 30 perccel a fertőzést követően szubkután kezeltük a vizsgálandó vegyülettel.

Az ED₅₀ értéket a 10. napon számítottuk ki Spearman és Karber módszerével [D. J. Finney, *Statistical Methods in Biological Assay*, Griffin, p. 524 (1952)], az egyes dózissokhoz tartozó túlélők százalékos mennyisége alapján.

Az előbbi körülmények között az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon ED₅₀ értékét 3,8 mg/kg-mal találtuk egyenlőnek.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon savas és bázisos csoportokat tartalmaz és a szokásos eljárások alkalmazása esetén sókat képezhet.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon például oly módon alakítható át a megfelelő sav- vagy bázis-addíciós sóvá, hogy a nem-só alakot vizes oldószerben oldjuk és kis moláris feleslegben az oldathoz hozzáadjuk a kiválasztott savat vagy bázist. A kapott oldatot vagy szuszpenziót ezután liofilizáljuk, a kívánt só kinyerésére.

Abban az esetben, ha a végtermék só oldhatatlan egy oldószerben, amelyben a nem-só alak oldható, úgy nyerjük ki, hogy a kiválasztott sav vagy bázis sztöchiometrikus mennyiségben vagy kis moláris feleslegben való hozzáadása után a nem-só alakot kiszűrjük a szerves oldatból. A nem-só alak úgy állítható elő, hogy a megfelelő sav- vagy bázis-sót vizes oldószerben oldjuk, majd az oldatot semlegesítjük a nem-só alak felszabadítására.

Ha a semlegesítést követően kiszózás válik szükségessé, egy szokásos kiszózási eljárás alkalmazható. Előnyösen alkalmazhatjuk pl. az oszlopkromatográfiát szilanizált szilikagél, funkcionálisan át nem alakított polistírol, akril- és ellenőrzött porusméretű polidextrán gyanták (ilyen például a Sephadex LH 20) vagy aktív szén felhasználásával. A nem-kivánt sók vizes oldattal való eluálása után a keresett terméket lineáris gradiens vagy lépcsős gradiens segítségével eluáljuk, amelyet víz és egy poláris vagy apoláris oldószer keveréke segítségével - ilyen pl. az 50:50 acetónitril:víz elegy - kb. 100% acetónitril - alakítunk ki.

Mint ez a szakember számára ismert, a sóképzés - akár gyógyászati szempontból elfogadható savakkal (bázisokkal), akár gyógyászati szempontból el nem fogadható savakkal (bázisokkal) - előnyös tisztítási technikaként alkalmazható. Egy A 40926 antibiotikum só alakja (miután előállítottuk és elkülönítettük) átalakítható a megfelelő nem-só alakká vagy egy gyógyászati szempontból elfogadható sóvá.

Egyes esetekben az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon bázis-addíciós sója oldhatóbb vízben és hidrofil oldószerekben.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon aktív Gram-pozitív baktériumokkal szemben, amelyek számos, széles körben elterjedt fertőzésért felelősek. Mivel ezeknek a patogéneknek a rezisztenciája a szokásos terápiás kezeléssel szemben növekszik, még mindig nagy szükség van új antibiotikumokra.

Az antibakteriális kezelés esetében általában az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon, valamint nem-toxikus, gyógyászati szempontból elfogadható sói vagy ezek keverékei különböző úton, pl. helyileg vagy parenterálisan vihetők be. Általában az adagolás ki-tüntetett módja a parenterális bevitel.

Az injekciós készítmények szuszpenzió, oldat, vagy emulzió alakúak lehetnek, olajos vagy vizes hordozókkal, és hatásfokozó szereket - így szuszpendáló, stabilizáló és/vagy diszpergáló anyagokat - tartalmazhatnak.

Egy másik megoldás szerint az aktív komponens por alakú lehet és az oldat az alkalmazás időpontjában állítható elő, amikor a porhoz megfelelő vivőanyagot, például steril vizet adagolunk.

A beviteli mód függvényében ezek a vegyületek különböző adagolási formákban készíthetők ki.

Egyes esetekben a találmány szerinti vegyületek orális adagolás céljából bélben oldódó bevonattal ellátott alakban készíthetők ki, a szakember számára ismert módon (1. például: Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok, p. 1614).

Erre különösen abban az esetben lehet szükség, amikor konkrétan lényeges, hogy az antimikrobiális anyag a bélszakaszból szívódik fel, miután változatlanul haladt át a gyomor-szakaszon.

Az aktív anyag beviendő mennyisége különböző tényezőktől függ, amilyen a kezelendő egyén testsúlya és állapota, a bevitel módja és gyakorisága, valamint a szóbanforgó, a betegséget kiváltó tényező.

