



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(SU) 1318170 A3

(51) 4 C 12 P 1/06 // (C 12 P 1/06,  
C 12 R 1:045)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К ПАТЕНТУ

- (21) 3604953/28-13  
(22) 07.06.83  
(31) 8216590  
(32) 08.06.82  
(33) GB  
(46) 15.06.87. Бюл. № 22  
(71) Группо Лепетит С.п.А. (ИТ)  
(72) Анджело Борги, Роза Палланца,  
Каролина Коронелли и Джованни Кас-  
сани (ИТ)  
(53) 615.779.93(088.8)  
(56) Патент Бельгии № 839259,  
кл. C 12 D, 1976.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАКТОРОВ 1,2,  
3,4,5 ТЕЙХОМИЦИНА  $A_2$  И ИХ СОЛЕЙ  
(57) Изобретение относится к обла-  
сти биотехнологии и касается получе-  
ния антибиотиков - факторов 1,2,3,4,  
5 тейхомицина  $A_2$ . Цель изобретения -  
разработка способа разделения тей-  
хомицина  $A_2$  на факторы 1,2,3,4,5 и  
получение их солей, сущность спосо-  
ба сводится к тому, что тейхомицин  
 $A_2$ , полученный при культивировании  
*Actinoplanes teichomyceticus* nov.

спр. ATCC 31121, растворяют, подвер-  
гают обратнофазной хроматографии на  
колонке, заполненной спланированным  
силикагелем. Элюцию проводят с помо-  
щью линейного градиента от 10 до 20%  
ацетонитрила в 0,2%-ом растворе ам-  
монийформата. Соединяют фракции  
сходного профиля, концентрируют с по-  
мощью бутанола и осаждают смесью аце-  
тона и диэтилового эфира (1:1). По-  
лучают 410 мг фактора 1 и 770 мг  
фактора 2 в чистом виде. Далее смесь  
факторов 3 и 2 и факторов 4 и 5 про-  
пускают через колонку, заполненную  
октадецилсиланом, элюируют смесью  
водного 0,2%-го раствора формата ам-  
мония и ацетонитрила в соотношении  
76:24. Фракции отбирают, обессолива-  
ют и осаждают аналогично получению  
фактора 1 и 2. В результате получают  
дополнительно 510 мг фактора 2, а  
также 520 мг фактора 3, 350 мг факто-  
ра 4 и 300 мг фактора 5. Полученные  
антибиотики обладают активностью в  
отношении грамположительных микроор-  
ганизмов. 4 табл.

(SU) 1318170 A3

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству антибиотиков.

Целью изобретения является создание способа получения новых антибиотиков - факторов 1,2,3,4,5 тейхомицина  $A_2$  и их солей.

Пример 1. 10 г тейхомицина  $A_2$ , полученного путем культивирования штамма *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121, растворяют в 1 л 0,2%-ной смеси формиата аммония и ацетонитрила (9:1). Значение pH полученного раствора с помощью 1 н. раствора гидроокиси натрия доводят до 7,5. Раствор пропускают через колонку, содержащую 500 г силанированного силикагеля 60 фирмы Мерк.

Затем колонку элюируют с помощью линейного градиента 10-20% ацетонитрила в 0,2%-ном растворе формиата аммония при общем объеме 10 л.

Фракции (около 20 мл) собирают и исследуют с помощью ВТХ (тонкослойная хроматография под высоким давлением): колонка: 5 мк Lorbax® ODS (фирмы Дюпон (Du Pont)); подвижная фаза: линейный градиент 0-50%-ный раствор Б в А в течение 40 мин. Раствор А: 25 мМ  $NaH_2PO_4$ /ацетонитрила (9:1), забуферованный до pH 6,0 посредством 0,1 н. NaOH; раствор Б: 25 мМ  $NaH_2PO_4$ /ацетонитрила (3:7), забуферованный до pH 6,0 посредством 0,1 н. NaOH; скорость потока 2 мл/мин; детектор: УФ-фотометр при 254 нм.

В табл. 1 указаны времена удерживания  $t_R$  для факторов 1, 2, 3, 4 и 5 тейхомицина  $A_2$  в показательном процессе разделения с помощью ВТХ с указанием в ней условий проведения хроматографии.

