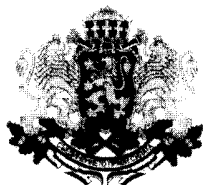


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **99639A**

(51) C07D503/02

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Заявителски № 99639 (22) Заявено на 20.10.1994 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;">Приоритетни данни</p> <table><tr><td>9212379</td><td>11.06.1992</td><td>GB</td></tr><tr><td>(31) 9222841</td><td>(32) 31.10.1992</td><td>GB</td></tr><tr><td>9226061</td><td>14.12.1992</td><td>GB</td></tr><tr><td>9226282</td><td>17.12.1992</td><td>GB</td></tr></table> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 28.02.1996 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	9212379	11.06.1992	GB	(31) 9222841	(32) 31.10.1992	GB	9226061	14.12.1992	GB	9226282	17.12.1992	GB	<p>(71) Заявител(и): SMITHKLINE BEECHAM P.L.C. , , TW8 9EP BRENTFORD, MIDDLESEX, NEW HORIZONS COURT (GB) ; (72) Изобретател(и): COOK , MICHAEL A . , WORTHING,W.SUSSE (GB) ; WILKINS , ROBERT V . , IRVINE,AYRSHIRE (GB) ; (74) Представител по индустриална собственост: Фани Владимирова Божинова , 1000 София , п.к.728</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ GB93/0 / 1206 , 07.06.1993 (87) № и дата на PCT публикация: 93/255 / 57 , 23.12.1993</p>
9212379	11.06.1992	GB											
(31) 9222841	(32) 31.10.1992	GB											
9226061	14.12.1992	GB											
9226282	17.12.1992	GB											

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ И/ИЛИ ПРЕЧИСТВАНЕ НА КЛАВУЛАНОВА КИСЕЛИНА ИЛИ НЕЙНА ФАРМАЦЕВТИЧНО ПРИЕМЛИВА СОЛ

(57) Методът намира приложение в химическата промишленост. По него се включва непречистена клавуланова киселина или нейно неустойчиво производно в разтвор на органичен разтворител с терциерен октиламин. Образуваната терциерна октиламинова сол на клавулановата киселина се изолира и се превръща в клавуланова киселина или нейна фармацевтично приемлива сол или естер.

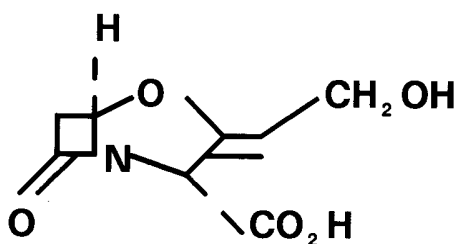
37 претенции , 0

BG 99639A

МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ И/ИЛИ ПРЕЧИСТВАНЕ НА КЛАВУЛАНОВА КИСЕЛИНА ИЛИ НЕЙНА ФАРМАЦЕВТИЧНО ПРИЕМЛИВА СОЛ

Област на техниката

Изобретението се отнася до метод за получаване и/или пречистване на клавуланова киселина с формула I



или нейна фармацевтично приемлива сол, който намира приложение в химическата промишленост.

Предшестващо състояние на техниката

Клавулановата киселина при нормални условия се получава при ферментирание на микроорганизъм, който отделя клавуланова киселина, като например различни микроорганизми, принадлежащи към различните деформации на *Streptomyces*, като например *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. jimoninensis* NRRL 5741, *S. katsurahamanus* IFO 13716 и *Streptomyces* sp. P 6621 FERM P2804, например както е описано в JP Kokai 80-162993. Полученият воден бульон може да се погложу на традиционните методи за пречистване и концентриране, например чрез използването на филтруване и хроматографно пречистване, както е описано в GB 1508977 и JP Kokai 80-

62993, преди да се екстрахира от водния разтвор с органичен разтворител, за да се получи разтвор от необработена клавуланова киселина в органичния разтворител.