A találmány szerinti antibiotikum, nevezetesen az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon és gyógyászati szempontból elfogadható sói általában kb. 0,5-50 mg aktív komponens/kg testsúly napi dózis esetében hatékonyak, amelyet kívánt esetben a nap folyamán 1-4 adagra elosztva viszünk be.

Különösen előnyösek azok a készítmények, amelyeket kb. 100-kb. 5000 mg/egység hatóanyag-tartalmú egység-adagolási alakban állítunk elő.

Mint ez a szakember számára ismert, különböző mechanizmusok és eljárások alkalmazásával készített hatóanyag készítmények állíthatók elő.

Egy kitüntetett eljárás egy, az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont tartalmazó készítmény előállítására - amely készített hatású - abból áll, hogy az antibiotikum vízoldhatatlan alakját alkalmazzuk, vizes vagy olajos közegben szuszpendálva.

Gyógyszerkészítmények előállítása

Intramuszkuláris injekció céljára egy-ség-adagolási alakot állítunk elő 5 ml steril USP szuszpenzióval, amely 8% propilén-glikolt és 1000 mg A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont tartalmaz.

Intramuszkuláris injekció céljára egy-ség-adagolási alakot állítunk elő 5 ml steril USP vízzel, amely 500 mg A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont tartalmaz.

Intramuszkuláris injekció céljára egy-ség-adagolási alakot állítunk elő oly módon, hogy 2000 mg A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon nátrium só 5 ml steril pro inj. vízben szuszpendálunk.

A találmány szerinti antibiotikum ezenkívül hasznos a Clostridium diffieile növekedésének elnyomásában, amely a bélben pszeudomembrán kolitist okoz. Az antibiotikum felhasználható a pszeudomembrán kolitisz kezelésében; ennek során orálisan az antibiotikumtól vagy gyógyászati szempontból elfogadható sójából hatásos adagot viszünk be, gyógyászati szempontból elfogadható adagolási alakban kikészítve. Ilyen alkalmazás esetében az antibiotikum zselatin kapszulában vagy folyékony szuszpenzióban vihető be.

Gyógyszerként mutatott aktivitása mellett az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon és gyógyászati szempontból elfogadható sói felhasználhatók az állati növekedés elősegítésére.

Erre a célra a találmány szerinti vegyületeket orálisan, megfelelő takarmányban visszük be. Az alkalmazott pontos koncentráció azonos azzal, amelyre ahhoz van szükség, hogy normális mennyiségű takarmány elfogyasztása esetén az aktív anyag a növekedést elősegítő hatásos mennyiségben álljon rendelkezésre.

A találmány szerinti aktív vegyületeknek az állati takarmányhoz való hozzáadása előnyösen úgy történik, hogy megfelelő takarmány premixet állítunk elő, amely az aktív vegyületet hatásos mennyiségben tartalmazza és a premixet hozzáadjuk a teljes takarmányhoz.

Egy másik megoldás szerint az aktív komponens tartalmazó átmeneti koncentrátum vagy takarmányadalék keverhető össze a takarmánnyal.

Kézikönyvek ismertetik azokat az eljárásokat, amelyek segítségével az ilyen takarmány premixek és teljes takarmányok előállíthatók (ilyen pl. a következő: Applied Animal Nutrition, W. H. Freedman and Co., San

Francisco, Amerikai Egyesült Államok, 1969 vagy „Livestock Feeds and Feeding”, O and B Books, Corvallis, Oregon, Amerikai Egyesült Államok). Ezeket a könyveket a hivatkozás révén a leírás részévé tesszük.

A következő példák a találmány további szemléltetésére szolgálnak és ilyenekként nem tekinthetők a találmány terjedelmét korlátozó jellegűnek.

1. példa

a) 214 mg A 40926 antibiotikum AB komplexet (lásd a következő 3. műveletet) 30 ml 9:1 (térf./térf.) trifluor-ecetsav: víz elegyben oldunk. 48 órás, szobahőmérsékleten való állás után a keveréket vákuumban szobahőmérsékleten eredeti térfogatának 1/10-ére pároljuk be, átöblítjük 30 ml vízzel, majd kétszer extraháljuk etilacetáttal. A vizes fázis főként az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont és trifluor-ecetsavat tartalmaz.

b) Ezt a vizes fázist 1n nátrium-hidroxiddal semlegesítjük, majd felvisszük egy oszlopra (töltet-magasság 5 cm), amely 50 ml szilanizált szilikagél 60-at (0,20-0,06 mm szita lyukbőség, Merck Co, art. 7719) tartalmaz, vízben. Az oszlopot desztillált vízzel moosuk, majd 1:1 (térf./térf.) acetonnitril: víz eleggyel eluáljuk.

20 ml-es frakciókat szedünk és ezeket HPLC-vel (vagy TLC-vel) vizsgáljuk. Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont tartalmazókat összeöntjük, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be, majd fagyaszttva szárítjuk. 124 mg A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont kapunk.

