

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 187 361

A bejelentés napja: (22) 81. 02. 04.

(21) 262/81

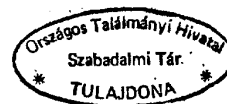
A bejelentés elsőbbsége: (33) (32) (31)
US 80. 02. 04. (118 408)

A közzététel napja: (41) (42) 1983. 04. 28.

Megjelent: (45) 1988. 05. 31.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄

C 12 P 19/50
C 12 P 19/52



Feltaláló(k): (72)

HARRISON Roger Gordon, Kalamazoo, PRITCHARD Thomas
Herbert, Portage, Michigan, US

Szabadalmaz: (73)

The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, US

(54)

ELJÁRÁS AMINOGLÜKOZID ANTIBIOTIKUMOK ELKÜLÖNÍTÉSÉRE

(57) KIVONAT

A találmány tárgya nagy hatékonyságú új eljárás amorf (nem kristályos) aminoglükózid antibiotikum-sók, nevezetesen gentamicin-, neomicin- és sziszomicin-szulfát, -klorid és -nitrát kicsapására a tisztítási eljárás során. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy az aminoglükózid antibiotikum-sók vizes oldatát 400 mg/ml és az aminoglükózid antibiotikum oldhatósági határa közötti szárazanyag-tartalomra betöményítik, majd az így kapott vizes koncentrátumot keverés közben hozzáadagolják valamely vízzel elegyedő rövidszénláncú alifás alkohol 4-10-szeres térfogatú mennyiségéhez, és ki-nyerik az aminoglükózid antibiotikum-só amorf csapadékát.

A találmány tárgya új eljárás amorf gentamicin, neomicin és sziszomicin aminoglükózid antibiotikum szulfátjának, kloridjának, és nitrátjának a kicsapására e sók vizes oldatából. A gentamicin, a neomicin és a sziszomicin aminoglükózid antibiotikumok a hasznos antibiotikumok egyik közismert osztályát alkotják. A gentamicin fermentációját és kinyerését a 3 091 752 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik. A neomicin fermentációját és kinyerését a 2 799 620 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik. A sziszomicin előállításának ismertetése a J. Antibiotics, Vol. 23, 555 (1970) szakirodalmi helyen található.

Kinyerésük és tisztításuk során a fenti aminoglükózid antibiotikumokat általában sóikká alakítják át. Például a gentamicint előnyösen szulfáttá alakítják. A gentamicin-szulfát előállítását a 3 091 572 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik. Az ilyen eljárások kulcsfontosságú lépése a gentamicin-szulfát kicsapása vizes oldataiból. E kicsapási lépés hatékonysága – amely közvetlen összefüggésben áll egy bizonyos kívánt szemcsemérettel – nagy hatással van a tisztítási eljárás hatékonyságára. A 3 091 572 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett eljárásban a gentamicin-szulfát 4,5 pH-jú vizes oldatát metanolhoz adják. A szabadalmi leírás a kulcsfontosságú kicsapási lépéssel kapcsolatban nem említi meg egyetlen kritikus jellemzőt sem. Így a leírásban csak az a kitanítás szerepel, hogy a kicsapási lépésben egy 40 g/l szárazanyagtartalmú vizes gentamicin-szulfát oldatot, valamint az említett oldat 1 térfogatrészeére számítva 10 térfogatrész metanolt használnak. Egy későbbi publikációban [Rosselet, J. P. és munkatársai, „Isolation, Purification and Characterization of Gentamicin”, Antimicrob. Agents Chemother., 14–16 (1963)] is hasonló feltételeket ismertetnek a gentamicin-szulfát kicsapására. Ezen túlmenően a 3 651 042 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban is olyan eljárást ismertetnek, amelynek során a fenti körülmények mellett dolgoznak, és az eljárásban a gentamicin komplex 250 mg/ml szárazanyagtartalmú vizes oldatát használják. Az említett megoldások a jelenleg ismert legjobb eljárásokat képviselik. A megoldások egyikében sem található kitanítás – még kevésbé felismerés – a szemcseméret kritikus voltáról a kulcsfontosságú kicsapási lépésben. Az eddig ismert eljárásokban az említett felismerés hiánya alátámasztja a találmány szerinti megoldás nem kézenfekvő voltát.

