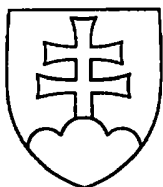


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **3. 2. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/118 447**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **3. 2. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 4. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **4/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/02824**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/46388**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1090-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

**C12P 17/00,
C12P 17/02**

(71) Prihlasovateľ: **BIOGAL Gyógyszergyár RT., Debrecen, HU;**

(72) Pôvodca: **Barta Istvan, Budapest, HU;**
Tegdes Aniko, Budapest, HU;
Szell Valeria, Budapest, HU;
Szabo Csaba, Debrecen, HU;
Nagy nee Arvai Edit, Debrecen, HU;
Keri Vilmos, Debrecen, HU;
Leonov David, Rehovat, IL;
Lang Ildiko, Budapest, HU;
Bidlo nee Igloy Margit, Budapest, HU;
Jerkovich Gyula, Budakeszi, HU;
Salat Janos, Budapest, HU;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob izolácie kyseliny pseudomonovej z kultivačného bujónu obsahujúceho komplex kyseliny pseudomonovej**

(57) Anotácia:
Spôsob izolácie antibiotickej pseudomonovej kyseliny A farmaceutickej kvality z kultivačného bujónu baktérií rodu *Pseudomonas* zahŕňa extrakciu biosyntetizovanej pseudomonovej kyseliny A z kultivačného bujónu pri kyslom pH použitím chlórovaného alifatického uhľovodíku alebo izobutylacetátu a následnú purifikáciu. Purifikácia izolovanej pseudomonovej kyseliny A zahŕňa (a) rozdelenie zvyšku odpareného extraktu medzi vodno-alkoholovú fázu a niektorý alifatický alebo aromatický uhľovodík, a potom extrakciu vodu obsahujúcej vodno-alkoholovej fázy metylénchloridom, etylacetátom alebo izobutylacetátom; (b) extrakciu extraktu vodným roztokom hydrogenuhličitanu amónneho, hydroxidu alkalického kovu alebo roztokom hydroxidu amónneho a okyslenie získaného vodného alkalického extraktu, potom opäť reextrakciu chlórovaným alifatickým uhľovodíkom alebo izobutylketónom; (c) koncentrovanie extraktu a rekryštalizáciu kryštalickej pseudomonovej kyseliny A v zmesi izobutylacetátu a petroléteru alebo acetonitrilu, alebo vodného acetonitrilu.

SK 1090-2001 A3

- 1 -

01-2415-01-Ce

PV 2001-2725

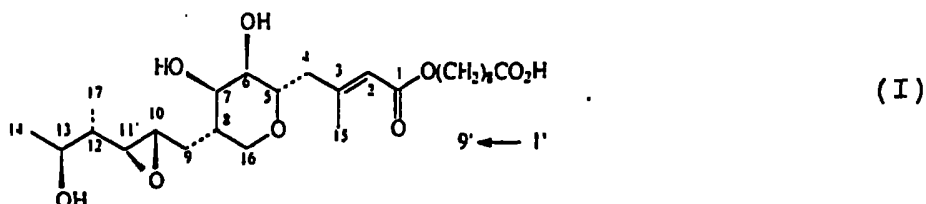
Spôsob izolácie kyseliny pseudomonovej z kultivačného bujónu obsahujúceho komplex kyseliny pseudomonovej

Oblasť techniky

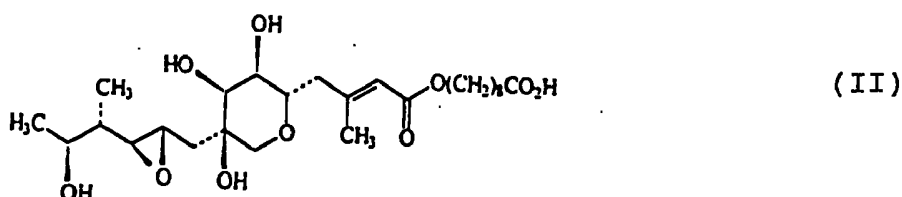
Predložený vynález sa týka spôsobu izolácie pseudomonovej kyseliny A (mupirocín) z kultivačného bujónu obsahujúceho komplex pseudomonovej kyseliny.