В патентна заявка GB 1508977 се описва *inter alia*, че солите на клавулановата киселина могат да се получат чрез абсорбиране на клавулановия анион във филтрирания бульон върху анионна обменна смола, от където се утаява с електролит, който обезсолява получения разтвор и след това отстранява разтворителя. Този метод може да се използва, за да се получат приемливи крайни продукти от пречистен материал, но използването на колони съдържащи смоли е свързано със значителни капиталовложения и може да доведе до ограничения при широкомащабните производствени операции. Следователно е желателно да се намери алтернативен метод, при който съществуват само някои етапи, при които се използва смола.

В GB 1543563 е описан метод за получаване на соли на клавуланова киселина чрез утаяване на литиев клавуланат. В GB 1578739 са описани различни аминови соли на клавуланова киселина, като фармацевтични съединения. В EP е описано използването на третична бутиламинова сол на клавулановата киселина, като полезно междинно съединение при получаването на клавуланова киселина. Тази сол е описана в BE 862211, но само като подходяща съставка за фармацевтични състави. В PT 94.908 е описано използването на три-(пони-алкил) аминови соли и диметиланилиновите соли на клавуланова киселина в процеса на пречистване на

клавуланова киселина, при която се образува триетиламиновата сол на клавулановата киселина и след това се конвертира в силилов диестер на клавулановата киселина. В EP 0887178A е описан метод за пречистване на клавуланова киселина, при който органичните амини могат да се използват за образуването на междинна аминова сол с клавуланова киселина в непречистен разтвор.

Техническа същност на изобретението

Методът за получаване и/или пречистване на клавулановата киселина или нейна фармацевтично приемлива сол се състои в следното:

i - включване на непречистена клавуланова киселина или нейно неустойчиво производно в разтвор на органичен разтворител с терциерен октиламин;

ii - изолиране на образуваната терциерна октиламинова сол на клавулановата киселина;

iii - превръщане на така образуваната сол в клавуланова киселина или нейна фармацевтично приемлива сол или естер.

Неустойчивото производно на клавулановата киселина е сол на алкален метал, например натриева или литиева сол. По същество се използва сух разтворител, който съдържа по-малко от 6 гр/л вода. За предпочитане е органичният разтворител да съдържа от 0.25 до 0.60 гр/л вода. Органичният разтворител се изсушава чрез обезводняването му посредством центрофугиране.

Непречистената клавуланова киселина се получава

при ферментацията на клавуланова киселина, произвеждаща съответен микроорганизъм. При метода се използва бульон от непречистена клавуланова киселина, от който предварително са отгелени суспендираните твърди частици. Твърдите частици се отделят чрез филтруване.

Водният разтвор на получената клавуланова киселина при ферментацията е предварително концентриран преди провеждане на екстракцията. Водният разтвор на клавулановата киселина предварително се концентрира до 10-100 мг/мл, за предпочитане до 10-40 мг/мл и по-специално до 10-25 мг/мл. Процесът на предварителното концентриране чрез абсорбиране на клавулановата киселина от йоно-обменна смола се осъществява посредством елюиране на клавулановата киселина с воден разтвор на електролит. Използваният електролит е натриев хлорид. Получения концентрат е обезсолен. Бульонът или водният разтвор на клавулановата киселина се подкислява предварително преди да се проведе селективната екстракция. Бульонът или водният разтвор на клавулановата киселина се подкислява до рН от 1 до 3, по-специално до рН от 1.5 до 2.5 .

Екстракцията на непречистената клавуланова киселина или нейното неустойчиво производно в органичен разтворител се извършва при температура от 5 до 15°C. Органичният разтворител използван за екстрахиране на непречистената клавуланова киселина или нейното неустойчиво производно е избран от групата включваща въглеводородни разтворители, етерни

разтворители, халогенирани разтворители и кетонни разтворители. По-специално разтворителите са избрани от групата включваща толуен, хексан, тетрахидрофуран, диоксан, диетилов етер, дихлорометан, хлороформ, ацетон, метил изобутил кетон и етилов ацетат.

Терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се образува чрез третиране на клавулановата киселина или нейното неустойчиво производно в органичен разтворител с еквивалентно молно количество или слаб излишък от терциерен октиламин. Терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се образува при температура от 0 до 15°C. Терциерният октиламин се въвежда чрез смесването му, в потока от клавуланова киселина, с органичния разтворител.

Изолирането на терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се осъществява чрез екстракция на органичния разтворител, съдържащ терциерната октиламинова сол, с вода за да се екстрахира солта и след това следва превръщане на терциерната октиламинова сол в клавуланова киселина или нейната фармацевтично приемлива сол или естер. След това терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се рекристализира. Терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина рекристализира, като се използва воден разтвор на ацетон. Терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се превръща в нейната фармацевтично приемлива сол чрез йонно заместване. Йонното заместване се осъществява чрез пропускане на разтвор от терциерна октиламинова сол през слой от катион обменна смола до образуване на



натриева, калиева или калциева форма. Йонното заместване се осъществява чрез протониране на терциерния октиламинов катион със сол на предшестващо съединение. Като сол на предшестващото съединение се използва калиев етил хексаноат.

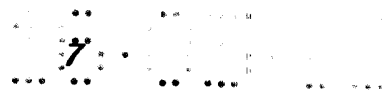
Разтворителят, който се използва при метода, може да бъде органичен разтворител, вода или смес от вода и органичен разтворител. Реакцията се осъществява при температура по-малка от тази на околната среда по-специално от 0 до 10°C, за предпочитане от 0 до 0.5°C.

Изобретението се илюстрира от следните примери:

Пример 1

Тука, сол на клавуланова киселина с амин се образува в разтвор от първи органичен разтворител и след това се отделя от разтвора под формата на твърда утайка чрез смесване с втори органичен разтворител.

1а. *t*-октиламин - приготвя се основен разтвор от клавуланова киселина в етилов ацетат, съдържащ приблизително 28 гр/л от клавуланова киселина в неprecистена форма чрез екстракция на неprecистен ферментационен бульон от *S. clavuligerus* с етилов ацетат. Към 46 мл от това вещество се прибавя *t*-октиламин (0.84 гр.). След 10 минути в сместа се образува облак и солта кристализира под формата на финни кристалчета. Към допълнителната аликвотна част от разтвора се прибавя ацетон, в резултат на което отново се образуват игловидни кристалчета, които обаче



са по-малки и се образуват по-бавно отколкото, ако се използва хлороформ. Към остатъка от разтвора се прибавя около 20 мл хлороформ, след това се прибавя известно количество толуен, което е в количество, приблизително равно на обема на първоначалния разтвор, в резултат на което се образува утайка под формата на значително количество игловидни кристалчета.

16. *Дициклохексиламин* - Към 46 мл изходен разтвор, получен по описания по-горе начин в 1а се прибавя дициклохексиламин (1.18 гр). В резултат на това се получава бистър разтвор. Към една аликвотна част се прибавя ацетон и се образува фина аморфна утайка.

16. *Амоняк* - Към 500 мл изходен разтвор, получен по описания в 1а начин по-горе, се прибавя амоняк (21.1 мл от 2.5М амониев 2-етилксаноат в етилов ацетат, т.е. приблизително един еквивалент). Прибавя се 50 мл. индустриален метилиран спирт (IMS), в резултат на което се образува готова утайка от финни иглички. Наблюдава се, че при използването на непречистен разтвор от клавуланова киселина, както личи от цвета на разтвора, значително количество цветни остатъци остават в разтвора. Добив 75%.

