



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

203131

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 35/66

(22) Přihlášeno 15 10 76
(21) (PV 6686-76)
(32)(31)(33) Právo přednosti
od 20 10 75 (623840)
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 12 83

(72) Autor vynálezu METZGER JULIO, EAST BRUNSWICK (Sp. st. a.)
(73) Majitel patentu E. R. SQUIBB & SONS, INC., PRINCETON (Sp. st. a.)

(54) Způsob čištění nystatinu

1

Předložený vynález se týká nového způsobu přípravy antibiotika nystatinu (uváděného ve starší literatuře jako fungicidin) a přesněji způsobu čištění surového částečně čištěného nebo kontaminovaného nystatinu.

Nystatin a jeho způsob přípravy z *Streptomyces noursei* jsou uvedeny Hazenem a j. v US patentu č. 2 797 183. Kromě toho je možno odkázat na práci Hazen a Brown, "Fungicidin, An Antibiotic Produced by a Soil Actinomycete", Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 76:93 (1950) a Brown, Hazen and Mason, "Effect of Fungicidin (nystatin) in Mice Injected with Lethal Mixtures of Aureomycin and *Candida albicans*," Science 117, 609 (1953). Antibiotikum je zde uváděno jedním výrazem "nystatin".

V literatuře je známo několik metod izolace nystatinu z fermentačního média. Příklady těchto postupů jsou Hazen a j., US patent č. 2 797 183, Vandeputte a j., US patent číslo 2 786 781, Vandeputte a j., US patent č. 3 332 844, a Renella, US patent č. 3 517 100. Nystatin izolovaný známými postupy není vysoce čistý stejnoměrně krystalický produkt. Způsob získávání nystatinu v této formě je samozřejmě vysoce požadovaný a v literatuře bylo navrženo několik způsobů, které však mají určité nevýhody. Příklady těchto postupů jsou v paten- tech Vandeputte, US patent č. 2 832 719, Dutcher a j., US patent č. 2 865 807, Mendelsohn, US patent č. 3 509 255, a Esse, US patent č. 3 517 101.

Způsob podle předloženého vynálezu se vyznačuje tím, že se nystatin nejprve suspenduje v nižším alkanolu, načež se přidáním kyseliny citrónové uvede do roztoku, získaný extrakt v nižším alkanolu se filtruje, k filtrátu se přidá chlorované uhlovodíkové rozpouštědlo a vzniklá směs chlorovaného uhlovodíkového rozpouštědla a extraktu v nižším alkanolu se neutralizuje na pH 6 až 8, s výhodou na 6,6 až 7,0, načež se přidáním vody vysráží vyčištěný nystatin.

203131

Předložený vynález se týká způsobu čištění surového, částečně čištěného nebo kontaminovaného nystatinu, který poskytuje produkt vysoké účinnosti, který se snadno převede na vysoce krystalickou formu. Tento postup omezuje na minimum nebezpečí inaktivace nystatinu způsobené náhodným předávkováním kyseliny a může se snadno kontrolovat při výrobě ve velkém za použití běžných zařízení a obchodně dostupných činidel a rozpouštědel.

Nystatin použitý jako výchozí materiál při novém čistícím postupu podle předloženého vynálezu může být surový, částečně čištěný nebo kontaminovaný nystatin. Výraz "kontaminovaný nystatin" zahrnuje nejen nystatin, který obsahuje chemické znečištěniny, ale také nystatin kontaminovaný fyzikálními znečištěninami, jako jsou částičky prachu, vláknitý materiál a ostatní částičky, které mohou způsobovat, že nystatin je neakceptovatelný pro farmaceutické použití.

První stupeň postupu podle předloženého vynálezu je suspendování nystatinového výchozího materiálu v nižším alkanolu, například alkanolu s 1, 2, 3 nebo 4 atomy uhlíku, s výhodou v methanolu. Množství použitého nižšího alkanolu není rozhodující, ale aktivita nystatinu v suspensi má být alespoň 25 000 jednotek na mililitr, s výhodou alespoň 100 000 jednotek na mililitr.

Po suspendování nystatinu v nižším alkanolu se přidá kyselina citrónová. Množství kyseliny přidané k suspensi musí být dostatečné, aby se rozpustil nystatin.

Extrakt v nižším alkanolu se odfiltruje. Pro zlepšení účinku filtračního postupu se přidává k suspensi pomocná filtrační látka, jako je diatomický kysličník křemičitý. Může se také přidávat aktivní uhlí, ale nevyžaduje se.

Filtrační koláč se s výhodou promývá dávkami čerstvého nižšího alkanolu, aby se zajistilo úplné získání nystatinu. Promývací nižší alkanolové podíly se přidávají k extraktu nižšího alkanolu před provedením postupu.

K nižšímu alkanolovému extraktu se přidá chlorovaný uhlovodík. Příklady rozpouštědel jsou chloroform, dichlormethan a ostatní. Z důvodů bezpečnosti je výhodným rozpouštědlem dichlormethan. Chlorovaná uhlovodíková rozpouštědla se přidávají k nižšímu alkanolovému extraktu v množství od asi 0,1 do 5,0 ml na milion jednotek aktivity.