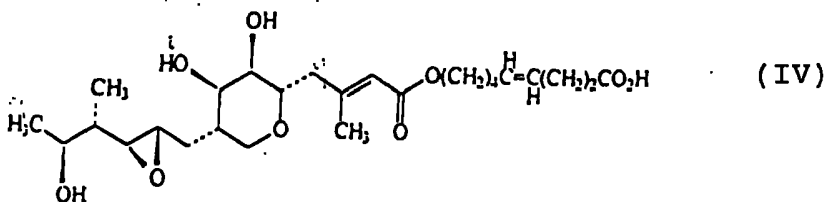
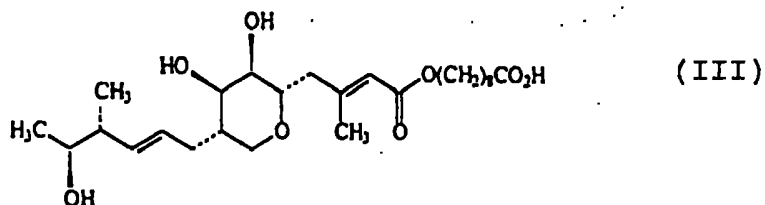
Doterajší stav techniky

Pseudomonová kyselina A, tiež známa ako mupirocín, je antibiotikom, ktorý má vzorec (I) :



Je známe, že reťazce *Pseudomonas fluorescens* sú schopné biosyntézy, okrem pseudomonovej kyseliny A ďalšie príbuzné antibiotiká označené písmenami B-D v malých množstvách [E.B. Chain, G. Mellows. J. Chem. Soc. Perkin Trans I. 318 (1977); J.P. Clayton a kol., Tetrahedron Lett., 21, 881 (1980); P.J.O.Hanlon, N.H. Rogers, J.Chem. Soc. Perkin Trans I.2665 (1983)], reprezentované vzorcami (II) - (IV), konkrétne :





Medzi antibiotiká pseudomonovej kyseliny je z terapeutického hľadiska najhodnotnejšia pseudomonová kyselina A, ktorá má veľký inhibičný účinok najmä proti grampozitívnym baktériam (ako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*) a niektorým gramnegatívnym baktériam (ako je *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) a jej minimálna inhibujúca koncentrácia je v rozpätí 0,02-0,5 mg/dm³. Pseudomonová kyselina A má inhibíciu izoleucín-tRNA syntézového enzýmu vplyv na syntézu peptidov patogénnych baktérií [J. Hughes a G. Mellows, *Biochem. J.* 191, 209-219, (1980)]. Výhodným znakom tohoto antibiotika je to, že je menej toxické ako pre ľudí, tak zvieratá a je negatívne v Ames teste. Pseudomonová kyselina A je v súčasnosti užívaná pri liečbe ľudí, v rôznych prostriedkoch, na liečenie kožných infekcií (ako je impetigo, pyoderma), nosných infekcií a infekcií vonkajšieho ucha, akné, popálenín, ekzémov, psoriázy, v prípade ulcerácie na liečenie sekundárnych infekcií, a na prevenciu nemocničných infekcií.