Т а б л и ц а 1

Фактор тейхомицина $A_2$	Время удерживания, мин
1	21,2
2	22,6
3	23,3
4	25,8
5	26,4
3,5-Диокситолуол (внутренний эталон)	8,84

Фракции со сходным профилем ВТХ собирают и органический растворитель упаривают под пониженным давлением. Оставшиеся водные растворы пропускают через колонку, содержащую 10 г силанированного силикагеля 60 фирмы Мерк. Колонку затем промывают дистиллированной водой в целях удаления формиата аммония и элюируют 50%-ным водным ацетонитрилом. Элюат концентрируют до небольшого объема путем добавления бутанола для облегчения упаривания воды и осаждают его смесью ацетона и диэтилового эфира (1:1). Получают 410 мг фактора 1 и 770 мг фактора 2 тейхомицина  $A_2$  в чистом виде.

Смесь факторов 3 и 2 тейхомицина  $A_2$  (1:1) подвергают дальнейшей очистке с помощью ВТХ на полупрепаративной колонке при следующих условиях: колонка: Whatman Partisil® ODS М 9 10/50 (содержащая октадецилсилан); подвижная фаза: 0,2%-ный формиат аммония в смеси  $H_2O$  и ацетонитрила (76:24); скорость потока: 4,5 мл/мин; детектор: УФ-фотометр при 254 нм; загрузка: 20 мг.

Очистку проверяют исследованием каждой фракции с помощью ВТХ.

Фракции, содержащие чистый фактор 2 и 3 тейхомицина  $A_2$ , собирают, обессливают и осаждают, как описано.

Выход: 510 мг фактора 2 и 520 мг фактора 3.

Фракции, содержащие факторы 4 и 5 в соотношении 1:1 (около 500 мг), полученные из первой колонки, объединяют с другой смесью фракций, содержащей факторы 4 и 5 (около 490 мг) и полученной в результате проведения второго параллельного процесса разделения путем полупрепаративной ВТХ, разделяют при условиях, описанных для очистки фактора 3 тейхомицина  $A_2$ , с получением 350 мг фактора 4 и 300 мг фактора 5.

Фактор 1 тейхомицина  $A_2$  представляет собой белый аморфный порошок, который при температуре около 220°C начинает темнеть и при 255°C полностью разлагается. Химико-физическая характеристика его следующая:

а) легко растворим в воде при значении pH выше 7,0 или ниже 2, а также в ДМФ, ДМСО и пропиленгликоле, малорастворим в метилцеллозольве и глицерине, слаборастворим в метаноле и этаноле и почти нерастворим в хло-

роформе, бензоле, n-гексане, ацетонитриле, диэтиловом эфире, ацетоне, этилацетате, тетрахлорметане;

б) имеет спектр УФ-поглощения со следующими максимумами поглощения: в 0,1 н. хлористоводородной кислоте  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 49,5$ ), в фосфатном буфере при значении pH 7,4  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 50,0$ ), в 0,1 н. гидроокиси натрия  $\lambda_{\text{макс}}$  297 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 72,1$ );

в) имеет спектр ИК-поглощения в нуйоле со следующими максимумами поглощения: 3700-3100, 2960-2840 (нуйоль), 1645, 1590, 1510, 1460 (нуйоль), 1375 (нуйоль) 1305, 1230, 1180, 1155, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (нуйоль);

г) элементарный анализ пробы, предварительно высушенной при температуре около 140°C в инертной атмосфере (%  $\Delta w = 8,5$ ), показывает следующий приблизительный средний процентный состав, %: C 56,70, H 4,90, N 6,65, Cl 3,80, O (вычислен как остаток до 100%) 27,95;

д) время удерживания ( $t_R$ ) составляет 21,2 мин в случае анализа путем обратнофазной ВТХ с использованием колонки 5 мк Lorbax® ODS и элюированием с помощью линейного градиента, 0 - 50%-ного раствора Б в растворе А в течение 40 мин со скоростью потока 2 мл/мин (внутренний эталон: 3,5-диокситолуол при  $t_R$  8,84 мин);

е) в ДМСО- $d_6$  с добавлением нескольких капель  $D_2O$  с концентрацией 25 мг/0,5 мл (ТМС в качестве внутреннего эталона:  $\delta = 0,00$  ч. на млн получают следующие группы сигналов в ЯМР-спектре 270 МГц  $^1H$ : 0,8-1,5(м); 1,7-2,3 (м.); 2,7-4,0 (м.); 4,0-4,7 (м.); 4,8-5,8 (м.); 6,2-8,1 (м.);

ж) имеет кислотную функцию, способную образовывать соли;

з) имеет солеобразующую основную функцию;

и) молекулярная масса, определенная масс-спектрометрией с использованием скорой атомной бомбардировки (САБ) в качестве источника ионов, составляет около 1875.

