

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMANIA



(11) Nr. brevet: 114896 B1
(51) Int.Cl.⁶ C 07 H 15/238;

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 96-00061

(22) Data de depozit: 11.01.1996

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.08.1999 BOPI nr. 8/1999

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Chemical Abstracts 82/1975-156634 P;
80/1974-83506 v; 90/1979-119687 c

(71) Solicitant: VLASE CRISTINA-VICTORINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEAN ION, IAȘI, RO;

(73) Titular: VLASE CRISTINA-VICTORINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEAN ION, IAȘI, RO;

(72) Inventatori: VLASE CRISTINA-VICTORINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEANU ION, IAȘI, RO;

(74) Mandatar:

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A DIHIDROSTREPTOMICINEI DE UZ FARMACEUTIC

(57) **Rezumat:** Invenția prezintă un procedeu de obținere, izolare și purificare a dihidro-streptomicinei de uz farmaceutic, prin reducerea streptomicinei în soluție apoasă cu boro-

hidruri alcaline, urmată de izolarea și purificarea produsului, utilizând rășini schimbătoare de ioni și/sau procedee de precipitare selectivă.

Revendicări: 4

RO 114896 B1





(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-00061**

(22) Data de depozit: **11.01.1996**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.08.1999 BOPI nr. **8/1999**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Chemical Abstracts 82/1975-156634 P;
80/1974-83506 v; 90/1979-119687 c

(71) Solicitant: **VLASE CRISTINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEAN ION, IAȘI, RO;**

(73) Titular: **VLASE CRISTINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEAN ION, IAȘI, RO;**

(72) Inventatori: **VLASE CRISTINA, IAȘI, RO; DIACONU EUGEN, IAȘI, RO; COJOCARU MINODOR, IAȘI, RO; MUNTEANU VENIAMIN, IAȘI, RO; MOLDOVEANU ION, IAȘI, RO;**

(74) Mandatar:

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A DIHIDROSTREPTOMICINEI DE UZ FARMACEUTIC**

(57) **Rezumat:** Invenția prezintă un procedeu de obținere, izolare și purificare a dihidro-streptomicinei de uz farmaceutic, prin reducerea streptomicinei în soluție apoasă cu boro-

hidruri alcaline, urmată de izolarea și purificarea produsului, utilizând rășini schimbătoare de ioni și/sau procedee de precipitare selectivă.

Revendicări: 4

RO 114896 B1



Invenția se referă la un procedeu de obținere a dihidrostreptomicinei, de uz farmaceutic.

Se cunosc procedee de obținere a dihidrostreptomicinei, prin reducerea grupării aldehydice din molecula streptomicinei cu hidrogen molecular la presiune, în prezență de catalizatori ca: Pd, Pt, Ni (J. Am. Chem. Soc. 68, 69), cu diverși agenți reducători, cum ar fi: borohidruuri ale metalelor alcaline/Med. Prom SSSR 11-16, J. Am. Chem. Soc. 76-5162/, amalgam de aluminiu//CA 47-8973, 50-4204/, precum și prin diverse procedee electrolitice (CA 48-3643, CA 49-15573/.

Procedeele de obținere a dihidrostreptomicinei, prin reducerea streptomicinei cu borohidruuri alcaline, constau în tratarea soluțiilor apoase de streptomicină la pH 6,5 ... 8 cu cantități variabile de borohidruură de sodiu ca soluție în apă, la temperatura camerei.

Dihidrostreptomicina se izolează din soluțiile corespunzătoare prin acidulare și precipitare cu metanol / J. Am. Chem. Soc. 76-5162/.

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că produsul astfel obținut are un conținut de peste 1% streptomicină neredusă și utilizează un exces mare de borohidruuri alcaline; de asemenea, dihidrostreptomicina izolată prin precipitare cu metanol sau alt nesolvent este impurificată cu săruri și/sau acid boric și nu poate fi utilizată la prepararea unor forme farmaceutice, în conformitate cu Farmacopeele internaționale. Astfel, Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Germană prevăd ca dihidrostreptomicina utilizată farmaceutic să aibă un conținut de streptomicină și de săruri (exprimate ca cenușă sulfat) mai mici de 1%.

