



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 59343

(13) C2

(51) 7 C07D503/18, C12N1/02//C12P17/18

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТА/АБО ОЧИЩЕННЯ КЛАВУЛАНОВОЇ КИСЛОТИ АБО ФАРМАЦЕВТИЧНО ПРИЙНЯТОЇ СОЛІ АБО ЇЇ ЕСТЕРУ**

1

(21) 98020991
(22) 27 08 1996
(24) 15 09 2003
(86) PCT/GB96/02083, 27 08 1996
(31) P-9500265
(32) 28 08 1995
(33) SI
(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.
(72) Цапудер Елді, SI
(73) ЛЕК. ФАРМАСУТИКАЛ ЕНД КЕМІКАЛ КО Д Д, SI
(56) US 4886602, 12 12 1989
GB 1508977, 26 04 1978
EP 0182522, 28 05 1986
EP 0391590, 10 10 1990
WO 9511295, 27 04 1995
(57) 1. Спосіб отримання та/або очищення клавуланової кислоти або її фармацевтично придатної солі чи естеру, що включає видалення твердих речовин з ферментаційного середовища, що містить клавуланову кислоту, мікрофільтруванням з одержанням першого фільтрату, що має рН 5,8-6,2, подальшого видалення твердих речовин з першого фільтрату ультрафільтруванням з утворенням другого фільтрату, концентрування другого фільтрату - видаленням води та обробку концентрованого другого фільтрату з виділенням клаву-

2

ланової кислоти або її фармацевтично придатної солі чи естеру, який відрізняється тим, що перший фільтрат фільтрують, з використанням мембрани для ультрафільтрації, яка має здатність до розділення за молекулярною масою від 10 до 30 кДа, та здатністю пропускання від 10 до 30 л/м² • год.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що ультрафільтрування проводять як безперервну операцію.

3. Спосіб за п. 2, який відрізняється тим, що безперервне ультрафільтрування проводять з використанням двоступінчастого пристрою.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється тим, що мембрана для ультрафільтрування включає полісульфон.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який відрізняється тим, що здатність пропускання мембрани складає 12 л/м² • год.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який відрізняється тим, що здатність до розділення за молекулярною масою мембрани складає 20 кДа.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який відрізняється тим, що зменшують кількість забруднень, що поглинають світло довжиною хвилі біля 420 нм.

Винахід відноситься до способу отримання та/або очистки клавуланової кислоти або її фармацевтично придатної солі чи естеру, у тому числі, але не виключно, солей лужних металів, особливо клавуланату калію.

Клавуланова кислота - загальноприйнята назва (2R, 5 R, Z)-30(2-гідроксипіліден)-7-оксо-4-окса-1-азабіцикло(3,2,0)гептан-2-карбонової кислоти. Клавуланова кислота та її солі лужних металів та естери активні як інгібітори бета-лактамази, яку виробляють як грам-негативні, так і грам-позитивні мікроорганізми. Крім інгібування бета-лактамази, клавуланова кислота та її солі лужних металів також виявляють синергічну дію з пеніциліновими та цефалоспориновими антибіотиками.

Клавуланову кислоту та її солі використовують у фармацевтичних препаратах для попередження деактивації бета-лактамних антибіотиків. Препарати, що є у продажу, містять клавуланат калію у сполученні з трипдратом амоксициліну. Клавуланат калію стабільніший за вільну кислоту та інші солі.

Клавуланову кислоту одержують ферментацією таких мікроорганізмів, як штами *Streptomyces*, наприклад, *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. Jomoninensis* NRRL 5741, *S. Katsurahumanus* IFO 13716 та *Streptomyces* sp. P 6621 FERM P 2804. Отриману після ферментації водну культуру очищують та концентрують звичайними способами, наприклад, фільтрацією та хроматографічною очисткою, як це розкрито у GB 1508977, до того, як

(13) C2

(11) 59343

(19) UA

її екстрагують з водного розчину органічним розчинником для отримання розчину забрудненої клавуланової кислоти у розчиннику

У GB 1508977 розкрито виготовлення клавуланату фільтруванням ферментаційного середовища пропусканням його через аніонообмінну смолу. Цей спосіб забезпечує сприятливий вихід, але потребує складної очистки хроматографічними способами, а використання колонки зі смолою потребує значних капіталовкладень, що обмежує випуск товарних партій продукту

У GB 1543563 розкрито ферментаційний спосіб, в якому величину pH середовища підтримують у межах 6,3-6,7. Такі фармацевтичне придатні солі клавуланової кислоти, як клавуланат калію виготовляють з клавуланату літій реакцією обміну

EP-A-0026044 ілюструє використання трет-бутиламінової солі клавуланової кислоти як інтермедіата при очищенні клавуланової кислоти. Ця сіль відома з BE-862211 або DE-2733230, в яких показано, що ця сіль навіть більш стійка, ніж клавуланати натрію чи калію. Трет-бутиламін - токсична сполука, яку теж важко видаляти з відпрацьованої води, що викликає серйозні турботи відносно забруднення довкілля