Фактор 2 тейхомицина  $A_2$  представляет собой белый аморфный порошок, который после нагревания до 210°C начинает темнеть и разлагается полностью при 250°C. Его характеристика следующая:

а) легко растворим в воде при значении pH выше 7,0 или ниже 2, а также в ДМФ, ДМСО и пропиленгликоле, мало-растворим в метилцеллозольве и глицерине, слабо растворим в метаноле и этаноле и почти нерастворим в хлороформе, бензоле, n-гексане, ацетонитриле, диэтиловом эфире, ацетоне, этилацетате, тетрахлорметане.

б) имеет спектр УФ-поглощения со следующими максимумами поглощения:

в 0,1 н. хлористоводородной кислоте  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 48$ ),

в фосфатном буфере при значении pH 7,4,  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 49,0$ );

в 0,1 н. гидроокиси натрия  $\lambda_{\text{макс}}$  297 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 70,0$ );

в) имеет спектр ИК-поглощения в нуйоле со следующими максимумами поглощения: 3700-3100, 2960-2860 (нуйоль), 1645, 1590, 1510, 1460 (нуйоль), 1375 (нуйоль), 1300, 1260, 1230, 1180, 1150, 1060, 1025, 970, 890, 845, 815, 720 (нуйоль);

г) элементарный анализ пробы, предварительно высушенной при температуре около 140°C в инертной атмосфере (%  $\Delta w = 9,8$ ), показывает следующий приблизительный средний процентный состав, %: C 56,15; H 5,15; N 6,30; Cl 3,90, O (вычислен как остаток до 100%) 28,50;

д) время удерживания ( $t_R$ ) в случае анализа путем обратнофазной ВТХ с использованием колонки 5 мк Lorbax® ODS и элюированием с помощью линейного градиента 0-50%-ного раствора Б в растворе А в течение 40 мин составляет 22,6 мин со скоростью потока 2 мл/мин (внутренний эталон: 3,5-диокситолуол,  $t_R$  8,84 мин);

е) в ДМСО- $d_6$  с добавлением нескольких капель  $D_2O$  с концентрацией 25 мг/0,5 мл (ТМС в качестве внутреннего эталона:  $\delta = 0,00$  ч. на млн получают следующие группы сигналов в ЯМР-спектре 270 МГц  $^1H$ : 0,7-1,5(м); 1,8-2,2 (м.); 2,7-4,5 (м.); 4,6-5,7 (м.); 6,2-8,1 (м.);

ж) имеет кислотную функцию, способную образовывать соли;

з) имеет солеобразующую основную функцию;

и) молекулярная масса, определенная масс-спектрометрией САБ, составляет около 1877.

Фактор 3 тейхомицина  $A_2$  представляет собой белый аморфный порошок, который после нагревания до 205°C

начинает разлагаться с полным разложением при 250°C. Он имеет следующую характеристику:

а) легко растворим в воде при значении pH выше 7,0 или ниже 2, а также в ДМФ, ДМСО и пропиленгликоле, малорастворим в метилцеллозольве и глицерине, слабо растворим в метаноле и этаноле и почти нерастворим в хлороформе, бензоле, п-гексане, ацетонитриле, диэтиловом эфире, ацетоне, этилацетате, тетрахлорметане.