1г. *N,N - Диметилциклохексиламин* - Към 500 мл изходен разтвор, получен по описания начин в 1а по-горе, се прибавя N,N - диметилциклохексиламин (6.7 мл). Още в началото на добавянето, се образува маслоподобно вещество. Постепенно се прибавя ацетон (150 мл), в резултат на което се образува облак в разтвора. От този облак се взема една аликвотна част и към нея се прибавя диетил етер, в резултат на което се извършва

8

кристализиране. Към основния обем от разтвора се прибавя диетилов етер (100 мл), в резултат на което следва процес на непосредствено кристализиране. Кристалите (13.4 гр) се филтрират и промиват с ацетон.

1g. *t*-октиламин - Към 500 мл от изходния разтвор, получен по описания в 1а начин, по-горе, се прибавя *t*-октиламин (6.7 гр). Разтворът леко помътнява. Прибавя се ацетон (20 мл), който избистря разтвора. Към една аликвотна част от разтвора се прибавя диетилов етер, в резултат на което протича процес на непосредствено кристализиране. Към основния обем от разтвора се прибавя диетилов етер (55 мл), в резултат на което протича процес на кристализация. Кристалното вещество се филтрува и се промива с ацетон. Полученият продукт (12.9 гр) представлява 77% извличане на клавулановата киселина от разтвора.

1e. *Бензатин* - Бензатинов диацетат (9.16 гр) се разбърква с воден разтвор на натриев хидроокис (5N, 10.15 мл). Водният разтвор се екстрахира с етилов ацетат (55 мл) и екстрактът се прибавя към изходния разтвор от клавуланова киселина, получен по описания начин в 1а, по-горе (1.0 л). Първоначално се образува маслоподобно вещество. Прибавя се ацетон (600 мл) и се образуват кристалчета (прибавят се около 10 мл диетилов етер, който представлява утайка от опит проведен в епруветка). След това се прибавя метилизобутилов кетон (200 мл) и след това се долива ацетон до получаване на количество 2 л от сместа. Образованите кристалчета се филтрират и се промиват



с ацетон. Полученият продукт 11.5 гр представлява 59.1% извличане на клавулановата киселина.

Пример 2

Разтвор от клавуланова киселина в етилов ацетат (около 20 мкгр/мл) се разтваря в равно количество ацетон. След това се прибавя разтвор от t - октиламин (еквивалентен на 1.25 мола) под формата на капки в продължение на половин час при температура 10°C. След допълнително разбъркване в продължение на един час, утаените кристалчета се събират, промиват се с ацетон и се изсушават под вакуум.

Образува се госта лесно утайка с бял цвят. Добив (при корегирана чистота) = 76%.

Пример 3

Към непречистен разтвор от клавуланова киселина, (500 мл, 21 мкгр/мл), съдържащ допълнително ацетон (20 мл) се прибавя t - октиламин (7.6 гр, 1.0 напр.), от което се получава леко помътняване. Прибавянето на диетилов етер (55 мл) води до отделяне на аминовата сол под формата на финни бели ивички, които се филтруват и промиват с ацетон. Добив - 12.9 гр, 77.2% възстановяване, 62.8% рфа (теоретично = 60.6%).

Пример 4

Непречистен воден разтвор на клавуланова киселина, получен от ферментационен бульон на *S. clavuligerus* при предварително пречистване, включващо йонообменна хроматография или описания в общи линии по-горе начин,

съдържащ около 17.1 гр/л се подкислява до pH 2.0 с 25% обемни сярна киселина и след това се подлага на продължителна екстракция с етилов ацетат. Екстрактът от етилов ацетат се охлажда до температура 2°C, от него се отстранява водата чрез центрофугиране и след това се изсушава с магнезиев сулфат и след това преминава през въглен намиращ се в колона на CPG. На този етап, екстрактът от етилов ацетат съдържа 6.02 гр/л клавуланова киселина и след това чрез изпаряване се концентрира до 25.7 гр/л клавуланова киселина, като се използва при тази концентрация. Нивото на влажност на концентрата е около 0.26% обемни.