Procedeu conform invenției înlătură aceste dezavantaje, prin aceea că streptomicina se reduce din soluție apoasă, cu borohidruuri alcaline adăugate în stare solidă, la temperaturi de 35 ... 55°C, într-un raport molar borohidruuri: streptomicină de 1 ... 1,3:1, după care masa de reacție se acidulează cu acizi minerali sau organici până la pH = 1,5 ... 4, se purifică prin precipitare cu alcoolii, se demineralizează pe schimbători de ioni și se usucă prin liofilizare sau atomizare.

Aplicarea invenției prezintă următoarele avantaje:

- procedeu conform invenției asigură randamente mari și calitate corespunzătoare condițiilor impuse de Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Germană, conținut în streptomicină < 1%, impurități anorganice lipsă;
- este ușor de aplicat industrial.

Corelarea parametrilor de reacție se face astfel încât să se obțină dihidrostreptomicină cu conținut în streptomicină neredusă sub 1% și prin utilizarea unor variante de izolare-purificare adecvate - a unui produs cu cenușă sulfat sub 1%, utilizabil farmaceutic. Prin procedeu conform invenției, reducerea streptomicinei cu borohidruuri alcaline se realizează prin adăugarea, în porțiuni, a borohidruurii de sodiu sau potasiu solide peste soluția de streptomicină, menținând temperatura de reacție la 35 ... 55°C, ceea ce permite o conversie practic totală a streptomicinei la dihidrostreptomicină și evită consumul inutil de borohidruură prin reacția acesteia cu apa și degajarea de hidrogen în timpul preparării soluțiilor de borohidruură.

Pentru purificarea dihidrostreptomicinei de sărurile rezultate din reacție, procedeu conform invenției utilizează 4 variante distincte, care necesită instalații și utilaje diferite.

Astfel, în prima variantă, mediul de reacție obținut în urma reducerii se tratează cu acizi minerali sau organici (acid acetic, acid formic) până la pH 1,5 ... 4, când se produce transformarea boraților rezultați din reacție în acid boric și sărurile corespunzătoare acizilor utilizați și precipitarea selectivă a dihidro-streptomicinei cu metanol sau etanol. 50

Produsul preicipitat conține încă o cantitate de săruri, ce pot fi îndepărtate prin utilizarea unor rășini schimbătoare de ioni : cationiți și anioniți sau paturi mixte de cationit - anionit. În altă variantă, eliminarea sărurilor se face prin tratarea mediului de reacție obținut în urma hidrogenării cu rășini cationice puternic acide, cum ar fi Amberlit IR-120, IR-124, Vionit etc. 55

Ca urmare a trecerii soluției peste masa de cationit, se produce concomitent reținerea cationilor și eliberarea acidului boric, datorită scăderii pH-ului în domeniul 1,5 ... 4. Acidul boric se poate elimina prin precipitarea cu metanol sau etanol a dihidrostreptomicinei, deoarece este solubil în amestecul apă-alcool. Produsul precipitat are conținut în streptomicină sub 1% și este lipsit practic de impurități anorganice (cenușă sulfat $\leq 0,3\%$). 60 65

O altă variantă de purificare prin procedeul conform invenției constă în tratarea soluției demineralizate parțial cu cationit cu soluție de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, astfel încât acidul boric rezultat să se transforme în $\text{Ba}(\text{BO}_2)_2$ insolubil în apă și care se îndepărtează prin simpla filtrare.

Dihidrostreptomicina rămasă în soluție poate fi izolată prin precipitare, atomizare sau liofilizare, fiind utilizabilă farmaceutic fără alte purificări. 70

O altă posibilitate de purificare de săruri constă în utilizarea succesivă a unei rășini cationice, urmată de trecerea pe 2 filtre cu anionit slab bazic și, respectiv, puternic bazic.

În acest mod se obține o soluție de dihidrostreptomicină bază lipsită de săruri și acid boric, ce se poate izola ca sulfat după corectarea pH-ului cu H_2SO_4 prin oricare din procedeele descrise anterior (cristalizare, atomizare, liofilizare). 75

Se prezintă în continuare șapte exemple de realizare a procedeului conform invenției.