б) имеет спектр УФ-поглощения со следующими максимумами поглощения:

в 0,1 н. хлористоводородной кислоте  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 49,2$ ), в фосфатном буфере при значении pH 7,4,  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 50,8$ ), в 0,1 н. гидроокиси натрия  $\lambda_{\text{макс}}$  297 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 72,7$ );

в) имеет спектр ИК-поглощения в нуйоле со следующими максимумами поглощения: 3700-3100, 2960-2850 (нуйоль), 1645, 1590, 1510, 1460 (нуйоль), 1375 (нуйоль), 1300, 1230, 1180, 1150, 1120, 1060, 1030, 970, 890, 845, 820, 800, 720 (нуйоль);

г) элементарный анализ пробы, предварительно высушенной при температуре около 140°C в инертной атмосфере ( $\Delta w = 12,0$ ), показывает следующий приблизительный средний процентный состав, %: С 56,26; Н 5,20; N 6,69; Cl 3,95, O (вычислен как остаток до 100%) 27,90;

д) время удерживания ( $t_R$ ) в случае анализа путем обратнофазной ВТХ с использованием колонки 5 мк Log-bax® ODS и элюированием с помощью линейного градиента 0 - 50%-ного раствора Б в растворе А в течение 40 мин составляет 23,3 мин со скоростью потока 2 мл/мин (внутренний эталон: 3,5-диокситолуол при  $t_R$  8,84 мин);

е) в ДМСО- $d_6$  с добавлением нескольких капель  $D_2O$  с концентрацией 25 мг/0,5 мл (ТМС в качестве внутреннего эталона  $\delta = 0,00$  ч. на млн) получают следующие группы сигналов в ЯМР-спектре 270 МГц  $^1H$ : 0,7-1,5 (м.); 1,8-2,0 (м.); 2,7-4,5 (м.); 4,6-5,7 (м.); 6,2-8,0 (м.);

ж) имеет кислотную функцию, способную образовывать соли;

з) имеет солеобразующую основную функцию;

и) молекулярная масса, определенная масс-спектрометрией САБ, составляет около 1877.

Фактор 4 тейхомицина  $A_2$  представляет собой белый аморфный порошок, который после нагревания до температуры около 210°C начинает темнеть и разлагается полностью при 250°C. Он имеет следующую характеристику:

а) легко растворим в воде при значении pH выше 7,0 или ниже 2, а также в ДМФ, ДМСО и пропиленгликоле, малорастворим в метилцеллозольве и глицерине; слабо растворим в метаноле и этаноле и почти нерастворим в хлороформе, бензоле, п-гексане, ацетонитриле, диэтиловом эфире, ацетоне, этилацетате, тетрахлорметане;

б) имеет спектр УФ-поглощения со следующими максимумами поглощения:

в 0,1 н. хлористоводородной кислоте  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 52,5$ ),

в фосфатном буфере при значении pH 7,4  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 52,5$ ),

в 0,1 н. гидроокиси натрия  $\lambda_{\text{макс}}$  297 нм ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 75,5$ );

в) имеет спектр ИК-поглощения в нуйоле со следующими максимумами поглощения: 3700-3100, 2960-2840 (нуйоль); 1645, 1590, 1510, 1460 (нуйоль), 1375 (нуйоль), 1300, 1230, 1175, 1140, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815, 720 (нуйоль);

г) элементарный анализ пробы, предварительно высушенной при температуре около 140°C в инертной атмосфере ( $\Delta w = 9,8$ ), показывает следующий приблизительный средний процентный состав, %: С 56,50; Н 5,10; N 6,50; Cl 3,80; O (вычислен как остаток до 100%) 28,10;

д) время удерживания ( $t_R$ ) в случае анализа путем обратнофазной ВТХ с использованием колонки 5 мк Log-bax® ODS и элюирования с помощью линейного градиента 0 - 50%-ного раствора Б в растворе А в течение 40 мин составляет 25,8 мин со скоростью потока 2 мл/мин (внутренний эталон: 3,5-диокси-толуол,  $t_R$  8,84 мин);

е) имеет кислотную функцию, способную к солеобразованию;

ж) имеет солеобразующую основную функцию;

з) молекулярная масса, определенная масс-спектрометрией САБ, составляет около 1891.