У EP-A-0562583 розкрито використання клавуланатів таких N, N' - монозаміщених симетричних етилендіамінів, як диклавуланат N, N' - діізопропілетилендіамонію, в якості корисного інтермедіату при виділенні та одержанні чистої клавуланової кислоти та її солей лужних металів з екстракту в етилацетаті

Звичайно відфільтроване ферментаційне середовище, що містить клавуланову кислоту, може бути забрудненим 10-20% білків у перерахунок на клавуланову кислоту. Ці білки перешкоджають у наступних операціях виділенню та очищенню клавуланової кислоти. Обробка відфільтрованого ферментаційного середовища іонообмінною смолою або флокулянтном потребує часу, призводить до великих витрат і може посилити розкладання нестійкого продукту

Відоме також технічне рішення, яке описано у пат США 4 886 602, публ. 12.12.89. Спосіб, який описаний у цьому технічному рішенні, включає видалення твердих часток з ферментаційного середовища, що містить клавуланову кислоту, мікрофільтруванням з одержанням першого фільтрату, подальше видалення твердих часток з першого фільтрату ультрафільтруванням з одержанням другого фільтрату, концентрування другого фільтрату видаленням води та обробку концентрованої другого фільтрату для виділення клавуланової кислоти або її фармацевтично придатних солі чи естеру

Однак цей спосіб також не може забезпечити ефективного відокремлення клавуланової кислоти

Задачею винаходу є розробка такого способу очистки та/або одержання клавуланової кислоти або її фармацевтично придатних солі чи естеру, в якому використовуються такі операції, з такими параметрами і з таким чергуванням цих операцій, що дозволяють забезпечити підвищення ефективності відокремлення клавуланової кислоти

Поставлена задача вирішується тим, що у способі очистки та/або одержання клавуланової

кислоти або її фармацевтично придатних солі чи естеру, що включає видалення твердих часток з ферментаційного середовища, що містить клавуланову кислоту, мікрофільтруванням з одержанням першого фільтрату, подальше видалення твердих часток з першого фільтрату ультрафільтруванням з одержанням другого фільтрату, концентрування другого фільтрату видаленням води та обробку концентрованої другого фільтрату для виділення клавуланової кислоти або її фармацевтично придатних солі чи естеру, згідно з винаходом, перший фільтрат відфільтровують, використовуючи ультрафільтруючу мембрану з розділюючою здатністю від 10 до 30 кДа та швидкістю пропускання від 10 до 30 л/м² год

Рекомендовано, щоб величина pH першого фільтрату перед ультрафільтруванням знаходилася у межах 5,8-6,2

Можливо, ультрафільтрування проводити як безперервну операцію

Доцільно, безперервне ультрафільтрування проводити з використанням двоступінчастого пристрою

Найбільш доцільно, щоб мембрана для ультрафільтрування включала полісульфон

Бажано, щоб швидкість пропускання фільтрату складала 12 л/м² год. Пропонується, щоб розділююча здатність мембрани 20 кДа

Необхідно, щоб спосіб включав операцію зменшення кількості забруднень, що попинаять світло довжиною хвилі біля 420 нм

Задача вирішується також тим, що у способі очистки та/або одержання клавуланової кислоти або її фармацевтично придатних солі чи естеру, згідно з винаходом, характеризувався операцією зменшення кількості забруднень, що попинаять світло довжиною хвилі 420 нм

Використання ультрафільтрування згідно з винаходом дозволяє отримати практично чистий розчин клавуланової кислоти без необхідності утворення проміжних солей амінів чи діамонієвих перед їх перетворенням у клавуланат калію. Крім того, другий фільтрат можна концентрувати за допомогою зворотного осмосу без засмічення та утворення небажаного шару гелю на поверхні мембрани для зворотного осмосу. Швидкість пропускання крізь чарунку зворотного осмосу може бути підвищено і попереджено потребу у частому очищенні

При здійсненні винаходу було виявлено підвищення ефективності відокремлення клавуланової кислоти, а іншою перевагою є те, що другий фільтрат практично обезбарвлюється після операції ультрафільтрування

Мікрофільтрування середовища може бути проведено, як розкрито у WO 95/23870. У кращому способі згідно з цим розкриттям водне ферментаційне середовище, що містить сиру клавуланову кислоту, міцелій, білки та інші суспендовані тверді матеріали, очищають мікрофільтруванням при pH між 5,8 та 6,2 і температурі 20-40°C

У подальшу обробку другого фільтрату бажано включати концентрування зворотним осмосом. Фільтрат можна концентрувати до 1/5 початкового об'єму з одержанням концентрованої водної клавуланової кислоти, яку можна екстрагувати серією

протитечійних центрифужних екстрагувань розчинником, що не змішується з водою, краще етилацетатом, як описано, наприклад, у WO 95/23870

Екстрагування краще проводити при температурі 15-25°C та pH 1-3. Далі екстракт сушать до зниження вмісту води нижче 0,1% за об'ємом, потім концентрують випаровуванням і при необхідності обезбарвлюють активованим вугіллям

