

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 844801 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **844801**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07K 9/00
C12P 19/00**

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date **05.12.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **05.12.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.06.1985**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

12.12.1983 US 560,300

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Yang, Kuo Shang, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Abel, Ronald Gene, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Higgins, Jr., Harvey M., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Parannus vankomysiinin puhdistukseen ja puhdistustuote.

Förbättring vid rening av vankomycin och reningsprodukt.

Parannus vankomysiinin puhdistukseen ja puhdistustuote

- Vankomysiini on glykopeptidiantibiootti, joka on Nocardia orientalis -mikro-organismin (jota nimitettiin aikaisemmin Streptomyces orientalis:ksi), jota eristetty
- 5 Indonesiasta ja Intiasta peräisin olevasta maa-aineksesta, käymistuote. Kuten useimmat fermentaatioperäiset anti-biootit, vankomysiini on monen komponentin yhdistelmä, joka sisältää useita lähellä toisiaan olevia ja kemialli-
- 10 sesti samankaltaisia yhdisteitä. Aineen valmistusta selostetaan yksityiskohtaisesti US-patenttijulkaisussa 3 067 099. Vankomysiiniä käytetään kaupallisesti pääasiassa antibakteerisena aineena, vaikka se parantaa myös tehokkaasti märehtijöiden ravinnonhyväksikäyttöä; ks. US-patenttijulkaisu 3 816 618.
- 15 Kaupallisen vankomysiinin valmistus on edellyttänyt monivaiheista prosessia, joka sisältää fermentoinnin, jota seuraa melko laajamittainen eristys- ja puhdistusvaihe. Yleensä koko fermentointiliemi suodatetaan kiinteiden aineiden ja myseelien poistamiseksi, ja liukoisen antibiootin
- 20 sisältävä suodos lasketaan kationinvaihtohartsin läpi, jonka silloittumisaste on alhainen ja joka pidättää antibiootin. Vankomysiiniä sisältävä hartsieluaatti käsitellään seuraavaksi värinpoistohiilellä, ja liukoinen vankomysiini eristetään sen jälkeen liukenemattomana kuparikompleksina.
- 25 Kuparikompleksia käsitellään lopuksi rikkivedyllä happamissa olosuhteissa vankomysiinin saattamiseksi liukenevaan muotoon, joka vankomysiini voidaan eristää vapaana emäksenä säätämällä pH:a sopivasti. Vapaata emästä käytetään formuloissa, jotka on tarkoitettu annettaviksi eläimille suun kautta, ja sitä
- 30 voidaan käyttää suoraan tai jodännaiseksi, kuten esimerkiksi hydrokloridisuolaksi, muutettuna ruiskeina annettaviin formuloihin.
- Vankomysiinin kaupallisessa tuotannossa on puutteita monessa suhteessa. Kuparisuolojen käyttö eristysvaiheessa
- 35 edellyttää jonkin sellaisen aineen, kuten rikkivedyn, käyttä-

mistä myöhemmin kuparikompleksin hajottamiseksi ja liukoisten kuparisuolojen saostamiseksi liukenemattomina sulfideina tai vastaavina. Tämä on johtanut vankomysiinituotteeseen, jolla usein on epämiellyttävä tuoksu ja joka yleensä on

5 hiukan värjäätynyt. Monivaiheisen eristys- ja puhdistusprosessin haittana on ollut myös tuotteen häviäminen kussakin vaiheessa siten, että vankomysiinin (vapaan emäksen) kokonaissaanto on ollut ainoastaan 30 %:n suuruusluokkaa.

Tämä keksintö koskee uutta vankomysiinin suolamuotoa,

10 joka on kiteinen ja joka voidaan eristää suoraan suhteellisen epäpuhtaan vankomysiinin vesiliuoksesta, esimerkiksi fermentointiliemestä. Yhtään vankomysiinin suolamuotoa ei ole tähän mennessä ole kyetty eristämään kiteisenä. Tämän keksinnön mukainen uusi kiteinen muoto on stabiili pitkään, ja sitä voidaan käyttää suoraan farmaseuttisissa valmisteissa. Tämä

15 keksintö tarjoaa parannuksen vankomysiinin eristysmenetelmään poistamalla tarpeen muodostaa vankomysiinin kuparikompleksi, parantamalla kokonaissaantoa ja johtamalla tuotteeseen, jolla on parantuneet farmaseuttiset ominaisuudet.