Фактор 5 тейхомицина  $A_2$  представляет собой белый аморфный порошок, который после нагревания до 210°C начинает темнеть и полностью разлага-

ется при 250°C. Он имеет следующую характеристику:

а) легко растворим в воде при значении pH выше 7,0 или ниже 2, а также в ДМФ, ДМСО и пропиленгликоле, малорастворим в метилцеллозоле и глицерине, слаборастворим в метаноле и этаноле и почти нерастворим в хлороформе, бензоле, n-гексане, ацетонитриле, диэтиловом эфире, ацетоне, этилацетате и тетрахлорметане;

б) имеет спектр УФ-поглощения со следующими максимумами поглощения:

в 0,1 н. хлористоводородной кислоте  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\%}^{1\text{см}} = 49,6$ ),

в фосфатном буфере при значении pH 7,4  $\lambda_{\text{макс}}$  278 нм ( $E_{1\%}^{1\text{см}} = 51,8$ ),

в 0,1 н. гидроокиси натрия  $\lambda_{\text{макс}}$  297 нм ( $E_{1\%}^{1\text{см}} = 78,8$ );

в) имеет спектр ИК-поглощения в нуйоле со следующими максимумами поглощения: 3700-3100, 2960-2840 (нуйоль), 1645, 1590, 1510, 1460 (нуйоль), 1375 (нуйоль), 1300, 1230, 1175, 1145, 1060, 1025, 970, 890, 840, 815, 720 (нуйоль);

г) элементарный анализ пробы, предварительно высушенной при температуре около 140°C в инертной атмосфере (%  $\Delta w = 10,1$ ), показывает следующий приблизительный средний процентный состав, %: С 56,60, Н 5,05, N 6,63, Cl 3,85, O (вычислен как остаток до 100%) 27,87;

д) время удерживания ( $t_R$ ) в случае анализа путем обратнофазной ВТХ с использованием колонки 5 мк Log-Bax® ODS и элюирования с помощью линейного градиента 0-50%-ного раствора Б в растворе А в течение 40 мин составляет 26,4 мин со скоростью потока 2 мл/мин (внутренний эталон: 3,5-диокситолуол при  $t_R$  8,84 мин);

е) имеет кислотную функцию, способную образовывать соли;

ж) имеет солеобразующую основную функцию;

з) молекулярная масса, определенная масс-спектрометрией САБ, составляет около 1891.

Каждый из факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$  содержит кислотный остаток, способный образовывать соли.

**Пример 2.** Выделение факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$  с применением хроматографической колонки из диэтиламиноэтилсефацеля.

500 мл DEAE-Sephacel (Farmacia Fine Chemicals, Швеция) вливают в

колонку диаметром 4 см и затем уравнивают с применением 50 ммоль аммонийхлоридного буфера при pH 9,0.

На этой колонке хроматографируют

5 1 г комплекса тейхомицина  $A_2$ , растворенного в 50 мл того же буфера, элюируя элюирующей смесью, состоящей из того же буфера, с линейным градиентом 0-1 моль хлористого натрия в общем количестве 5 л. Затем

10 собирают около 20 мл фракций, обрабатывают жидкостной хроматографией под высоким давлением, отдельные

15 фракции, содержащие антибиотики, соединяют и обрабатывают в целях выделения веществ - антибиотиков.

Ниже приведены наивысшие концентрации отдельных факторов, мл. элюированного объема:

20 Тейхомициновый фактор Наивысшая концентрация, мл

	1	2800
25	2	3300
	3	3500
	4	3800
30	5	4000

**Пример 3.** Получение солей факторов 1-5.

35 К солям со щелочными и щелочноземельными металлами относятся соли натрия, калия, лития, кальция и магния. Аммониевые соли включают аммониевые соли и соли первичного, вторичного или третичного алкиламмония  $C_{1-4}$  и оксиалкиламмония  $C_{1-4}$ .

Соли со щелочными и щелочноземельными металлами получают известными способами. Так, факторы тейхомицина  $A_2$  в свободном кислотном виде растворяют в пропиленгликоле с последующим постепенным добавлением к полученному раствору стехиометрического количества выбранного минерального основания, осаждением и фильтрацией.

50 Указанные соли можно также получить практически в безводном виде посредством лиофилизации. В этом случае водные растворы соли, полученные в результате образования солей из свободных кислот с помощью карбонатов или гидроокисей щелочных или щелочноземельных металлов в количествах, обеспечивающих значение pH в

пределах 7-8, отфильтровывают от нерастворимых веществ и лиофилизуют.

Органические аммониевые соли получают добавлением амина к раствору факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$  в свободном кислотном виде, например, в пропиленгликоле с последующим упариванием растворителя и избыточного аминного реагента или взаимодействием двух реагентов в минимальном количестве воды с последующим осаждением полученных солей путем добавления нерастворителя.