Jednou z metód izolácie pseudomonovej kyseliny A z kultivačného bujónu obsahujúceho antibiotický komplex je kvapalino-kvapalinová extrakcia. Podľa nemeckého patentu DE 2 227 739 a amerického patentu US 4 289 703 sú rozpustné soli bária pridávané do fermentačného bujónu, potom sú bunky mikroorganizmu s nerozpustným inaktivačným činidlom separované odstredením a nakoniec sú antibiotiká extrahované metylizobutylketónom. Potom sú antibiotiká odobraté z metylizobutylketónového extraktu alkalickou vodou a získaný alkalický vodný extrakt je čistený reextrakciou s metylizobutylketónom. Získaný surový produkt je podrobený chromatografii, a z komplexu antibiotík pseudomonovej kyseliny je pripravený esterový derivát, a je purifikovaný preparatívnou tenkovrstvou chromatografiou. Kyselinová forma čistého antibiotika je získaná hydrolýzou.

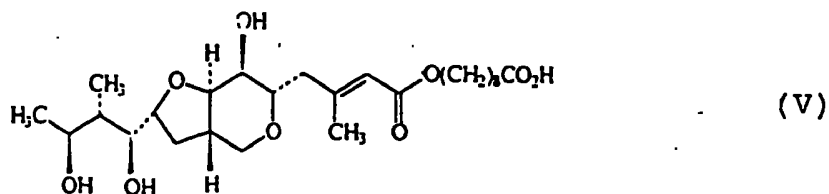
Belgický patent č. 870 855 sa týka spôsobu, kedy je kultivačný bujón extrahovaný metylizobutylketónom a z extraktu je účinná látka extrahovaná roztokom hydrogénuhličitanu sodného. Materiály nerozpustné v alkalickvej vode sú separované filtráciou, potom je pH filtrátu okyselené a filtrát je extrahovaný metylizobutylketónom. Nakoniec je pseudomonová kyselina A získaná koncentrovaním extraktu a kryštalizáciou zo zmesi metylizobutylketón-n-heptánu.

Japonský patent 52-70083 sa týka dvoch metód získania pseudomonovej kyseliny z kultivačného bujónu. Podľa jednej z týchto metód sú bunky baktérií separované z kultivačného bujónu odstredením, potom je účinná látka extrahovaná zo supernatantu etylacetátom. Potom je komplex pseudomonovej kyseliny reextrahovaný z etylacetátovej fáze roztokom hydrogénuhličitanu sodného a po okyselení je opäť extrahovaný etylacetátom. Po odparení je zvyšok purifikovaný na silikagélovej kolóne za použitia eluens chloroformmetanolu, a nakoniec je čistá pseudomonová kyselina A získaná kryštalizáciou z

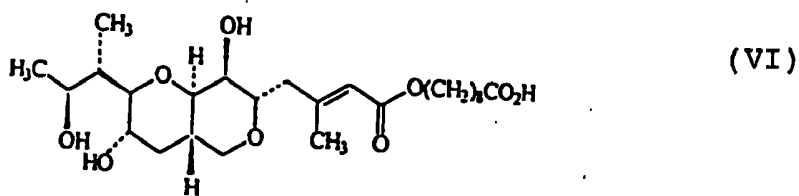
diizopropyléteru. V inom postupe surový produkt získaný uvedeným postupom je podrobený chromatografii na DEAE - Sephadex aniontovej výmennej kolóne za použitia eluens metanol-amonium a frakcie obsahujúce pseudomonovú kyselinu A sú oddelené.

A.D. Curzons popisuje odobratie kyseliny pseudomonovej A z kultivačného bujónu vytvorením lítnej soli (Európsky patent č. 0 005 614). Metylizobutylketónový extrakt obsahujúci účinnú látku získaný pri pH 4,5 reaguje s lítium-2-etyl-hexanoátom rozpusteným v metanole. Vyzrážaná lítna soľ pseudomonovej kyseliny A je oddelená, rozpustená vo vode a pseudomonová kyselina A uvoľnená pri pH 4,5 je extrahovaná v metyлизobutylketóne a vyzrážaná za prítomnosti n-heptánu.