20 Tämän keksinnön mukaisesti aikaansaatava uusi kiteinen koostumus on vankomysiinin difosfaattisuola. Yhdiste voidaan eristää vankomysiinin happamasta vesiliuoksesta, ja se esiintyy yleensä hydraattina. Hydratoitumisaste vaihtelee sen mukaan, missä määrin yhdistettä on kuivattu, mutta normaalisti suola

25 eristetään 0 moolista noin 10 mooliin kidevettä sisältävänä. Edullinen keksinnön mukainen yhdiste on kiteinen vankomysiinidifosfaattidekahydraatti. Tämän keksinnön mukaisesti saatava vankomysiinidifosfaatti on aine, jonka kiteisyysaste on korkea ja stabiilisuus hyvä. Kidevedellisenä keksinnön mukaisella

25 yhdisteellä on seuraavat pulveriröntgendiffraktio-ominaisuudet 114,6 mm:n Debye-Scherrer -kameralla Ni-suodatettua kuparisäteilyä, jonka aallonpituus on 1,5418 Å, käyttäen mitattuna:

<u>Etäisyys, d</u>	<u>Suhteelliset, I/I_1, intensiteetit</u>
16,52	1,00
12,36	0,30
10,28	0,50
8,98	0,75
7,97	0,50
7,41	0,20
6,76	0,20
6,24	0,20
5,61	0,50
5,34	0,50
4,96	0,40
4,73	0,20
4,44	0,50
4,26	0,50
3,98	0,40
3,75	0,40
3,55	0,50
3,35	0,30
3,15	VW
3,01	VW
2,81	VW
2,66	VW

Huomautus: VW merkitsee hyvin heikkoa

Se parannus menetelmään vankomysiinin eristämiseksi ja puhdistamiseksi, jota tämä keksintö koskee, saadaan aikaan muuttamalla vesiliuoksen, esimerkiksi vettä sisältävän fermentointiliemen, sisältämä vankomysiini difosfaattisuolaksi ja eristämällä suola suodattamalla. Käytännössä vankomysiiniä sisältävä kokoliemi suodatetaan emäksisessä pH:ssa, noin pH:ssa 8,0 - 10. Kiinteiden epäpuhtauksien jafermoentointimyseelien poistamisen helpottamiseksi käytetään yleensä tavanomaisia suodatuksen piimaa-apuaineita, kuten Celite:ä (Johns Manville, Inc.) ja vastaavia. Sen jälkeen suodos lasketaan ioninvaihtohartsin, kuten Ionac X-236:n, vähän ristiksidoksia sisältävän, natriumkationimuodossa olevan polystyreenidivinyylibentseeni -hartsin, läpi ja vankomysiini adsorboituu siihen. Vankomysiini eluoidaan hartsista pesemällä hartsi vedellä ja eluoimalla alkalisella vesiliuoksella, jonka pH on noin 9,0 - 11,0. Tyypillinen eluointiliuos on natriumhydroksidin vesiliuos, jonka pH on 10,0 - 11,0. Alkalinen eluaatti, joka sisältää vankomysiiniä, neutraloidaan ja antibiootti adsorboitetaan uudelleen funktionaalisia ryhmiä sisältämättömään hartsiin, esimerkiksi kaupalliseen Diaion HP-20 -hartsiin tai vastaavaan. Kuormittunut hartsi eluoidaan sopivalla liuottimella, edullisesti alkoholin vesiliuoksella, esimerkiksi liuoksella, joka sisältää noin 3 - 30 til-% etanolia tai isopropanolia vedessä. Alkoholin vesiliuos voidaan haluttaessa tehdä happamaksi, esimerkiksi lisäämällä fosforihappoa, jolloin vankomysiinidifosfaattia muodostuu funktionaalisia ryhmiä sisältämättömän hartsin eluoinnin aikana.