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy egy, az eddigi ismeretekkel ellentmondásban álló eljárással igen előnyös szemcseméret érhető el. Ezek szerint, ha a fenti aminoglükózidok nagy töménységű vizes oldatát keverés közben hozzáadjuk egy alkoholhoz, akkor igen előnyös méretű, könnyen szűrhető szemcséket kapunk. Ezzel az eljárással olyan szemcséket kapunk, amelyek legalább négyszer olyan gyorsan szűrhetők, mint az eddig ismert legjobb eljárásokkal kinyert szemcsék.

Ha a fenti aminoglükózid antibiotikumok bármelyikének nagy töménységű vizes oldatát keverés közben hozzáadjuk egy vízzel elegyedő alkoholhoz,

könnyen szűrhető aminoglükózid antibiotikum-só szemcséket kapunk. Például ha gentamicin-szulfát 400–960 mg/ml szárazanyagtartalmú vizes oldatának 1 térfogatrészt hozzáadjuk 4–10 térfogatrész metanolhoz, kívánt szemcseméretű gentamicin-szulfát csapadékot kapunk.

Mint már említettük, a gentamicin-koncentrátum szilárdanyagtartalma mintegy 400 mg/ml és 960 mg/ml között változhat. A szakemberek számára azonban kitűnik, hogy az alsó koncentrációhatár jóval magasabb az eddig ismert eljárásokban alkalmazottaknál. Észrevehető továbbá, hogy a felső határ a gentamicin-szulfát oldhatósági határa. Ezekből a tényekből könnyen levonható az a következtetés, hogy a neomicin és a sziszomicin antibiotikumok is hasonlóképp alkalmazhatók oldhatósági határukat megközelítő magas koncentrációkban.

Jóllehet az eddigiekben csak a metanolt említettük példaként, kézenfekvő, hogy bármilyen vízzel elegyedő rövidszénláncú alifás alkohol, például etanol és propanol is használható.

Aminoglükózid antibiotikum-sók alatt a leírásban szulfátokat, hidrokloridokat és nitrátokat értünk.

Az alábbiakban példákkal mutatjuk be a találmány szerinti eljárást anélkül, hogy az oltalmi kört ezekre korlátoznánk.

1. példa

Gentamicin-szulfát előállítása

A gentamicin-szulfát vizes koncentrátuma például a 3 091 572 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 4. példájában ismertetett módon állítható elő. A gentamicin-szulfát oldat szilárdanyagtartalmát akár betöményítéssel, akár vízzel hígítva körülbelül 600 mg/ml-re állítjuk be. E vizes koncentrátum 1 térfogatrészt keverés közben hozzáadjuk 5 térfogatrész metanolhoz. A hozzáadást 30 perc alatt hajtjuk végre szobahőmérsékleten. A gentamicin-szulfát képződő amorf csapadékát üvegszűrőn könnyen leszűrjük. A szűrési sebesség 12,5 g/cm² · óra volt.

A termék oldható vízben, piridinben, dimetilformamidban és híg savakban; oldhatatlan éterben, benzolban és halogénezett szénhidrogénekben.

A termék adatai: $[\alpha]_D^{25} = +102^\circ$; op.: 218–237 °C.

2. példa

Neomicin-szulfát előállítása

A neomicin-szulfát vizes koncentrátuma például a 2 799 620 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetettek szerint állítható elő. A neomicin-szulfát vizes oldatának szilárdanyagtartalmát betöményítéssel vagy vizes hígítással körülbelül 600 mg/ml-re állítjuk be. Ezt a vizes koncentrátumot 30 perc leforgása alatt szobahőmérsékleten keverés közben hozzáadjuk 5-szörös térfogatú metanolhoz. A neomicin-szulfát képződő amorf csapadékát üvegszűrőn könnyen leszűrjük.

A termék oldható vízben, kevésbé oldható meta-

nalban, etanolban, izopropanolban, izoamilalkoholban, ciklohexánban és benzolban, gyakorlatilag oldhatatlan acetonban, éterben és kloroformban.