2. példa

Az 1. példa szerinti eljárást ismételjük meg, de a kiindulási anyagot 2 órán át kb. 65 °C-on (nem pedig egy éjjelen át szobahőmérsékleten) reagáltatjuk a vizes trifluor-ecetsavval. Kitermelés: 110 mg végtermék.

3. példa

Az 1. példa szerinti eljárást ismételjük meg, de a vizes trifluor-ecetsav helyett 1:1 2n vizes kénsav és dioxán elegyét alkalmazzuk. A reakció hőmérséklete ebben az esetben kb. 65 °C és a reagáltatást egy éjjelen át végezzük. A kitermelés hasonló az előző példa szerintihez.

4. példa

Az 1. példa szerinti eljárást ismételjük meg, kiindulási anyagként A 40926 antibiotikum komplex helyett

a) A 40926 antibiotikum A faktort, illetve

b) A 40926 antibiotikum B faktort, alkalmazva, A kitermelések hasonlóak az előbbi példák szerintiekhez.

5. példa

Az 1.a) példa szerint előállított A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont az alábbiak szerint további tisztításnak vetjük alá: a vizes fázist 1n nátrium-hidroxiddal semlegesítjük, majd vákuumban kb. 18 ml-re töményítjük be.

A kapott oldatot kétszer egymás után kromatográfiás futtatásnak vetjük alá saválló acél oszlopban (átmérő 2 cm), amelyet 20 g 10 mikronos RP 18 szilikagéllal töltöttünk meg (Lichrosorb RP18 Merck Co., art. 9334); a töltetet 17:83 (térf./térf.) acetonnitril: 18 mmólos pH 6,0 nátrium-foszfát puffer oldószerrel egyensúlyozzuk ki.

Az oszlop része egy Chromatospac Modulprep egységnek (Joben Yvon, Longjumeau, Franciaország). Az oszlopot 17:83 acetonnitril: 18 mmólos pH 6,0 nátrium-foszfát puffer eleggyel eluáljuk. Az eluált frakciókat 275 nm-en vizsgáljuk, UVICORD S UV monitor (LKB Co.) alkalmazásával, és a meghatározást HPLC és TLC technikával végezzük.

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikont tartalmazó, a két kromatográfiás futtatással kapott frakciókat összeöntjük és a szerves oldószer eltávolítására vákuumban betöményítjük. A kapott vizes oldatot ezután kromatografáljuk és feldolgozzuk (az 1. b) példában leírtak szerint); így 66 mg A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon liofilizátumot kapunk.

A kiindulási anyagok előállítása

1. művelet

Fermentáció az *Actinomadura sp. ATCC 39727* törzsszel

Egy A 40926 antibiotikumot termelő törzs (*Actinomadura sp. ATCC 39727*) tenyésztését zabliszt ferde agaron 2-3 héten át 28 °C-on tenyésztjük és ezt használjuk fel egy 500 ml-es Erlenmeyer lombik beoltására, amely 100 ml, következő összetételű táptalajt tartalmaz:

0,5% húskivonat
0,5% autolizált élesztő
0,5% pepton
0,3% hidrolizált kazein
2% glukóz
0,13% NaCl

8

pH sterilizálás előtt 7,5.

A lombikot 28 °C-on kb. 72 órán át 200 ford./perc sebességű forgó rázógépen inkubáljuk, majd a tenyészetet átvisszük egy fermentorba, amely 4 liter előbbi összetételű táptalajt tartalmaz. Ezt a tenyészetet 28 °C-on kb. 72 órán át tenyésztjük, kb. 2 liter/ /perc sebességű levegő-átfuvatással és kb. 900 ford./perc sebességgel való keveréssel. Egy ilyen lombikot használunk el egy 200 literes, ugyanilyen táptalajt tartalmazó fermentor beoltására. Ezt a fermentort 100 liter/perc mennyiségű steril levegővel levegőztetjük és kb. 28 °C-on 250 ford./perc sebességgel keverjük. Az antibiotikum termelést papirkorongos agar-diffúziós módszerrel követjük, minimális táptalajon, teszt-organizmusként B. subtilist alkalmazva. A maximális aktivitást 72-96 óra elteltével érjük el.

2. művelet

Az A 40926 antibiotikum kinyerése

A) A fermentlevet 4 °C-ra hűtjük, pH 9,5-re állítjuk be és keverjük. Kb. 1 óra elteltével szűrjük és a szűrlet pH-ját vizes ásványi savval kb. 3,5-re állítjuk be. Az elegyet 4 °C-on 30 percen át keverjük, majd Hyflo-FloMa[®] szűrést elősegítő anyaggal szűrjük. A tiszta szűrletet eltávolítjuk; a szűrőlepenyt ionmentesített vízben szuszpendáljuk, a szuszpenzió pH-ját kb. 8,5-re állítjuk be, keverjük, majd szűrjük. A kinyert szűrőlepenyt ugyanennek az eljárásnak vetjük alá. Az egyesített szűrletek tartalmazzák az A 40926 antibiotikumot.