Клавуланова кислота у екстракті може взаємодіяти з амінами чи діамінами до відокремлення клавуланатів амонія чи діамонія та перетворення останніх у фармацевтичне придатну сіль або естер. З іншого боку, концентрат може взаємодіяти безпосередньо зі сполукою металу з утворенням фармацевтичне придатної солі, наприклад, калію

Сполука металу може бути органічною сіллю, карбонатом, гідрокарбонатом чи гідроксидом калію, натрію, літію чи магнію. Краще використовувати сіль карбонової кислоти. З точки зору відносної стабільності краще використовувати сіль калію

Карбонову кислоту можна вибрати з оцтової, пропійнової, гексанової, бензойної, заміщеної чи ні одним чи більше C₁-C₁₀алкілами, краще C₁-C₆алкілами, галогенами, нітрогрупами, O, S або NH-заміщеними гетероалкілами, C₁-C₁₀алкілами, заміщеними групами R, OR, SR, або NR₁R₂, де R, R₁ та R₂ незалежно один від одного C₁-C₁₀алкіл

Кращими сполуками металу є 2-етилгексаноат, ацетат калію, 2-етилгексаноат, ацетат літію

Можна додавати додатковий розчинник, що включає C₁-C₁₀спирти або їх суміші. Краще використовувати C₁-C₄спирти. Найкращими додатковими розчинниками є метанол, етанол, ізопропанол, ізобутанол та їх суміші. Особливо бажано використовувати ізопропанол. Краще, щоб ці розчинники були сухими з вмістом води, наприклад, 0-4%. Сполуку металу можна розчинити у додатковому розчиннику раніше додавання до клавуланового екстракту. З іншого боку, сполуку металу можна розчинити у тому ж розчиннику, що і екстракт клавуланової кислоти, наприклад етилацетат, а додатковий розчинник додати окремо. Особливо сприятливі результати було отримано при розчиненні 2-етилгексаноату калію у ізопропанолі, ацетату калію у метанолі або бензоату калію у метанолі. Краще, коли концентрація 2-етилгексаноату калію у ізопропанолі 0,1-5моль/л, сприятливіше - 1-2,5моль/л, а найкраще - 1,5-2моль/л у 5-5 молярному надлишку основи по відношенню до клавуланової кислоти, краще у 5-25% молярному надлишку

Для екстрагування фільтрату ферментаційного середовища використовують розчинники, що не змішуються з водою, які краще вибирати з етилацетату, метилацетату, пропілацетату, н-бутилаце-

тату, таких кетонів, як метилетилкетон, таких спиртів, як н-бутиловий, н-аміловий, такі галогеновані розчинники, як метипенхлорид, хлороформ або такі етери, як діетилловий, чи гексан або їх суміші. Краще використовувати етилацетат. Концентрат можна очистити активованим вугіллям, а при необхідності - на колонці з силікагелем

Концентрація сирої клавуланової кислоти у сухому концентрованому екстракті у такому розчиннику, що не змішується з водою, як етилацетат, може бути у межах 8-40г/л, краще - 20-40г/л

Клавуланатний концентрат, краще у етилацетаті, можна обезбарвити додаванням активованого вугілля. Звичайна кількість, як було встановлено, активованого вугілля - 0,2-0,5г на грам клавуланової кислоти, але при бажанні можна взяти іншу кількість

Винахід ілюстровано прикладом, але не обмежено ним

Приклад 1

Використовують відфільтроване водне середовище, отримане ферментуванням *Streptomyces* sp P 8621 FERM P 2804 та мікрофільтруванням, як описано у WO 95/23870. Мікрофільтрат з вмістом клавуланової кислоти 3,5г/л, білків - 0,58г/л, а прозорість при 420нм (після розведення водою 1:2) - 27,9%, безперервно додавали у двоступінчастий пристрій для фільтрування типу 2NUF2000, виготовлений IMP Promont Ljubljana, Slovenia. Два ультрафільтрувальних промивних модуля типу GR62-3833/47P, зроблені Filmtech (дочірня від Dow Chemical Co), що мають два контури з загальною площею мембрани 194,4м². Пристрій було настроєно так, щоб ультрафільтрувальні модулі можна було підключати паралельно або послідовно. Розділяюча здатність мембрани 20кДа. Середовище, що фільтрували, мало температуру 35°C, pH 5,8-6,2 та швидкість пропускання 12л/м² год. Тиск на мембрану складав 5 Бар, а різниця тиску між концентратом та фільтратом - 1,4 Бар. Рідкі фази було отримано у першій операції ультрафільтрування зі швидкістю 1600л/год для фільтрату та 400л/год для концентрату. Концентрат після першої операції ультрафільтрування використовували у другій операції ультрафільтрування і промивали демінералізованою водою зі швидкістю 800л/год. Для фільтрату у другій операції ультрафільтрування швидкість складала 800л/год. Його було перенесено з фільтратом з першого контуру у пристрій для зворотного осмосу

Фільтрат, що містить клавуланову кислоту було отримано зі швидкістю 2400л/год при вмісті білків 0,11г/л. Прозорість (420нм) була 45,1%, а вихід, розрахований по аналізу на клавуланову кислоту, - 95%