V postupoch diskutovaných vyššie sú polárne a s vodou nemiešateľné rozpúšťadlá (metylizobutylketón, etylacetát, n-butanol) použité pre odobratie komplexu pseudomonovej kyseliny z kultivačného bujónu. Podľa našej skúsenosti nemôže byť pri použití týchto postupov úspešne realizovaná selektívna extrakcia, pretože okrem komplexu pseudomonovej kyseliny sú tiež vo väčších množstvách extrahované iné polárne a nepolárne nečistoty. Pseudomonová kyselina A môže byť získaná v čistej forme iba s nízkym výťažkom (17-34 %) alkalickou extrakciou organických rozpúšťadiel obsahujúcich nečistoty vo väčších množstvách, potom reextrakciou organickým rozpúšťadlom pri kyselom pH, a potom kryštalizáciou surového produktu. Použitie chromatografických postupov na purifikáciu nie je výhodné vo výrobnom merítku, pre ich vysoké pracovné náklady a požiadavky na rozpúšťadlo. Navyiac za prítomnosti chromatografických adsorbentov a počas chromatografických postupov dochádza v účinnej látke k intramolekulárnym transformáciám, čo vedie k vytvoreniu biologicky neaktívnej bicyklickej zlúčeniny 9-{4-[1S,6R-8R (1S, 3S-dihydroxy-2S-metyl-butyl)-5S-hydroxy-3,7-dioxabicyklo [4.3.0]nonan-4S-yl]-3-metyl-but-2(E)-enoyloxy} - nonánová kyselina (vzorec V)



a zlúčeniny 9-{4-[1S, 6S-4S, 10S-dihydroxy-3R-(2S-hydroxy-1S-metyl-propyl)-2,8-dioxabicyklo [4.4.0]dekan-9S-yl]-3-metylbut-2(E)-enoyloxy}nonánová kyselina (vzorec VI).



Vznik týchto zlúčenín a ich eliminácia prostredníctvom rekryštylizácie značne redukuje získaný výťažok pseudomonovej kyseliny A.

Aj keď postup izolácie cez medziprodukt lítnej soli pseudomonovej kyseliny A neobsahuje žiadny chromatografický stupeň, nie je zvyčajným pre výrobu v rozsiahlom merítku, pretože lítna soľ použitá v postupe, robí tento postup komplikovaný a drahý pre použitie vo výrobnom rozsahu.

Preto je teda nutnosť v stave techniky nájsť nový postup izolácie antibiotika pseudomonovej kyseliny A, ktorý by bol bez nevýhod a známych postupov a ktorého aplikácia vo výrobnom merítku by priniesla veľký výťažok získaného vyššie uvedeného antibiotika.

Podrobný popis vynálezu

Prekvapujúco bolo zistené, že pseudomonová kyselina A môže byť účinne a selektívne extrahovaná po okyselení ako z celého bujónu obsahujúceho mikrobiálne bunky, tak aj zo supernatantu získaného po separácii buniek, prostredníctvom chlorovaných alifatických uhľovodíkov, potom môže byť väčšina inaktívnych nečistôt doprevádzajúcich pseudomonovú kyselinu A eliminovaná zo surového produktu po odparení uvedeného extraktu rozdelením odpareného zvyšku medzi vodno-alkoholový roztok a alifatický uhľovodík, potom medzi vodný alkohol a aromatický uhľovodík. Výhodný alkohol je metanol. Použitím tohoto postupu môže byť zo surového produktu získaná pseudomonová kyselina A v medicínalnej kvalite po rekryštalizácii z izobutylacetátu, acetonitrilu alebo zmesi voda-acetonitril.

Podľa výhodného postupu predloženého vynálezu sú počas izolácie antibiotickej pseudomonovej kyseliny A bunky mikroorganizmu separované pri temer neutrálnom pH odstredením. Po odstredení kultivačného bujónu pri skoro neutrálnom pH je väčší podiel pseudomonovej kyseliny A v supernatante a môže byť odobratý extrakciou zo supernatantu, prednostne pri pH 4,5. Prednostne je extrakcia antibiotika uskutočnená chlorovaným alifatickým uhľovodíkom, najvýhodnejšie metylénchloridom.