Exemplul 1. 250 ml soluție de streptomicină cu concentrație de 200000 u.i./ml se încălzesc în balonul de reacție la 35°C , se adaugă 3,6 g NaBH_4 în porțiuni, în decurs de 40 min, astfel încât temperatura să nu depășească 50°C . Reacția se perfectează 30 min la $35 \dots 40^\circ\text{C}$, apoi masa de reacție se răcește la 20°C și se acidulează cu 4,5 l acid acetic până la pH 4 ... 4,5. 80

Soluția obținută se adaugă peste 4 volume metanol și se filtrează. Precipitatul se resuspendă în 200 ml apă desalinată și se distilează la vid metanolul. Soluția concentrată se trece pe un filtru mixt de schimbători de ioni (Amberlit IR-124 și Amberlit IRA-68) sau 2 filtre înseriate, primul conținând cationit și al doilea conținând anionit, se corectează pH-ul la 5,5 ... 6,0 cu soluție H_2SO_4 , se adaugă cărbune demineralizat și apoi de brom, și suspensia se agită 30 min la temperatura camerei. Se filtrează cărbunele, se spală pe filtru cu apă desalinată și soluția obținută se usucă prin atomizare sau liofilizare. 85 90

Se obțin cca 50 g dihidrostreptomicină sulfat cu următorii parametri:

- conținut în streptomicină neredusă: 0,85%
- cenușă sulfat: 0,8%
- metanol: 0,04%
- activitate microbiologică: 760 u.i./mg.

Exemplul 2. 30 g sulfat de streptomicină se dizolvă în 100 ml apă 95

RO 114896 B1

100 desalinată și soluția se încălzește la 40°C. Se adaugă în porțiuni, sub agitare intensă, în decurs de 30 ... 60 min. la 1,8 g NaBH₄, menținând temperatura la valorile sus-menționate. După terminarea adăugării agentului de reducere, masa de reacție se mai agită 30 min la 45 ... 50°C, după care se răcește și soluția se trece printr-un filtru conținând 30 ml Amberlit IR-124.

După trecerea soluției pe coloană, se spală rășina cu apă desalinată.
105 Soluția omogenizată se tratează cu cărbune demineralizat, se agită 15 ... 30 min pentru decolorare și se filtrează. Filtratul se adaugă peste 4 volume de metanol și suspensia obținută se filtrează.

Precipitatul obținut prin filtrare se usucă la vid la 50 ... 55°C, se obțin 28 ... 30 g sulfat de dihidrostreptomicină cu următoarele caracteristici:

- 110
- streptomicină neredusă: 0,6%
 - cenușă sulfat: 0,05%
 - activitate microbiologică: 780 μ/mg
 - metanol: 0,5%

Exemplul 3. Se procedează ca în exemplul 2, cu deosebirea că la 115 reducere se utilizează concentrat nedecolorat de streptomicină, cu activitate de 200000 ... 250000 u/ml (de pe fluxul tehnologic de obținere a streptomicinei).

După purificare pe cationit, se corectează pH-ul cu Ba(OH)₂ până la pH 5,5. Se adaugă 5 g cărbune demineralizat și se filtrează. Filtratul se adaugă peste 4 volume metanol și suspensia obținută se lasă în repaus 2 h la 120 temperatura camerei, apoi se filtrează.

Precipitatul umed se suspendă în 100 ml apă desalinată și se distilează la 40°C la vid metanolul până la concentrație de 200 ... 250 g/l dihidro-streptomicină.

Soluția se răcește, se tratează cu cărbune și apă de brom, se agită 15 125 ... 30 min și se filtrează. Filtratul se supune atomizării sau liofilizării, sau precipitării. Se obțin cca 25 ... 26 g dihidrostreptomicină având conținut în streptomicină de 0,6 ... 0,7% și cenușă sulfat de 0 ... 0,3%.

Exemplul 4. 100 ml concentrat nedecolorat de streptomicină, cu acti- 130 vitate de cca 250000 u/ml, se tratează cu 2,15 g NaBH₄ solidă, adăugată în porțiuni timp de 45 min, la temperaturi de 50 ... 55°C.

După terminarea adăugării borohidruirii, se perfectează reacția 15 ... 20 min la aceeași temperatură, apoi se răcește la temperatura camerei.