B) 2 liter duzzasztott D-Ala-D-Ala-epszilon-aminokaproil-Sepharose módosított mátrixot adunk az 1. művelet szerint előállított fermentléhez (miután szűrtük és a tiszta szűrlet pH-ját kb. 8,5-e állítottuk be), vagy az előbbi 2.A) eljárás szerint kapott egyesített szűrlethez. Egy éjjelen át szobahőmérsékleten való keverés után a gyantát szűrővel kinyerjük és egymás után a következőkkel mossuk: kb. 2 x 10 liter pH 7,5 0,45 mmólos HCl-TRIS puffer (TRIS = 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol), amely 5 tömeg/térf.% NaCl-t tartalmaz, majd 4 x 20 liter desztillált víz. Az A 40926 antibiotikumot 2 x 20 liter 1 tömeg/térf.%-os ammónium-hidroxiddal eluáljuk a gyantáról. Az eluátumokat egy éjjelen át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd kis térfogatra (kb. 2,5 liter) betöményítjük. A vizet n-butanollal végzett azeotróp desztillációval távolítjuk el. Ezután petrolétert adagolunk; így 3,4 g nyers A 40926 antibiotikum komplexet csapunk ki.

65

3. művelet

Az A 40926 antibiotikum AB komplex tisztítása

A lényegében az előbbi 2. műveletet követve kapott nyers A 40926 antibiotikum komplexet (750 mg; HPLC titer 70%) 400 ml vízben oldjuk, az oldat pH-ját 7,5-re állítjuk be és szűrjük. A szűrletet affinitáskromatográfiának vetjük alá D-Ala-D-Ala-epszilon-aminokaproil-Sepharose oszlopon) 50 ml duzzasztott gyanta; töltet-magasság 5 cm). Az oszlopot 0,16 tömeg/térf.%-os ammóniával, mely 2 mól NaCl-ot tartalmaz, egyensúlyozzuk ki, amelyet HCl-val pH 7,5-re állítunk be, majd egymás után a következő három puffer-oldattal fejlesztjük ki:

A puffer: NaCl-ra 2 mól, HCl-val pH 7,5-re beállított 0,16 tömeg/térf.%-os ammónia (2,6 ágytér fogat);

B puffer: NaCl-re 2 mól, HCl-lel pH 9,5-re beállított 0,16 tömeg/térf.%-os ammónia (16 ágytér fogat);

C puffer: 1 tömeg/térf.%-os pH 11,4 vizes ammónia 2,6 ágytér fogat).

A C puffer egyetlen frakcióban eluálja az A 40926 antibiotikum AB komplexet. Ezt az eluált frakciót pH 7,0-ra állítjuk be és újra felvisszük ugyanerre az affinitás-oszlopra, amelyet pH 7,0 10 mM TRIS-HCl pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot desztillált vízzel mossuk, amíg a sók eltávolítása teljesé nem válik. Ezután az antibiotikumot 2 oszlopágytér fogatnak megfelelő mennyiségű pH 11,0 39 tömeg/térf.%-os vizes ammóniával eluáljuk.

Az eluált frakciókat kistér fogatú vizes eleggyé töményítjük be, majd ezt fagyasztva szárítjuk. 374 mg tiszta A 40926 antibiotikum AB komplexet kapunk.

4. művelet

Az A 40926 antibiotikum A és B faktor elkülönítése

A) 3,3 g, a 2. művelet szerint előállított A 40926 antibiotikum komplexet vagy 2,3 g a 3. művelet szerint előállított A 40926 antibiotikum AB komplexet 0,5 liter vízben szuszpendálunk, a szuszpenziót kevertetjük, majd szűrjük. A tiszta szűrletet felvisszük egy szilanizált szilikagél oszlopra (200 g; ágymagasság 18 cm; szilanizált szilikagél 60, 0,20-0,06 mm szitályukbőség, Merck Inc.), amelyet előzetesen A oldattal egyensúlyoztunk ki (0,001 mól vizes nátrium-EDTA oldat, amely 0,25 tömeg/térf.% NaH₂PO₄·H₂O-t és 2,5 tömeg/térf.% NaCl-t tartalmaz, NaOH-dal pH 6,0-ra beállítva). Az oszlopot lineáris gradiens alkalmazásával eluáljuk (0%-40% - térf./térf. - acetonitril A oldatban; össztér fogat kb. 7 liter, kb. 48 óra alatt).