Primárna purifikácia pseudomonovej kyseliny A v metylénchloridovom extrakte sa môže uskutočniť za použitia distribúčnej separácie. Možné pigmenty a kvapalné nečistoty surového produktu môžu byť oddelené distribúciou medzi 10 % vody obsahujúcej zmes voda-alkohol a alifatický uhľovodík, ako je n-hexán alebo n-heptán. Väčší podiel nepolárnych inaktívnych nečistôt lipidového typu je prevedený do n-hexánovej alebo n-heptánovej fáze. Zvýšením obsahu vody vodno-metanolovej fáze na 25 % a jej extrakciou za použitia aromatického uhľovodíku, prednostne za použitia toluénu, môžu byť viacej polárne

neaktívne nečistoty eliminované zo surového produktu.

Zvýšením obsahu vody vo vodno-metanolovej fázi na 50 % a jej extrakciou rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou, prednostne metylénchloridom, etylacetátom, metylizobutylketónom, n-butylacetátom alebo izobutylacetátom, a odparením organického rozpúšťadla, je získaný surový produkt obsahujúci pseudomonovú kyselinu A. Pseudomonová kyselina A môže byť oddelená od ďalších zložiek komplexu pseudomonovej kyseliny, vytvoreného počas biosyntézy kryštalizáciou, prednostne za použitia rozpúšťadlovej zmesi metylizobutylketón-n-heptán.

V inom uskutočnení predloženého vynálezu sa môže uskutočniť extrakcia celého bujónu za prítomnosti buniek mikroorganizmu pri pH 4,5 chlorovaným alifatickým uhľovodíkom, prednostne metylénchloridom. Komplex pseudomonovej kyseliny je extrahovaný z metylénchloridového extraktu 2 % roztokom hydrogénuhličitanu sodného a komplex pseudomonovej kyseliny je získaný v kyselej forme z vodnej fáze, prednostne pri pH 4,5, metylénchloridom.

Ďalej sa tiež zistilo, že po okyselení môže byť pseudomonová kyselina A, rozpustená v bujóne a viazaná na bunky biomasy, extrahovaná účinne a selektívne za použitia izobutylacetátu pre extrakciu. Rovnako bolo zistené, že po extrakcii kultivačného bujónu môže byť pseudomonová kyselina získaná z izobutylacetátového extraktu výhodnejšie hydrogénuhličitanom amonným, hydroxidom amonným alebo hydroxidom alkalického kovu. Preferovaným hydroxidom alkalického kovu je hydroxid sodný. Po okyselení uvedených extraktov a ich extrahovaní izobutylacetátom, môže byť získaný koncentrovaný extrakt organického rozpúšťadla, z ktorého sa dá pripraviť kryštalický surový produkt odparením. Po rekryštalizácii z izobutylacetátu, acetonitrilu alebo zmesi voda-acetonitril môže byť pseudomonová kyselina A získaná v

medicinálnej kvalite.

Podľa výhodného uskutočnenia predloženého vynálezu je extrakcia antibiotika z celého bujónu uskutočnená izobutylacetátom, prednostne pri pH okolo 4,5. Aby sa eliminoval vznik emulzie, môže sa použiť deemulgátor, prednostne Armogad D5397 (AKZO Chemicals Ltd., Lancashire, Veľká Británia). Prednostne obsahuje deemulgátor asi 0,1 % v 10 % obj. roztoku izobutylacetátu. Z izobutylacetátového extraktu separovaného na separátore typu Westfalia je komplex pseudomonovej kyseliny odobratý vodným roztokom hydroxidu sodného, a surový produkt získaný po extrakcii pri kyselom pH kryštalizuje zo zmesi petroléteru (bod varu v rozpätí 60° - 95° C) a izobutylacetátu. Získaný produkt je rekryštalizovaný, prednostne z acetonitrilu; postupne je vodný roztok uchovávaný ako zvyšok, potom znovuzískaný po filtrácii.