7.8 мл от t - октиламин се смесва с 25 мл пресен етилов ацетат. Тази смес се прибавя бавно към 2 л екстракт от етилов ацетат, богат на клавуланат и отново се разрежда до получаване на титър от 23.0 гр/л с пресен етилов ацетат, като се разбърква енергично. Кашата се разбърква в продължение на още един час при температура 5°C. t - октиламиновият клавуланат се изолира последователно чрез филтруване и се промива с етилов ацетат. Крайното изсушаване се извършва в продължение на една нощ във вакуумна пещ при температура 20°C чрез продухване с азот. Маса на продукта = 6.13 гр.

Пример 5

Филтриран (RVF) *S. clavuligerus* от ферментационният бульон, съдържащ 2 гр/л клавуланова киселина се подкислява до pH 1.6 с 25% обемни сярна



киселина и подлага на непрекъснато екстрахиране с етилов ацетат. Екстрактът от разтворител се охлажда до температура 3°C и след това от него се отстранява водата чрез центрофугиране, изсушава се с магнезиев сулфат и преминава през въглен намиращ се в колона СРG. Обработеният с въглерод екстракт се концентрира чрез изпаряване до концентрация на клавуланова киселина около 20 гр/л , със съдържание на влага около 0.06% обемни.

13.5 мл от t - октиламин се смесва с 43 мл пресен етилов ацетат. Тази смес се прибавя бавно към 400 мл екстракт от етилов ацетат, богат на клавуланат до получаването на титър от 20 гр/л клавуланова киселина при енергично разбъркване. Кашата се разбърква допълнително още един час при температура 5°C. t - октиламиновият клавуланат се изолира съответно чрез филтруване и се промива с етилов ацетат. Окончателното изсушаване се извършва в продължение на една нощ във вакуумна пещ при температура 20°C чрез продухване с азот. Маса на продукта = 12.44 гр.



ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за получаване и/или пречистване на клавуланова киселина или нейна фармацевтично приемлива сол, характеризиращ се с това, че се състои от:

i - включване на непречистена клавуланова киселина или нейно неустойчиво производно в разтвор на органичен разтворител с терциерен октиламин;

ii - изолиране на образуваната терциерна октиламинова сол на клавулановата киселина;

iii - превръщане на така образуваната сол в клавуланова киселина или нейна фармацевтично приемлива сол или естер.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че неустойчивото производно на клавулановата киселина е сол на алкален метал.

3. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че солта на алкалния метал е натриева или литиева сол.

4. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 3 характеризиращ се с това, че органичният разтворител е по същество сух.

5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че органичният разтворител съдържа по-малко от 6 гр/л вода.

6. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че органичният разтворител съдържа между 0.25 и 0.6 гр/л вода.

7. Метод съгласно всяка една от претенции 4 - 6 характеризиращ се с това, че органичният разтворител е

изсушен чрез обезводняването му посредством центрофугиране.

8. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 7 характеризиращ се с това, че непречистената клавуланова киселина е резултат от ферментацията на клавуланова киселина - произвеждаща микроорганизъм.

9. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че поне суспендираните твърди частици в бульона от непречистена клавуланова киселина са отгелени.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че твърдите частици са отгелени чрез филтруване.

11. Метод съгласно всяка една от претенции 8 - 10 характеризиращ се с това, че водният разтвор на получената клавуланова киселина при ферментацията е предварително концентриран преди екстракцията.

12. Метод съгласно претенция 11 характеризиращ се с това, че водният разтвор на клавулановата киселина е предварително концентриран до 10 - 100 мг/мл.

13. Метод съгласно претенция 11 характеризиращ се с това, че водният разтвор на клавулановата киселина е предварително концентриран до 10 - 40 мг/мл.

14. Метод съгласно претенция 11 характеризиращ се с това, че водният разтвор на клавулановата киселина е предварително концентриран до 10 - 25 мг/мл.

15. Метод съгласно всяка една от претенции 11 - 14 характеризиращ се с това, че процесът на предварителното концентриране чрез абсорбиране на клавулановата киселина от йоно-обменна смола се осъществява посредством елюиране на клавулановата

киселина, по тази причина, с воден разтвор на електролит.