Směs rozpouštědla a nižšího alkanolového extraktu se neutralizuje na pH od asi 6,0 do 8,0 vhodnou bází. Příklady bází jsou triethanolamin, diethylamin, triethylamin, amoniak a hydroxid sodný.

Vyčištěný nystatin se sráží přidáním vody ke směsi a izoluje se běžným způsobem. Výhodným postupem je přidání očka krystalů nystatinu, potom zahřátí k varu a následující ochlazení pod teplotu místnosti, s výhodou na teplotu od 0 do 15 °C. Vzniklý krystalický nystatin se oddělí například filtrací nebo centrifugací.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech.

P ř í k l a d 1

Odpad nystatinu (15,4 g mikrobiologický účinek 4 490 jednotek/mg) se suspenduje v 300 ml methanolu při teplotě asi 16 °C. K suspensi se přidá monohydrát kyseliny citrónové (7,5 g) a suspenze se míchá 30 minut a získá se zakalený roztok. Přidá se diatomický kysličník křemičitý (2,0 g) a suspenze se filtruje ve vakuu, aby se odstranily zbylé pevné látky. Zbytek na filtru se třikrát promyje po 25 ml methanolu a promývací roztok se přidá k methanolickému filtrátu. Methanolický filtrát se míchá a v pětiminutových intervalech se přidá 75 ml dichlormethanu, 30 ml 40% roztoku triethanolaminu ve vodě a 560 ml studené destilované vody a získá se suspenze amorfního nystatinu. Pak se k suspenzi přidá dalších 6 ml 40% roztoku

triethanolaminu ve vodě a pH se upraví na asi 6,6 až 7,0, načež se přidá 375 mg krystalického nystatinu. Suspense se zahřeje k varu (41 °C) 15 minut a postupně se během dvou hodin vychladí na 10 °C a udržuje se na této teplotě další hodinu.

Suspense krystalů se odfiltruje ve vakuu a krystaly se promyjí 60 ml studeného 40% methanolu ve vodě a třemi 75 ml dávkami acetonu. Krystaly se pak suší ve vakuu 20 hodin při 45 °C a získá se 10,72 g nystatinu, mikrobiologického účinku 5 360 jednotek/mg.

P ř í k l a d 2

Surový nystatin (17,65 g, mikrobiologický účinek 2 940 jednotek/mg) se suspenduje v 200 ml methanolu při teplotě asi 16 °C. Přidá se monohydrát kyseliny citrónové (7,5 g) a 30 minutový mícháním se získá suspense. K této suspensi se přidá diatomický kysličník křemičitý (1,0 g) a zbylé pevné podíly se odfiltrují ve vakuu. Zbytek se promyje třemi 17 ml dávkami methanolu a promývací roztoky se přidají k methanolickému filtrátu. Methanolický filtrát se míchá a v intervalech 5 minut se přidá 50 ml dichlormethanu, 30 ml 40% roztoku triethanolaminu ve vodě a 350 ml studené destilované vody, přičemž se získá suspense amorfního nystatinu. K suspensi se přidá dalších 3,6 ml 40% roztoku triethanolaminu ve vodě aby pH se upravilo na 6,7 až 7,0. Přidají se očka krystalického nystatinu (500 mg) a suspense se ohřívá k varu (40 °C) po dobu 14 minut, během dvou hodin se postupně ochladí na 10 °C a udržuje se na této teplotě další hodinu.

Suspense krystalů se filtruje ve vakuu a krystaly se promyjí 40 ml studeného 40% roztoku methanolu ve vodě a pak třemi 50 ml dávkami acetonu. Krystaly se vysuší ve vakuu 20 hodin při 45 °C a získá se 7,12 g nystatinu, mikrobiologického účinku 6 000 jednotek/mg.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob čištění nystatinu, vyznačený tím, že se nystatin nejprve suspenduje v nižším alkanolu, načež se přidáním kyseliny citrónové uvede do roztoku, získaný extrakt v nižším alkanolu se filtruje, k filtrátu se přidá chlorované uhlovodíkové rozpouštědlo a vzniklá směs chlorovaného uhlovodíkového rozpouštědla a extraktu v nižším alkanolu se neutralisuje na pH 6 až 8, s výhodou na 6,6 až 7,0, načež se přidáním vody vysráží vyčištěný nystatin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se filtrační koláč získaný při filtračním stupni promyje nižším alkanolem a promývací nižší alkanolické roztoky se přidají k extraktu v nižším alkanolu.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačený tím, že se vysrážený nystatin převede na krystalickou formu.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačený tím, že se jako nižší alkanol použije methanol.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačený tím, že se jako chlorované uhlovodíkové rozpouštědlo používá dichlormethan.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se nystatin suspenduje v methanolu, přidáním kyseliny citrónové se uvede do roztoku, vzniklý methanolický extrakt se filtruje, filtrační koláč se promyje methanolem a methanolické promývací roztoky se přidají k methanolickému extraktu, ke kterému se pak přidá dichlormethan a získaná směs dichlormethanu a methanolického extraktu se neutralisuje na pH 6,6 až 7,0 načež se přidáním vody vysráží nystatin.