Yleensä vankomysiiniä sisältävä eluaatti väkevöidään poistamalla osa liuotinta esimerkiksi haihduttamalla alipaineessa. On edullisinta väkevöidä liuos sellaiseksi, että se sisältää noin 250 - 285 mg vankomysiiniä ml:ssa liuosta. Väkevöidyn eluaatin pH säädetään arvoon 2 tai sen alapuolelle jollakin fosfaatti-ionilähteellä, esimerkiksi lisäämällä fosforihapon vesiliuosta. Haluttaessa liuokseen voidaan

lisätä lisää fosfaattianioneja esimerkiksi alkalimetallidivetyfosfaattia, kuten natrium- tai kaliumdivetyfosfaattia lisäämällä. Tällaisen lisätyn fosfaattilähteen määrä ei ole ratkaiseva, mutta se on yleensä noin 10 - 20 p-% liuoksen sisältämästä vankomysiinimäärästä. Jäähdytettäessä vesiliuos noin 0 - 20°C:een tämän keksinnön mukainen kiteinen vankomysiinidifosfaatti saostuu ja voidaan ottaa talteen liuoksesta. Tuotetta voidaan haluttaessa puhdistaa edelleen tavanomaisin keinoin, kuten pesemällä kiteet kylmällä vedellä tai liuottimella, esimerkiksi alkoholilla, tai kiteyttämällä se uudelleen tavanomaisista liuottimista, kuten vedestä, etanolista tai vastaavasta.

Tämän keksinnön kohteena olevan uuden kiteisen vankomysiinidifosfaatin valmistusta ja menetelmän parannuksen vaikutusta valaistaan lähemmin seuraavin yksityiskohtaisin esimerkein.

Esimerkki 1

Suspensioon, koka sisälsi 10 g vankomysiiniä 15 ml:ssa vettä ja jota sekoitettiin, lisättiin 2 ml 85 %-ista (m/V) fosforihapon vesiliuosta. Kaikki hiukkaset liukenivat. Liuosta pidettiin 0°C:ssa 16 tuntia. Muodostunut kiteinen sakka kerättiin suodattamalla, pestiin 20 ml:lla isopropanolia ja sen jälkeen 20 ml:lla dietyylieetteriä ja kuivattiin ilmassa, jolloin saatiin 7,5 vankomysiinidifosfaattia, sp. 194°C (hajoaa).

Kiteisestä tuotteesta otettu näyte kuivattiin 120°C:ssa (11,55 %:n painohäviö viittaa siihen, että tuote sisälsi 10 moolia kidevettä), ja näytteelle suoritettiin alkuaineanalyysi.

30 Analyysi ($_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} \cdot 2H_3PO_4$)

Teoreettinen: C 48,18; H 4,96; N 7,66; Cl 4,31;
O 31,12; P 3,77

Todettu: C 47,98; H 5,19; N 7,41; Cl 4,20;
O 31,04; P 3,77

35

Esimerkki 2

Koko vettä sisältävän fermentointiliemen, joka sisälsi vankomysiiniä pH säädettiin arvoon 9 lisäämällä siihen 6 N natriumhydroksidia. Vettä sisältävä emäksinen seos suodatettiin, suodoksen pH säädettiin arvoon 7, ja se suodatettiin uudelleen. Suodos laskettiin natriumionimuodossa olevan

5 Ionac X-236 -hartsipylvään läpi, ja pylväs huudottiin vedellä ja eluoitiin sitten pH 10 -boraattipuskurilla, Neutraloidun eluaatin sisältämä antibiootti adsorboitettiin HP-20-hartsiin. Kuormittunut hartsi huuhdottiin vedellä

10 ja euloitiin sitten liuoksella, joka sisälsi 10 til-% isopropanolia vedessä ja oli 0,1 N fosforihapon suhteen. Vankomysiiniä sisältävät jakeet yhdistettiin (2300 ml) ja väkevöitiin alipaineessa 65 ml:n tilavuuteen. Biologinen määrittäminen osoitti liuoksen sisältävän vankomysiiniä 258 mg/ml.