Kb. 15,5 ml-es frakciókat szedünk; ezeket biológiai meghatározásnak vetjük alá Bac.

subtilis alkalmazásával, és HPLC-vel elemezzük. A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat összeöntjük. A 310-330. frakció tartalmazza az A 40926 antibiotikum A faktornak nevezett antibiotikumot, a 348-365. frakció pedig az A 40926 antibiotikum B faktornak nevezett anyagot.

B) Az A 40926 antibiotikum A faktort, illetőleg az A 40926 antibiotikum B faktort tartalmazó egyesített frakciókat az acetonitril eltávolítására csökkentett nyomáson betöményítjük, (kb. a kiindulási oldatok térfogata kétszeresének megfelelő mennyiségű) vízzel hígítjuk és felvisszük az előbbieken leírt típusú szilanizált szilikagél oszlopra (a duzzasztott mátrix térfogata 50 ml; ágymagasság 15 cm). Az oszlopot ionmentesített vízzel mossuk, amíg a sók eltávolítása teljessé nem válik. Végül az oszlopot 60:40 (térf./térf.) acetonitril:víz eleggyel fejlesztjük ki.

Az eluált frakciókat csökkentett nyomáson betöményítjük és a maradékot fagyasztva szárítjuk. Az eluált frakciók első csoportjából (az előbbi 310-330. frakció) 134 mg A 40926 antibiotikum A faktort kapunk, az eluált frakciók második csoportjából (az előbbi 348-365. frakció) pedig 206 mg A 40926 antibiotikum B faktort.

5. művelet

Az A 40926 antibiotikum PA faktor és PB faktor elkülönítése

Lényegében a 2. A) művelet és a 2. B) művelet első lépéseit követve a gyantához kötött antibiotikumot 2 x 20 liter 1 tömeg/40 /térf.%-os ammóniumhidroxiddal eluáljuk. Az eluátumok pH-ját kénsavval 7,8-ra állítjuk be és az oldatokat vákuumban, n-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be. Vizes koncentrátumot kapunk, amelyet papíron szűrünk. A kapott szűrlet A 40926 antibiotikum PA faktort, A 40926 antibiotikum PB faktort és kisebb mennyiségű A 40926 antibiotikum A faktort és B faktort (HPLC) tartalmaz.

Ebből a vizes koncentrátumból egy 10 ml-es mintát, amely kb. 50 mg/ml tiszta A 40926 antibiotikum komplexet (HPLC-vel végzett elemzés) tartalmaz, 5 mikrométer pórusméretű szűrőn (Acrodise[®], Gelman Science Inc.) szűrünk, majd a szűrletet felvisszük egy 2 cm átmérőjű saválló acél oszlopra, amely 20 g oktadecil-szilil fordított fázisú szilikagélt (Lichrosorb RP 18, Merck Inc.) tartalmaz; részecskeméret 10 μm. A szilikagélt ezután mérsékelt nyomáson (névleges nyomás kb. 1,4·10⁶ Pa) betöltjük egy Chromatospac Modulprep készülék (Joben Yvon, Franciaország) saválló acél oszlopába és acetonitril:pH 6,0 18 mmól nátriumfoszfát puffer (térf./térf.) eleggyével kiegyensúlyozzuk az oszlopot. Az eluálást ugyanannak az oldó-

szelegynek az alkalmazásával hajtjuk végre, amelyet a kiegyensúlyozáshoz használtunk; áramlási sebesség kb. 10,5 ml/perc. Az eluálást *Bac. subtilis*-szel végzett biológiai meghatározással és HPLC-vel követjük.

A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat összeöntjük és 5 kromatográfias futtatás homogén frakcióit a szerves oldószer ledesztillálásával betöményítjük.

A kapott oldatot az eredeti térfogat kétszeresének megfelelő mennyiségű vizes 1 mólos nátrium-kloriddal hígítjuk és az oldatot felvisszük egy szilanizált szilikagél oszlopra (50 g, ágy-magasság 5 cm; szilanizált szilikagél 60, Merck Inc.), amelyet vízzel egyensúlyoztunk ki.

Az oszlopot ionmentesített vízzel mosuk, amíg a sók eltávolítása teljessé nem válik (vizes AgNO_3 oldat hozzáadása után az eluátumokban nem jelenik meg AgCl csapadék), majd az oszlopot 1:1 (térf./térf.) acetonitril:víz eleggyel eluáljuk. A hasonló antibiotikum-tartalmú frakciókat (HPLC elemzés) összeöntjük, *n*-butanollal végzett azeotróp desztillációval kis térfogatra töményítjük be és így egy vizes fázist kapunk, amelyet fagyasztva szárítunk. Kitermelések:

A 40926 antibiotikum PA faktor: 55 mg

A 40926 antibiotikum PB faktor: 51 mg

A 40926 antibiotikum A faktor: 38 mg

A 40926 antibiotikum B₀ faktor: 33 mg

6. művelet

Az A 40926 antibiotikum PA faktor átalakítása
A 40926 antibiotikum A faktorra és az
A 40926 antibiotikum PB faktor átalakítása
A 40926 antibiotikum B faktorra

50-50 mg A 40926 antibiotikum PA faktort, illetőleg A 40926 antibiotikum PB faktort, 2,5 ml vizes 1 tömeg/térf.-os ammónium-hidroxidban külön-külön feloldunk és a kapott oldatokat kb. 24 órán át keverés közben szobahőmérsékleten tartjuk.