Soluția se purifică prin trecere pe un filtru conținând un cationit puternic acid (tip gel). Soluția obținută după purificare se adaugă peste 3,8 volume 135 metanol și se filtrează.

Precipitatul se suspendă în 100 ml apă și se corectează pH-ul cu soluție Ba(OH)₂ până la pH 5,5, după care se îndepărtează la vid metanolul, apoi se filtrează.

140 În continuare, dihidrostreptomicina se izolează după cum a fost descris în exemplul 3.

Exemplul 5. Se tratează o soluție conținând 30 g streptomicină bază cu 3,6 g NaBH₄ la 45°C. Borohidruirea se adaugă în porțiuni în decurs de minimum 30 min, după care masa de reacție se mai agită 30 min. Soluția obținută se trece printr-un filtru cu cationit puternic acid, de preferință Amberlit IR-124, după care, la soluția colectată se adaugă soluție de Ba(OH)₂ până la pH 145 6 ... 6,5.

Se adaugă cărbune demineralizat și apă de brom și se filtrează.

Din soluție se izolează dihidrostreptomicină de calitate farmaceutică, prin atomizare sau liofilizare.

Se obțin 30 ... 32 g dihidrostreptomicină sulfat cu conținut în streptomicină de 0,5 ... 0,6% și cenușă sulfat de 0,7 ... 0,8%. 150

Exemplul 6. Se procedează ca în exemplul 5, cu diferența că soluția eliberată de cationi se aduce cu $\text{Ba}(\text{OH})_2$ la pH 8,5 ... 8,7, se adaugă cărbune demineralizat, se filtrează, se recorectează pH-ul la valoarea 5,5 ... 6,5 cu H_2SO_4 , după care se izolează produsul prin atomizare sau liofilizare. 155

Exemplul 7. Se procedează ca în exemplul 5, cu deosebirea că, după îndepărtarea cationilor se trece soluție pe două filtre înseriate conținând anionit slab acid și, respectiv, puternic acid (cum ar fi: Vionit AS-14 și Vionit AT-14).

După colectarea soluției purificate și spălarea filtrelor, soluția omogenizată se tratează cu cărbune demineralizat și apă de brom și se izolează dihidrostreptomicina prin precipitare, atomizare sau liofilizare. 160

Se obține dihidrostreptomicină de calitate farmaceutică.

În toate exemplele descrise se pot utiliza și soluții de streptomicină din alte faze ale procesului tehnologic de obținere a streptomicinei (soluții native, eluate nedemineralizate etc.). 165

Revendicări

1. Procedeu de obținere a dihidrostreptomicinei de uz farmaceutic, **caracterizat prin aceea că**, streptomicina se reduce din soluție apoasă, cu borohidruri alcaline adăugate în stare solidă, la temperaturi de 35 ... 55°C, într-un raport molar borohidruri : streptomicină de 1 ... 1,3:1, după care masa de reacție se acidulează cu acizi minerali sau organici până la pH = 1,5 ... 4, se purifică prin precipitare cu alcooli, se demineralizează pe schimbători de ioni și se usucă prin liofilizare sau atomizare. 170

2. Procedeu de obținere a dihidrostreptomicinei de uz farmaceutic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, masa de reacție se purifică de cationi cu rășini schimbătoare de ioni, de tip cationiți acizi, după care dihidrostreptomicina se precipită cu metanol, etanol sau amestecuri ale acestora. 180

3. Procedeu de obținere a dihidrostreptomicinei de uz farmaceutic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, masa de reacție se purifică de cationi cu rășini schimbătoare de ioni, după care se corectează pH-ul cu $\text{Ba}(\text{OH})_2$, se filtrează pentru îndepărtarea sulfatului de bariu și boratului de bariu și se izolează produsul prin precipitare, atomizare și liofilizare. 185

4. Procedeu de obținere a dihidrostreptomicinei de uz farmaceutic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, masa de reacție se purifică pe schimbători de ioni prin trecerea succesivă pe coloane înseriate, umplute, în ordine, cu cationit puternic acid, anionit slab bazic, anionit puternic bazic, după care, din soluția purificată se izolează dihidrostreptomicina prin cristalizare, atomizare sau liofilizare. 190

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. Petrea Dana-Maria**