15 Liuoksen pH säädettiin arvoon 2 lisäämällä siihen 6 N fosforihappoa. Hapanta liuosta sekoitettiin 25°C:ssa, samalla kun siihen lisättiin vähitellen 2,5 g kaliumdivetyfosfaattia. Tätä hapanta liuosta pidettiin noin 5°C:ssa 18 tuntia. Kiteinen sakka kerättiin suodattamalla ja pestiin 26 ml:lla

20 kylmää (5°C:ista) 2 %-ista (m/V) kaliumdivetyfosfaatin vesiliuosta, 13 ml:lla kylmää (5°C:ista) deionisoitua vettä ja lopuksi 26 ml:lla kylmää (5°C:ista) isopropanolia,. Kiteistä tuotetta kuivattiin alipaineessa 42°C:ssa 12 tuntia, jolloin saatiin 13,5 g (saanto 76,6 %) vankomysiinidifosfaattia.

25 Esimerkki 3

Tämän keksinnön mukaisesti aikaansaatava kiteinen vankomysiinidifosfaatti on kiinteä aine, jonka kiteisyysaste hydratoituneena on korkea ja joka on stabiili pitkään. Vankomysiinidifosfaattinäytteiden stabiilisuus määritettiin

30 valmistamalla kolme erää yhdistettä esimerkin 2 mukaisella menetelmällä. Näistä kolmesta eri erästä otettuja näytteitä varastoitiin 21 - 28°C:ssa polyetyleenisäiliöissä. Määritettiin kunkin kolmen erän erilaiset fysikaaliset parametrit 0, 6, 12 ja 18 kuukauden kuluttua. Tutkimuksen tulokset

35 esitetään seuraavassa taulukossa:

Vankomysiinidifosfaatin varastoinninkestävyys

Erä	Ikä Vankomysiini- difosfaatti (kk)	Kirkkaus (Naphlos)	Väri (465 mu)	Karl Fischer (% H ₂ O)	Antibak- teerinen		Antibak- teerinen teho (% alku- peräisestä)	(% kompo- nenttia B)
					pH	(µg/mg)		
Erä 1	1	12,6	0,098	3,13	2,53	989	100	88,8
	6	20,0	0,115	2,82	2,39	939	94,9	88,2
	12	28,0	0,114	2,60	2,68	911	92,1	86,2
	18	38,0	0,110	3,39	2,73	864	87,4	85,5
Erä 2	1	21,6	0,145	2,00	2,54	935	100	88,5
	6	46,0	0,168	1,79	2,39	948	101,4	87,9
	12	58,6	0,172	1,91	2,66	871	93,2	87,1
	18	52,0	0,158	2,09	2,69	878	93,9	84,0
Erä 3	1	5,0	0,105	4,25	2,53	893	100	87,7
	6	17,0	0,114	3,75	2,39	926	103,7	87,8
	12	21,3	0,113	3,87	2,69	854	95,6	87,3
	18	30,0	0,113	4,21	2,70	830	92,9	85,6

x valmistettu esimerkin 2 mukaisesti

xx Vankomysiini koostuu useasta komponentista; pääkomponentti on B

Edellä olevassa taulukossa esitetyt tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaisen vankomysiinidifosfaatti on melko stabiili; se säilyttää yli 90 % alkuperäisestä biologisesta aktiivisuudestaan 12 kuukauden ajan.

5 Tämän keksinnön mukaisesti aikaansaataavaa kiteistä difosfaattia voidaan käyttää välituotteena muiden vankomysiinin suolamuotojen valmistuksessa, ja yhdiste voidaan formuloida tavanomaisia täyte- ja kantaja-aineita käyttäen, ja sitä voidaan käyttää bakteerien aiheuttamien tautien
10 hoidossa.