16. Метод съгласно претенция 15 характеризиращ се с това, че електролитът е натриев хлорид.

17. Метод съгласно претенции 15 или 16 характеризиращ се с това, че получения концентрат е обезсолен.

18. Метод съгласно всяка една от претенции 8 - 17 характеризиращ се с това, че бульонът или водният разтвор на клавулановата киселина се подкислява предварително преди селективната екстракция.

19. Метод съгласно претенция 18 характеризиращ се с това, че бульонът или водният разтвор на клавулановата киселина се подкислява до рН от 1 до 3.

20. Метод съгласно претенция 18 характеризиращ се с това, че бульонът или водният разтвор на клавулановата киселина се подкислява до рН от 1.5 до 2.5 .

21. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 20 характеризиращ се с това, че екстракцията на непречистената клавуланова киселина или нейното неустойчиво производно в органичен разтворител се извършва при температура от 5 до 15°C.

22. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 21 характеризиращ се с това, че органичният разтворител използван за екстрахиране на непречистената клавуланова киселина или нейното неустойчиво производно е избран от групата включваща въглеродородни разтворители, етерни разтворители, халогенирани разтворители и кетонни разтворители.

23. Метод съгласно претенция 22 характеризиращ се с

това, че разтворителите са избрани от групата включваща толуен, хексан, тетрахидрофуран, диоксан, диетилов етер, дихлорометан, хлороформ, ацетон, метил изобутил кетон и етилов ацетат.

24. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 23 характеризиращ се с това, че терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се образува чрез третиране на клавулановата киселина или нейното неустойчиво производно в органичен разтворител с еквивалентно молно количество или слаб излишък от терциерен октиламин.

25. Метод съгласно претенция 24 характеризиращ се с това, че терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се образува при температура от 0 до 15°C.

26. Метод съгласно претенция 24 или 25 характеризиращ се с това, че терциерният октиламин се въвежда чрез смесването му, в потока от клавуланова киселина, с органичния разтворител.

27. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 26 характеризиращ се с това, че изолирането на терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се осъществява чрез екстракция на органичния разтворител, съдържащ терциерната октиламинова сол, с вода за да се екстрахира солта и след това следва превръщане на терциерната октиламинова сол в клавуланова киселина или нейната фармацевтично приемлива сол или естер.

28. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 27 характеризиращ се с това, че терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се рекристализира.

29. Метод съгласно претенция 28 характеризиращ се с това, че терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина рекристализира, като се използва воден разтвор на ацетон.
30. Метод съгласно всяка една от претенции 1 - 29 характеризиращ се с това, че терциерната октиламинова сол на клавулановата киселина се превръща в нейната фармацевтично приемлива сол чрез йонно заместване.
31. Метод съгласно претенция 30 характеризиращ се с това, че йонното заместване се осъществява чрез пропускане на разтвор от терциерна октиламинова сол през слой от катион обменна смола до образуване на натриева, калиева или калциева форма.
32. Метод съгласно претенция 30 характеризиращ се с това, че йонното заместване се осъществява чрез протониране на терциерния октиламинов катион със сол на предшестващо съединение.
33. Метод съгласно претенция 32 характеризиращ се с това, че солта на предшестващото съединение е калиев етил хексаноат.
34. Метод съгласно всяка една от претенции 30 - 33 характеризиращ се с това, че разтворителят е органичен разтворител, вода или смес от вода и органичен разтворител.
35. Метод съгласно всяка една от претенции 30 - 33 характеризиращ се с това, че реакцията се осъществява при температура по-малка от тази на околната среда.
36. Метод съгласно претенция 35 характеризиращ се с това, че реакцията се осъществява при температура от 0 до 10°C.

37. Метод съгласно претенция 36 характеризиращ се с това, че реакцията се осъществява при температура от 0 до 0.5°C.