Az A 40926 antibiotikum A faktort úgy nyerjük ki az eredetileg az A 40926 antibiotikum PA faktort tartalmazó oldatból, és az A 40926 antibiotikum B faktort az eredetileg az A 40926 antibiotikum PB faktort tartalmazó oldatból, hogy a vizet *n*-butanollal végzett azeotróp desztillációval eltávolítjuk, etiléteres kicsapást végzünk és a csapadékot szűrővel összegyűjtjük (kitermelés kb. 75%).

A D-Ala-D-Ala-Sepharose előállítása

Aktivált CH-Sepharose 4B-t (Pharmacia Fine Chemicals) - 1 g - 15 percen át 1 mmólos jéghideg sósavban duzzadni hagyunk, majd ugyanezzel az oldattal mossuk.

A kapott (kb. 3 ml térfogatú) gélt összekeverjük egy olyan oldattal, amely 0,5 mólos nátrium-klorid - 0,1 mólos nátrium-hidrogén-karbonát puffer oldatban 30 mg D-alanil-D-alanint tartalmaz; pH 8.

A keveréket 1 órán át szobahőmérsékleten sikrázógépen rázatjuk.

A kapcsolási reakció befejeződése után a ligandum feleslegét a pufferrel kimossuk. A dextrán hordozó meg nem kötött aktivált csoportjait 1 mólos etanolamin-hidroklorid oldattal, pH 9-en 1 órán át végzett kezeléssel blokkoljuk.

Ezután a Sephadex-epszilon-aminokaproil-D-alanil-D-alanin módosított mátrixot szűrővel kinyerjük és alaposan mossuk, felváltva, 0,5 mólos nátrium-kloriddal és pH 4 0,1 mólos nátrium-acetáttal, majd négyyszer -0,5 mólos nátrium-kloriddal és pH 8 0,1 mólos trisz(hidroximetil)aminometán pufferrel.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon előállítására, mely a következő jellemzőkkel rendelkezik:

A) UV abszorpciós spektruma a következő abszorpciós maximumokat mutatja:

	lambda _{max} (nm)
a) 0,1 n HCl	280
b) pH 7,38 foszfát puffer	280; 300 (váll)
c) 0,1 n káliumhidroxid	298
d) pH 9,0 foszfát puffer	282; 300 (váll)

B) IR abszorpciós spektruma a következő abszorpciós maximumokat mutatja (cm⁻¹): 3700-3100; 3000-2800 (nujol); 1655; 1620-1540; 1505; 1460; (nujol); 1375 (nujol); 1350-1250; 1210; 1150; 1020; 970; 850; 810

C) ¹H-NMR spektruma a következő jelcsoportokat mutatja (ppm-ben) 270 MHz-en DMSO-d₆-ban (hexadeutero-dimetil-szulfoxid és CF₃COOH elegyében felvéve, belső standardként (0,00 ppm) TMS-t alkalmazva (delta, ppm; multiplicitás; azonosítás); 2,51, s (DMSOds); 2,50, s (NCH₃); 2,88, m (Z2); 3,30, m (Z'2); 4,08, m (X6); 4,44, d (X5); 4,49, d (X7); 4,83, m (X2); 5,02, s (4F); 5,08, s (Z6); 5,31, s (a mannóz anomer protonjai); 5,53, d (X4); 5,78, s (4B); 6,08, d (X3); 7,70, s (6B); 6,44-8,52 (aromás és peptid NH-k)

D) retenciós idő (R_t) 1,18 az L 17054 (TA3-1) antibiotikumhoz viszonyítva (R_t = 8,78 perc), az elemzést fordított fázisú HPLC-vel a következő körülmények között végezve:

oszlop: Ultrasphere ODS (5 μm) Altex

4,6 mm (belső átmérő) x 250 mm

elő-oszlop: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

A eluálószer:

CH₃CN 10%

2,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O 90%

pH 6,0-ra beállítva

B eluálószer:

CH₃CN 70%

2,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O 30%

pH 6,0-ra beállítva

eluálás: lineáris gradiens (5%-60% B eluálószer A eluálószerben), 40 perc alatt

áramlási sebesség: 1,6 ml/perc

UV detektor: 254 nm

belső standard: L 17054 (TA3-1) antibiotikum

E) R_f 0,39 a következő kromatográfias rendszerben:

5 g/l NaH₂PO₄·H₂O-t

tartalmazó 1 mólos NaCl 70

acetonitril 30

pH 6,0-ra beállítva, szilanizált szilikagél

60 F254 Merck lemezeket (rétegvastagság

0,25 mm) - alkalmazva

Előhívás:

- UV fény

- sárga szín Pauly reagenssel, azaz diazotált szulfanilsavval

- bioautográfia B. subtilis ATCC 6633 felhasználásával minimális Davis-f táptalajon

F) gyors atom-bombázásos (FAB) tömegspektrum M + M⁺ értékkel kb. 1374-nél, *azzal jellemezve*, hogy az A 40926 antibiotikum komplexet, az A és B faktorban feldúsított komplexet, vagy a PA, PB, A, B vagy Bo faktort egy ásványi sav vagy egy erős szerves sav tömény vizes oldatának alkalmazásával - kivánt esetben egy aprotikus szerves oldószer jelenlétében - hidrolizáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ásványi savként kénsavat alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves savként trifluor-ecetsavat alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aprotikus szerves oldószerként dioxánt alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióelegy hőmérsékletét 0 °C és a visszafolyatási hőmérséklet között tartjuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióelegy hőmérsékletét 15 °C és 75 °C között tartjuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy erős savként 85-95%-os vizes trifluor-ecetsavat alkalmazunk és a reakcióelegy hőmérsékletét a szobahőmérsékletre állítjuk be.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolízist 2:1 - 1:2 arányú vizes ln kénsav:dioxán elegy jelenlétében hajtjuk végre.

9. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon vegyületet egy gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal és/vagy adalékanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé feldolgozzuk.

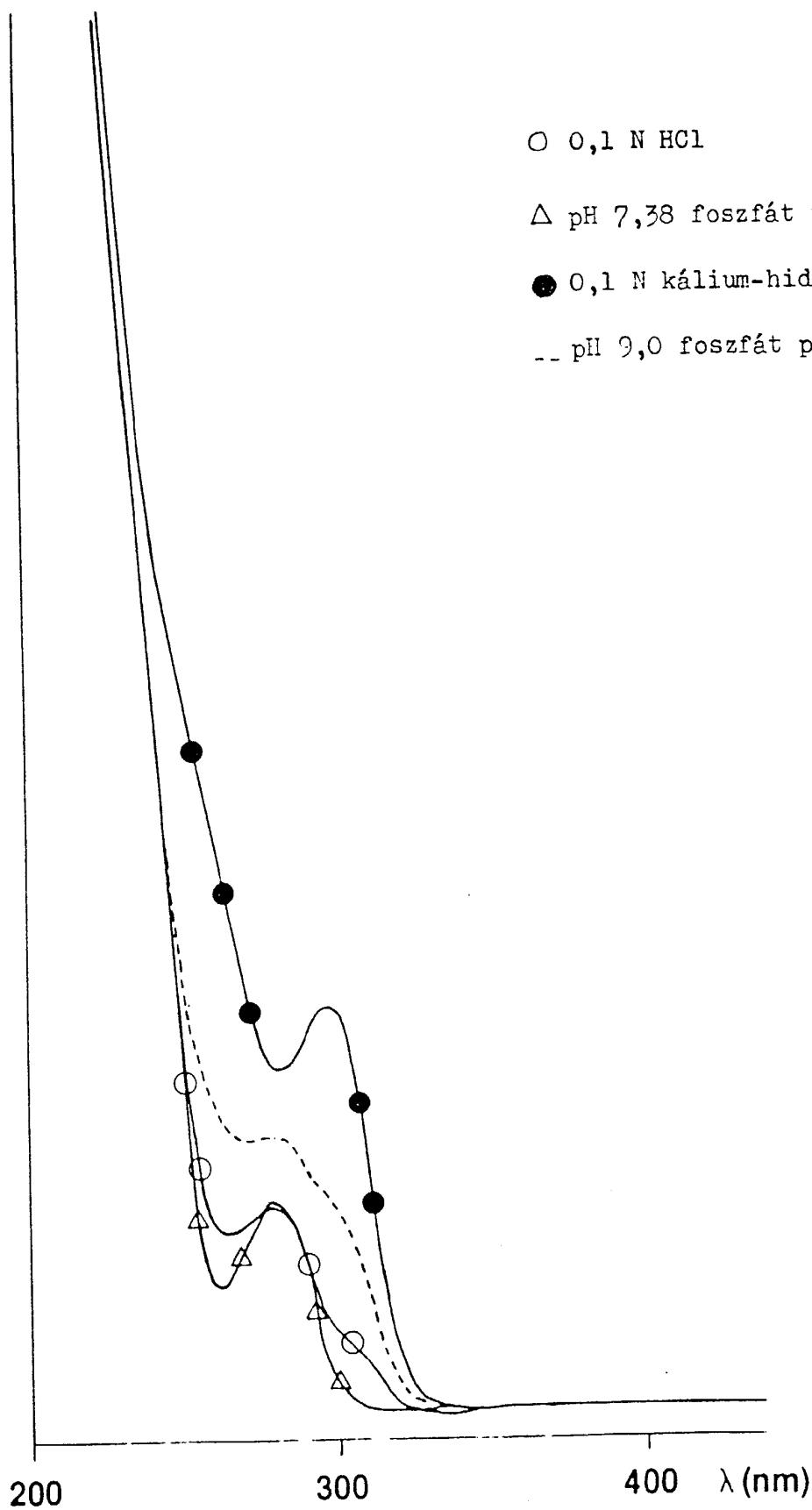
Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest -
- A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
R 4960 - KJK