Kiteinen difosfaattisuola voidaan formuloida helposti tavanomaiseen, suun kautta tai parenteraalisesti annettavaan muotoon, joka soveltuu bakteeri-infektioiden hoitoon ja profylaksiaan. Suola voidaan esimerkiksi sekoittaa tavanomai-
15 siin farmaseuttisiin kantaja ja täyteaineisiin, sitä voidaan käyttää tabletteina, kapsелеina, väkevinä liuoksina, suspensioina, siirappeina, kekseinä ja vastaavina. Vankomysiiniä sisältävät koostumukset sisältävät yleensä noin 0,1 - 90 p-%, vielä yleisemmin noin 10 - 30 p-%, vaikuttavaa yhdistettä.
20 Koostumukset voivat sisältää tavanomaisia kantaja- ja täyteaineita, kuten maissitärkkelystä tai gelatiinia, laktoosia, sakkaroosia, mikrokiteistä selluloosaa, kaoliinia, mannitolia, dikalsiumfosfaattia, natriumkloridia ja algiinihappoa. Sideaineita, joita voidaan sisällyttää tabletteihin, ovat
25 arabikumi, metyyliiselluloosa, natriumkarboksimeyyliiselluloosa, polyvinyylipyrrolidoni (povidoni), hydroksipropyylimettyliiselluloosa, sakkaroosi, tärkkelys ja etyyliiselluloosa. Käyttökelpoisia voiteluaineita, liukuaineita ja takertumista estäviä aineita ovat magnesiumstearaatti tai muut
30 metallistearaatit, steariinihappo, silikoniöljy, talkki, vahat, öljy ja kolloidien piidioksidi. Makua parantavia aineita, kuten piparminttua, gaulteriaöljyä, kirsikka-aromiainetta tai vastaavaa, voidaan myös käyttää. Seuraavat esimerkit ovat esimerkkejä formuloista, jotka soveltuvat suun
35 kautta annettaviksi.

Esimerkki 4

Tablettien, jotka sisältävät 250 mg vankomysiiniä vapaana emäksenä, valmistu

	<u>Aineosa</u>	<u>Paino</u>
5	Vankomysiinidifosfaattia (valmistettu esi- merkin 2 mukaisesti)	282,5 mg
	Mikrokiteistä selluloosaa	101,5 mg
	Kroskarmelloosinatriumia	12,0 mg
	Providonia	12,0 mg
10	Magnesiumstearaattia	3,0 mg
	Steariinihappoa	4,0 mg
	Puhdistettua vettä	0,16 ml
	Vankomysiinidifosfaatti, osa mikrokiteisestä sellu- loosasta ja ja osa kroskarmelloosinatriumista lisätään	
15	sopivaan astiaan ja sekoitetaan homogeeniseksi seokseksi. Valmistetaan povidonin vesiliuos. Povidonin vesiliuos lisätään sekoitettuihin jauheisiin. Syntyvä seos rakeiste- taan, seulotaan tarvittaessa ja kuivataan. Kuivattuun rakeistettuun seokseen lisätään loppuosa selluloosasta	
20	ja kroskarmelloosinatriumista. Jauheet sekoitetaan. Lisä- tään magnesiumstearaatti ja steariinihappo, ja sekoitetaan seosta. Tulokseksi saatava jauhemainen seos puristetaan tableteiksi, joiden teoreettinen paino on 415 mg. Kukin tabletti sisältää vankomysiinidifosfaattia määrän, jonka	
25	vastaa 250 mg:a vankomysiiniä vapaan emäksenä.	

Esimerkki 5

Vankomysiinidifosfaattia sisältävien kapsleiden val-
mistus

	<u>Aineosa</u>	<u>Paino</u>
30	Vankomysiinidifosfaattia	282,5 mg
	Maissitärkkelystä (valuvana jauheena)	117,65 mg
	Silikoniöljyä (viskositeetti 350 cSt)	2,75 mg
	Maissitärkkelystä	141,1 mg
	Vankomysiinidifosfaatti, valutettavissa oleva tärk- kelysjauhe, silikoniöljy (viskositeetti 350 cSt) ja tärkkelys-	
35		

jauhe sekoitetaan sopivassa sekoittimessa homogeeniseksi seokseksi. Sopiivankokoiset kovat gelatiinikapselit täytetään tällä seoksella niin, että nettopainoksi tulee 550 mg. Kukin kapseli sisältää vankomysiinidifosfaattia määrän, joka vastaa 250 mg:a vaikuttavaa vankomysiiniemästä.