Na použitie ako východzieho materiálu pre postup podľa predloženého vynálezu je vhodný akýkoľvek kultivačný bujón kmeňa mikroorganizmov rodu baktérií *Pseudomonas*, schopných biosyntetizovať pseudomonovú kyselinu A.

Na kyselé spracovanie buniek mikroorganizmov môžu byť použité minerálne kyseliny, ako je kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a kyselina fosforečná, a organické kyseliny, ako je kyselina octová a kyselina oxalová. Oxalová kyselina a kyselina sírová sú pre daný účel najmä výhodné.

Na konci fermentácie je stanovený presný obsah pseudomonovej kyseliny A a príbuzných zlúčenín vysokotlakou kvapalinovou chromatografiou. Kultivačný bujón je zriedený na dvojnásobok etanolom, je aplikovaný ultrazvuk, odstredený, a supernatan je použitý pre analýzu. Pseudomonová kyselina A a príbuzné zlúčeniny pripravené použitím postupu podľa predloženého vynálezu boli definované nasledujúcimi dobami

retencie : pseudomonová kyselina A vzorca (I) 8,34 min; pseudomonová kyselina B vzorca (II) 6,83 min; pseudomonová kyselina C vzorca (III) 16,8 min; pseudomonová kyselina D vzorca (IV) 6,8 min; menšia zložka vzorca (V) 6,55 min; menšia zložka vzorca (VI) 6,9 min [prístroj LKB 2248 čerpadlo, LKB 2157 auto-vzorkovač, LKB 2155 kolóna, LKB 2141 UV detektor, analýzy pri 222 nm, kolóna : Nucleosil C₁₈ 10 mikrometrov (BST), eluens : zmes (35:65) acetonitrilu a vodného roztoku 0,1 M NaH₂PO₄ (pH = 4,2), prietoková rýchlosť 1,0 ml/min].

Štruktúra izolovanej pseudomonovej kyseliny bola stanovená metódami UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR a hmotovej špektroskopie. Pseudomonová kyselina A, pripravená podľa predloženého vynálezu, bola identická s polymorfnou formou I publikovanou v medzinárodnom patente WO92/10493.

Postup podľa predloženého vynálezu je doložený nasledujúcimi príkladmi. Avšak, predložený vynález by tým nemal byť obmedzený.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Hodnota pH piatich litrov kultivačného bujónu so 1200 µg/ml mupirocínu bola upravená za kontinuálneho miešania na 4,5 prostredníctvom 20 % kyseliny sírovej (60 ml). Okyselená tekutina bola extrahovaná 2,5 litra metylénchloridu. Potom boli fáze separované a ostrá fáza bola pripravená z emulgovanej organickej fáze odstredení. Podľa predchádzajúceho kroku bol kultivačný bujón extrahovaný dvakrát opäť 1,25 litra metylénchloridu. Spojené metylénchloridové extrakty boli premyté s 1,25 litra deionizovanej vody. Fáze boli oddelené a, pri teplote pod 20° C, bol extrahovaný metylénchloridový extrakt najprv 0,5 litra a potom 0,25 litra 2 % roztoku