Факторы 1-5 тейхомицина  $A_2$  содержат также гидроксидный остаток, за счет которого также могут быть образованы соли путем взаимодействия отдельных факторов в чистом виде с сильной кислотой, предпочтительно минеральной.

**Пример 4.** 0,5 г фактора 1, 2, 3, 4 или 5 тейхомицина  $A_2$  в виде свободной кислоты растворяют в воде (около 50 мл), pH 7,5. Доводят раствор до pH 6,5 10%-ной хлористоводородной кислотой и прибавляют стехиометрическое количество  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (или  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), растворенное в минимальном количестве воды.

Смесь перемешивают при комнатной температуре для облегчения образования осадков, которые собирают фильтрованием, дважды промывают ацетоном (около 600 мл) и сушат всю ночь в вакууме при комнатной температуре.

Получают 0,43 г (85-88%) цинковой или медной соли фактора 1, 2, 3, 4 или 5 тейхомицина  $A_2$ .

**Пример 5.** 0,5 г фактора 1, 2, 3, 4 или 5 тейхомицина  $A_2$  в виде свободной кислоты растворяют в минимальном количестве ацетонитрила. Прибавляют воду (около 50 мл), pH 7,5. Доводят раствор примерно до pH 6,5 10%-ной хлористоводородной кислотой. Прибавляют стехиометрическое количество  $BaCl_2$  (или  $CaCl_2$  или  $MgCl_2$ ), растворенное в минимальном количестве воды.

Смесь перемешивают при комнатной температуре. Полученную соль удаляют прибавлением избытка ацетона (около 500 мл) и фильтрованием полученных осадков, которые дважды промывают ацетоном (около 600 мл) и подвергают продолжающейся всю ночь сушке в вакууме при комнатной температуре.

Получают 0,40 г (84-87%) бариевой (кальциевой или магниевой) соли.

**Пример 6.** 0,5 г фактора 1, 2, 3, 4 или 5 тейхомицина  $A_2$  в виде свободной кислоты растворяют в минимальном количестве ацетонитрила. Потом прибавляют воду (около 50 мл), pH 7,5. Доводят раствор примерно до pH 6,5 10%-ной хлористоводородной кислотой. Прибавляют стехиометрическое количество основания (в виде концентрированного водного раствора для KOH или  $NH_4OH$  или в виде чистого раствора в случае  $NH_2CH_3$ ,  $NH_2C_2H_5$ ,  $NH(CH_3)_2$ ,  $NH(C_2H_5)_2$ ,  $N(CH_3)_3$ ,  $N(C_2H_5)_3$  и т.д.).

Смесь перемешивают при комнатной температуре. Полученную соль удаляют прибавлением избытка ацетона (около 500 мл) и фильтрованием полученных осадков, которые дважды промывают ацетоном (около 600 мл) и сушат в течение ночи в вакууме при комнатной температуре.

Получают 0,45 г (84-90%) соответствующей соли.

**Пример 7.** Получение натриевой соли фактора 2 тейхомицина  $A_2$ .

Водный раствор фактора 2 тейхомицина  $A_2$  (150 мг, 15 мл) путем добавления по каплям 0,1 н. раствора NaOH доводят до pH 8,0. Полученный раствор фильтруют и переносят в камеру системы сублимационной сушки и замораживают. По завершении замораживания камеру эвакуируют до давления 0,1 Торр и лед сублимируют доведением нагревательной плиты до  $0^\circ C$ , продолжая этот процесс до достижения почти сухого состояния продукта (до влагосодержания около 1%). Титрование раствора полученной таким образом натриевой соли фактора 2 тейхомицина  $A_2$  в 25 мл метилцеллозольва/ $H_2O$  (3:1) с 0,1 н. раствором HCl показывает присутствие двух титруемых функций, отличающихся следующими значениями pH: 7,03 и 4,78.

По указанной методике получают соответствующие натриевые соли факторов 1, 3, 4 и 5 тейхомицина  $A_2$ . Определение количества натрия в конечных солях подтверждает образование моонатриевой соли.