Esimerkki 6

ankomysiinidifosfaattia sisältävä nestemäinen formula

<u>Aineosa</u>	<u>Paino</u>
Vankomysiinidifosfaattia	5 g
10 Punaista väriainetta	10 mg
Kirsikka-aromiainetta	50 mg
Natriumlauryylisulfaattia	1,5 mg
Sakkaroosia	62 g

Lisätään sakkaroosi sopivaan sekoittimeen. Lisätään esiseos, joka sisältää osan sakkaroosista jauheena sekä punaisenväriaineen, kirsikka-aromiaineen ja natriumlauryylisulfaatin. Ennen käyttöä pullossa olevaan kuivaseokseen lisätään 60 ml vettä. Pulloa ravistetaan, kunnes sisältö liukenee veteen. 5 ml liuosta sisältää 250 mg vankomysiinidifosfaattia.

Esimerkki 7

Vankomysiinidifosfaattisuspensio (käyttövalmis)

<u>Aineosa</u>	<u>Paino</u>
Vankomysiinidifosfaattia	5 g
25 Butyyliparabeenia	20 mg
Punaista väriainetta	10 mg
Kirsikka-aromiainetta	50 mg
Tiksiini R:ä	400 mg
Sakkaroosijauhetta	30 g
30 Jakotislattua kookosöljyä	100 ml:ksi

Kuumennetaan jakotislattu kookosöljy. Lisätään butyyliparabeeni ja tiksiini R. Jäähdytetään huoneen lämpötilaan. Lisätään sakkaroosijauhe, punainen väriaine, kirsikka-aromaine ja vankomysiinidifosfaatti. Sekoitetaan kolloidimyllyssä. 5 ml suspensiota sisältää 250 mg vankomysiinidifosfaattia.

Kuten edellä on mainittu, tämän keksinnön mukainen kiteinen vankomysiinidifosfaatti voidaan muuttaa muiksi vankomysiini johdannaisiksi, esimerkiksi muiksi suoloiksi, kuten hydrokloridisuolaksi. Vankomysiinidifosfaatti voidaan liuttaa hapon vesiliuokseen ja vastaava happoadditio-
 5 suola ottaa talteen, tai sen voidaan antaa reagoida alkali-
 sen vesiliuoksen kanssa, jolloin saadaan vapaa emäs, jonka annetaan sen jälkeen reagoida mineraalihapon tai orgaanisen hapon kanssa, jolloin muodostuu vastaava happoadditio-
 10 suola. Eräässä edullisessä menetelmässä tällaisen muuttamisen toteuttamiseksi käytetään ioninvaihtohartsia, kuten seuraava esimerkki osoittaa.

Esimerkki 8

Ioninvaihtohartsi (IRA-45) pestiin 5 %-isella (m/V)
 15 natriumhydroksidin vesiliuoksella ja sen jälkeen sitä huuhdottiin 5 %-isella (V/V) suolahapon vesiliuoksella, kunnes pH oli 1,2. Hartsi pakattiin lasipylvääseen, jonka koko oli 1,7 cm x 66 cm. Liuos, joka sisälsi 81 g vankomysiinidifosfaattia (valmistettu esimerkissä 2 kuvatulla
 20 tavalla) 812,5 ml:ssa deionisoitua vettä, laskettiin ioninvaihtohartsin läpi virtausnopeudella 13 ml/min. Eluaatti kerättiin ja hartsi huuhdottiin vedellä. Eluaatti ja huuhteluliuos yhdistettiin, ja tämän liuoksen pH säädettiin vapaan emäksen muodossa olevaa IRA-45 -hartsia 180 ml:ssa
 25 vettä lisäämällä arvoon 3,5. Hartsi poistettiin suodattamalla ja suodos (1200 ml) analysoitiin. Vankomysiinihydrokloridipitoisuus määritettiin UV-analyysillä aallonpituudella 280 nm, ja se oli 51,17 mg/ml. Suodos sisälsi siten 61,4 g (saanto 94 %) vankomysiinihydrokloridia. Jatkopuhdistus ja kylmäkuivaus tuotti tulokseksi jauhemaista vankomysiinihydrokloridia.
 30