A termék adatai: $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ$; op.: 256°C (bomlással).

3. példa

Az 1. és 2. példákban ismertetett eljárásokat követve a vizes oldat szilárdanyagtartalmát 400 mg/ml-től az aminoglükózid antibiotikum oldhatósági pontjáig változtathatjuk; a metanolt etanollal vagy propanollal helyettesíthetjük; az alkohol térfogatarányát 4 és 10 között változtathatjuk (térfogatrész alkohol/térfogatrész vizes oldat); és a hozzáadagolás idejét 30 perc és 4 óra között változtathatjuk. Így módon megkapjuk a kívánt, könnyen szűrhető aminoglükózid antibiotikum szulfát szemcséket.

4. példa

Az előző példák szerint járunk el, de aminoglükózid antibiotikumként sziszomicint használunk. Így módon az antibiotikumsónak olyan csapadékát kapjuk, amely a rákövetkező szűrési lépés szempontjából a kívánt szemcsemérettel rendelkezik.

Mint már említettük, bármelyik aminoglükózid antibiotikum-só lehet szulfátsó, hidrokloridsó vagy nitrátsó. Így a sók előállításakor a megfelelő savat – kénsavat, sósavat vagy salétromsavat – használjuk.

5. példa

Gentamicin-szulfát előállítása

18 ml ásványtalanított vízhez 40 g 9,46 g/10 g tisztaságú gentamicin-szulfátot adunk, és a kapott szuszpenziót 1 órán át keverjük. A szuszpenzióból 10 ml-t 5 percen át centrifugálunk. Az így kapott tiszta oldat 1 ml-ét ásványtalanított vízzel 100 ml-re hígítjuk, és az így kapott oldatból meghatározzuk az eredeti oldat szilárdanyag-tartalmát. Ez az érték 1040 mg/ml-nek adódott, ami 959,244 mg, vagyis kerekén 960 mg gentamicin-szulfát tartalomnak felel meg.

A centrifugált oldatból 1 térfogatrészt 5 térfogatrész metanolhoz adunk. A hozzáadást szobahőmérsékleten 30 perc alatt hajtjuk végre.

A képződő amorf gentamicin-szulfát csapadékot üvegszűrőn pillanatszerűen le tudjuk szűrni. A szűrési sebesség $38 \text{ g/cm}^2 \cdot \text{óra}$ volt.

Ellenpélda

10,0 g gentamicin-szulfátból 250 mg/ml töménységű vizes oldatot készítünk, majd ebből az oldatból 1 térfogatrészt keverés közben 5 térfogatrész metanolhoz adunk. A hozzáadást szobahőmérsékleten 30 perc alatt hajtjuk végre.

A képződő amorf gentamicin-szulfát csapadék üvegszűrőn csak lassan szűrhető. A szűrési sebesség $0,8 \text{ g/cm}^2 \cdot \text{óra}$ volt.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás amorf gentamicin, neomicin és sziszomicin aminoglükózid antibiotikum szulfátjának, hidrokloridjának vagy nitrátjának a kicsapására e sók vizes oldatából, a kicsapott amorf sók szűrési sebességének az ismert eljárásokkal kapott sók szűrési sebességéhez képest legalább négyszeres értékre való növelése mellett, ahol a vizes oldatot keverés közben hozzáadagoljuk valamely vízzel elegyedő rövidszénláncú alifás alkohol 4–10-szeres térfogatú mennyiségéhez, és kinyerjük az antibiotikum-só amorf csapadékát, *azzal jellemezve*, hogy a vizes oldatot az alifás alkoholhoz való hozzáadagolás előtt 400 mg/ml és az aminoglükózid antibiotikum oldhatósági határa közötti szárazanyagtartalomra betöményítjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja amorf gentamicin-szulfát kicsapására annak vizes oldatából, *azzal jellemezve*, hogy a vizes oldatot 400–960 mg/ml szárazanyagtartalomra töményítjük be.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a vizes oldatot mintegy 600 mg/ml szárazanyagtartalomra töményítjük be.

Rajz nélkül