Бактериостатическую активность факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$  *in vitro* против грамположительных бактерий определяют на клинических изолятах бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus* с использованием метода двукратного разведения с помощью микро-

титровальной системы, причем для названных групп бактерий используют бульоны Пенассея и Тодда-Хьюитта фирмы Дифко. Выращенные в течение ночи бульонные культуры разбавляют до содержания  $10^3$  млн кл./мл. Минимальной бактериостатической концен-

трацией считается самая низкая концентрация, при которой отсутствует видимый рост после инкубации в течение 18-24 ч при  $37^\circ\text{C}$ .

Полученные результаты приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Бактериостатическое действие *in vitro* факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$ 

Микроорганизм	Испытуемый штамм, №	Фактор тейхомицина $A_2$				
		1	2	3	4	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0,8-1,6	0,8-1,6	0,4-0,8	0,2-0,8	0,2-0,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	0,2-1,6	0,1-1,6	0,2-0,8	0,2-0,8	0,2-0,8
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	0,05-0,1	0,025-0,1	0,025-0,050	0,006-0,05	0,006-0,05
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	0,1-0,2	0,05-0,1	0,05-0,1	0,05-0,1	0,05-0,1
<i>Streptococcus faecalis</i>	5	0,2-0,4	0,1-0,4	0,1-0,2	0,1-0,4	0,1-0,4
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0,025	0,025	0,0125	0,025	0,025
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	0,2	0,2	0,1	0,05	0,05
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
<i>Streptococcus faecalis</i>	1	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1

Бактериостатическую активность отдельных факторов 1-5 определяют методом повторного разведения с помощью агаровых пластинок с использованием бактерий штамма *S. aureus* ATCC 6538 в качестве испытуемого микроба и смеси тейхомицина  $A_2$  в качестве эталона. При этом одинаковые количества отдельных факторов 1-5 тейхомицина  $A_2$  и смеси последнего в качестве эталона растворяют в ДМФ при концентрации 2000 мкг/мл. Полученные растворы подвергают дальнейшему разведению с использованием 0,067 моль фосфатного буфера для установления pH 7,4 и добавлением 1%-ной бычьей сыворотки в целях обеспечения следующих концентраций: 2,5; 5; 10 и 20 мкг/мл. Диски фильтровальной бумаги пропитывают растворами пробы и помещают на определенные расстояния на поверхность

агаровых пластинок, засеянных суспензией испытуемого микроорганизма. Пластины инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18 ч и измеряют диаметры зон ингибирования.

Ниже приведены результаты испытания:

Фактор тейхомицина $A_2$	
1	841 U/мг
2	1086 U/мг
3	1131 U/мг
4	1066 U/мг
5	954 U/мг

Смесь тейхомицина  $A_2$  1000 U/мг

Действие факторов 2, 3, 4 и 5 тейхомицина  $A_2$  испытывали в эксперименте с мышами, зараженными *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*. Для сравнения брали смесь тейхомицина  $A_2$ .

Полученные результаты указанных опытов приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Бактериостатическое действие на мышах

Фактор тейхоми- цина A <sub>2</sub>	ЭД <sub>50</sub> (мг-кг/сут) п/к	
	S. pneumoniae L <sub>44</sub>	S. pyogenes L <sub>49</sub>
2	0,28(0,22-0,34)	0,15(0,13-0,18)
3	0,27(0,23-0,32)	0,13(0,11-0,16)
4	0,12(0,98-0,14)	0,098(0,073-0,11)
5	0,13(0,10-0,15)	0,10(0,098-0,13)
Смесь тейхоми- цина A <sub>2</sub>	0,35(0,28-0,44)	0,18(-)

Приблизительная острая токсичность на мышах (внутрибрюшинно) для факторов 1-5 тейхомицина A<sub>2</sub> приведена в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Острая токсичность на мышах (внутрибрюшинно)

Фактор тейхоми- цина A <sub>2</sub>	Примерная ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	
1	>1500	<2000
2	>1500	<2000
3	>1000	<1500
4	>500	<1000
5	>500	<1000

Из табл. 4 следует, что факторы 1-5 тейхомицина A<sub>2</sub> пригодны для применения в качестве действующего начала в противомикробных препаратах в медицине и ветеринарии для предупреждения и лечения инфекционных заболеваний, вызванных патогенными бактериями, чувствительными к названным соединениям. Предлагаемые соединения можно использовать для лечения инфекционных заболеваний как таковые, т.е. как отдельные факторы или ввиду сходства их характеристик активности и в виде смеси двух или более факторов в любом соотношении.