Keksinnön piiriin kuuluu myös vankomysiinidifosfaatin käyttö antivakteerisena aineena bakteerien aiheuttamien sairauksien hoidossa. Yhdiste voidaan formuloida sopivalla
 35 tavalla ja antaa suun kautta tai parenteraalisesti bakteeri-

infektiota sairastavalle eläimelle. Yhdistettä voidaan käyttää myös ennaltaehkäisevästi ja kohteille, joissa epäillään kehittyvän bakteeri-infektio. Vankomysiinidifosfaatti on erityisen tehokas gram-positiivisten mikro-
5 organismien, kuten streptokokkien, stafylokokkien, Clostridium difficile:n ja vastaavien, kantoja vastaan.

Sovellettaessa tämän keksinnön mukaista antibakteerista menetelmää käytäntöön vankomysiinidifosfaatti formuloidaan sopivalla tavalla annetaan vaikuttavana annoksena,
10 joka on noin 0,5 - 25 mg/kg. Tyypillinen vuorokausiannos aikuiselle ihmiselle on noin 250 mg - 1,0 g. Täsmällinen annettava yhdistemäärä vaihtelee luonnollisesti kunkin nimenomaisen tilan, hoidettavan kohteen ja muiden vastaavankaltaisten seikkojen mukaan.

15 Tämän keksinnön mukaista vankomysiinidifosfaattia voidaan käyttää lisäksi märehtijöiden ravinnonhyväksikäytön tehostamiseen. Yhdiste voidaan formuloida eläinrehuksi tai esiseokseksi, ja sitä voidaan antaa märehtijöille käyttäen suunnilleen annostusta 20 - 40 g vaikuttavaa aineosaa
20 rehutonnia kohden. Tyypillisiä tällä tavalla käsiteltäviä eläimiä ovat lihan tuotantoa varten kasvatettava nautakarja, lampaat ja muut vastaavankaltaiset märehtijät.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä vankomysiinin eristämiseksi vesiliuoksesta, t u n n e t t u siitä, että vankomysiini muutetaan kiteiseksi difosfaattisuolaksi ja suola erotetaan liuoksesta.

5 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vankomysiinin pitoisuus vesiliuoksessa on 250 - 285 mg/ml.

10 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vankomysiiniä sisältävään happamaan vesiliuokseen lisätään alkalimetallidivetyfosfaattia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että kyseinen alkalimetallidivetyfosfaatti on kaliumdivetyfosfaatti.

15 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vankomysiinin vesiliuokseen lisätään fosforihappoa, kunnes pH on 2,0 tai sitä alempi.

6. Menetelmä vankomysiinihydroklordin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vankomysiinidifosfaatin annetaan reagoida vetykloridilähteen kanssa.

20 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että kyseinen vetykloridilähde on ionin-
vaihtoharts, jossa vaihdettavina ioneina ovat protoni ja kloridi-ioni.

Patentkrav

1. Förfarande för isolering av vancomycin från vattenlösning, k ä n n e t e c k n a t därav, att man omvandlar
5 vancomycinet till ett kristallint difosfatsalt och separerar saltet från lösningen.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att koncentrationen av vancomycin i
vattenlösningen är ca 250-285 mg/ml.
- 10 3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att ett alkalimetalldivätefosfat tillsätts i vattenlösningen som innehåller vancomycin.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att alkalimetalldivätefosfatet är kalium-
15 divätefosfat.
5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att fosforsyra tillsätts i en vattenlösning av vancomycin tills pH-värdet ligger vid eller under
2,0.
- 20 6. Förfarande för framställning av vancomycinhydroklorid, k ä n n e t e c k n a t därav, att man omsätter vancomycindifosfat med en klorvätekälla.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att klorvätekällan är ett jonbytarharts,
25 vari de tillgängliga jonerna är proton och klorid.