90.3346.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató

HU 201099 B
Int Cl⁵ C 07 K 9/00
A 61 K 37/02

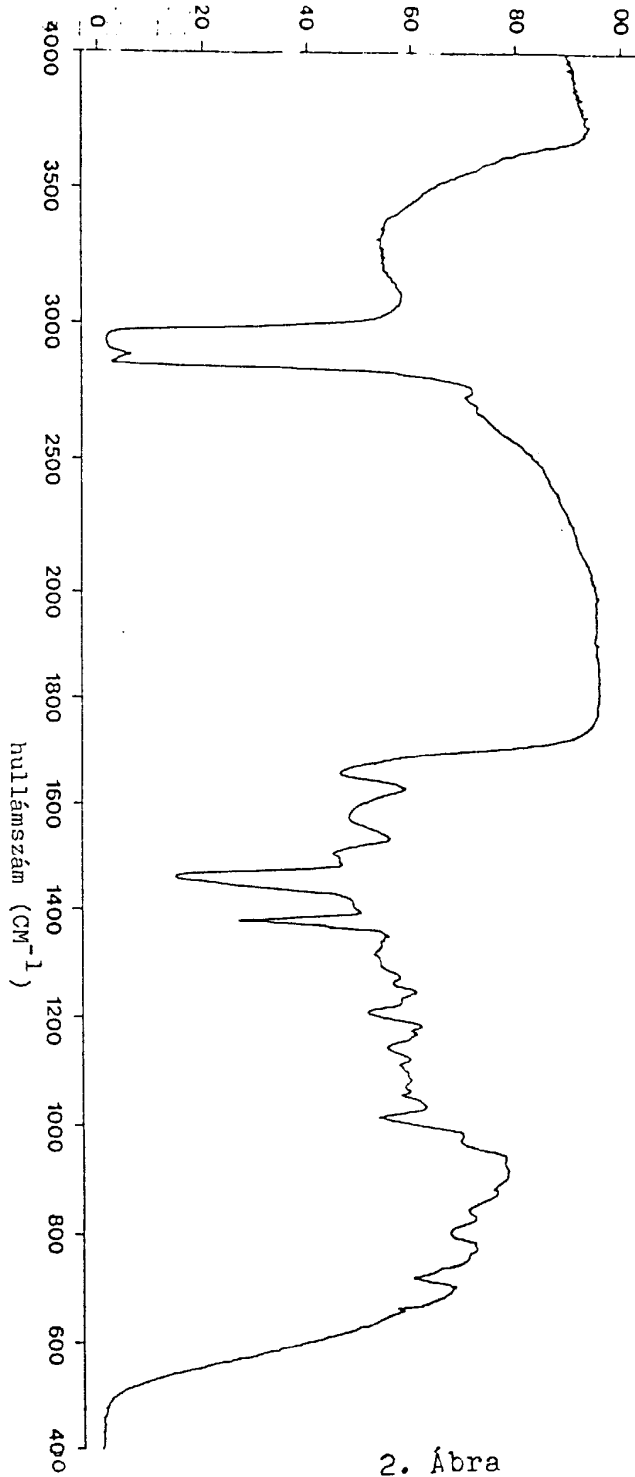
A

- 0,1 N HCl
- △ pH 7,38 foszfát puffer
- 0,1 N kálium-hidroxid
- pH 9,0 foszfát puffer



1. ábra

HU 201099 B
Int Cl⁵ C 07 K 9/00
A 61 K 37/02



Az A 1:0926 antibiotikum mannozil-glikon IR spektruma

2. Ábra

HU 201099 B
Int Cl⁵ C 07 K 9/00
A 61 K 37/02

Az A 40926 antibiotikum mannozil-aglikon ¹H-NMR spektruma