Соединения вводят orally, местно или парентерально, предпочтительно парентерально. В зависимости от способа применения соединения его

готовят в различных лекарственных формах. Для орального введения препараты могут представлять собой кап-

- сулы, таблетки, жидкие растворы или суспензии. Как известно, капсулы и таблетки кроме действующего начала могут содержать еще обычные инертные наполнители (носители), такие как разбавители, например лактоза, фосфат кальция, сорбит и др., смазки, например стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль, связующие, например поливинилпирролидон, желатин, сорбит, трагант, камедь, ароматизирующие вещества, средства, способствующие разложению препарата и смазыватели. Жидкие препараты обычно в виде водных или масляных растворов или суспензий могут содержать обычные добавки, например вещества, содействующие взвешиванию. Для местного применения соединения можно приготовить в виде препаратов для введения через слизистые оболочки носа и горла или бронхиальные ткани, обычно в виде жидких аэрозолей или средств для ингаляции, лепешек или тинктур, наносимых на поверхность горла. Для лечения глаз или ушей можно использовать жидкие или полужидкие препараты. Препараты для местного применения можно приготовить на гидрофобной или гидрофильной основе в виде мазей, кремов, лосьонов, тинктур или порошков, вводимые составы - в виде суспензий, растворов или эмульсий на основе масляных или водных носителей, содержащих вещества, способствующие



взвешиванию, стабилизаторы и/или диспергаторы. Кроме того, действующее начало может быть приготовлено в виде порошка в целях его воспроизводства во время поставки с пригодным носителем, например, стерильной водой.

Количество применяемого действующего начала зависит от различных факторов, например роста и состояния здоровья пациента (животного), способа и частоты применения препарата и причины заболевания. Как правило, факторы 1-5 тейхомицина  $A_2$  являются эффективными при суточной дозировке в пределах около 0,1-20 мг действующего начала на кг веса, причем эта доза может быть разделена на два приема в день. Целесообразны составы, приготовленные в виде дозирочных единиц с содержанием около 50-250 мг действующего начала на единицу.

Примеры фармацевтических составов: раствор для парентерального введения из 100 мг натриевой соли фактора 2 тейхомицина  $A_2$ , растворенной в 2 мл стерильной воды для впрыскивания; раствор для парентерального введения из 250 мг натриевой соли фактора 3 тейхомицина  $A_2$ , растворенной в 3 мл стерильной воды для впрыскивания; мазь для местного нанесения из 200 мг фактора 2 тейхомицина  $A_2$ , 600 мг полиэтиленгликоля 4000 U.S.P., 1,2 г полиэтиленгликоля 400 U.S.P.

Наряду с применением в виде лекарств предлагаемые соединения можно использовать и как промоторы роста животных. С этой цели одно или несколько соединений вводят орально

с кормом. При этом выбирается такая концентрация соединений, которая является эффективной для промотирования роста животных. При этом сначала готовят смесь части корма с эффективным количеством действующих соединений, которую затем добавляют к полной порции корма, или с кормом смешивают промежуточный концентрат, содержащий действующее начало.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения факторов 1,2, 3,4,5 тейхомицина  $A_2$  и их солей, заключающийся в том, что тейхомицин, полученный путем культивирования штамма *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121, переводят в раствор, подвергают его обратнофазной хроматографии на колонке, содержащей силанированный силикагель, элюируют с помощью линейного градиента от 10 до 20% ацетонитрила в 0,2%-ном растворе аммонийформата, полученные фракции сходного профиля объединяют, концентрируют, осаждают целевые продукты и/или переводят в соли.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, с целью дополнительного разделения факторов 2, 3, 4, 5 тейхомицина  $A_2$ , смесь факторов 2, 3, 4 и 5 подвергают обратнофазной хроматографии на колонке, содержащей октадецилсилан, элюируют смесью ацетонитрила и 0,2%-ного водного аммонийформата в соотношении 24:76 с последующим обессоливанием фракций и осадением целевых продуктов.

Составитель Г.Смирнова

Редактор К.Воложук

Техред М.Моргентал

Корректор И.Муска

Заказ 2441/58

Тираж 499

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4