hydrogénuhličitanu sodného. Fáze boli oddelené a extrakty boli spojené. Spojené extrakty boli ochladené pod 20° C a pH extraktu bolo upravené za kontinuálneho miešania na 4,5 20 % kyselinou sírovou. Získaný kyselý roztok bol extrahovaný jedenkrát s 0,38 litra a jedenkrát s 0,19 litra metylénchloridu. Spojené metylénchloridové extrakty boli premyté s 0,19 litra deionizovanej vody, a potom bol metylénchloridový extrakt čistený pri izbovej teplote dreveným uhlím (0,42 g). Po vyčistení bol metylénchloridový extrakt odparený. Zvyšok po odparení (okolo 8 g) bol rozpustený pri izbovej teplote v 16 ml izobutylacetátu. Za miešania bol roztok ochladený na 0-5° C a miešanie pokračovalo, dokiaľ nebola zahájená kryštalizácia. Potom kryštalizácia prebiehala pri tejto teplote cez noc. Vyzrážaný mupirocín bol odfiltrovaný, premývanie bolo uskutočnené 2 x 4 ml studeným (pod 5° C) izobutylacetátom a 6 ml zmesi (2:1) izobutylacetát-petroléter. Potom boli tieto antibiotiká premyté suspenziou v 2 x 25 ml petroléteri (rozpätie varu 60°-95° C) a sušené za vákua pri 50° C. Získaný mupirocín bol rozpustený pri 40°-45° C v 60 ml izobutylacetátu. Roztok bol ochladený na izbovú teplotu a 60 ml petroléteri (rozpätie varu 60°-95° C) bolo zavádzané po kvapkách do roztoku. Potom prebiehala kryštalizácia pri 0-5° C cez noc. Vyzrážané kryštály boli filtrované a premývanie bolo uskutočnené 2 x 4 ml studenej (pod 5° C) zmesi izobutylacetát-petroléter (1:2). Potom bol produkt premytý jeho suspendovaním v 3 x 20 ml petroléteri. Mupirocín bol sušený vo vákuu pri teplote 50° C do konštantnej hmotnosti. Týmto spôsobom bolo získaných 3,3 g čistého mupirocínu, ktorý má nasledujúce charakteristiky :

Teplota topenia : 73° - 75° C

UV špektrum (10 µg/ml, v 95 % roztoku etanolu) : $\lambda_{\max} = 222 \text{ nm}$
 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 303,6$

IČ špektrum (MBr) : $\nu_{\text{OH}} 3483$ a 3306 , $\nu_{\text{C}=\text{O}} 1728$ (COOCH_2),
 1720 (COOH) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ špektrum (CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) :

δ (ppm)	Priradenie	Interakčná konštanta (Hz)
5.75 (1H)q	2-H	$^4J_{2.15} = 1.1$
4.08 (2H)t	9'-H ₂	$^3J_{8.9} = 6.4$
3.93-3.72 (4H)m	5,7,13-H;16-H _{α}	
3.55 (1H)dd	16-H _{β}	$^2J_{16\alpha-16\beta} = 11.8$; $^3J_{16\beta-8} = 2.6$
3.48 (1H)dd	6-H	$^3J_{2.15} = 8.4$; $^3J_{6.7} = 3.2$
2.82 (1H)td	10-H	$^3J_{9.10} = 6.3$; $^3J_{10.11} = 2.3$
2.74 (1H)dd	11-H	$^3J_{10.11} = 2.3$; $^3J_{11.12} = 7.8$
2.60 (1H)dd	4-H _{α}	$^3J_{4\alpha-4\beta} = 14.5$; $^3J_{4\alpha-5} = 2.7$
2.36-2.28 (3H)m	4-H _{β} ; 2'-H ₂	
2.20 (3H)d	15-H ₃	$^4J_{2.15} = 1.1$
2.02-1.92 (1H)m	8-H	
1.76-1.61 (6H)m	9-H ₂ ; 3'-H ₂ ; 8'-H ₂	
1.43-1.33 (9H)m	12-H; 4'-H ₂ ; 5'-H ₂ ; 6'-H ₂ ; 7'-H ₂	
1.22 (3H)d	14-H ₃	$^3J_{13.14} = 6.4$
0.94 (3H)d	17-H ₃	$^3J_{12.17} = 7.0$

^{13}C -NMR špektrum (CDCl_3 roztok, $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) :

δ (ppm)	Priradenie	δ (ppm)	Priradenie
177.8s	C-1'	42.7t,d	C-9,C-12
166.9s	C-1	39.4d	C-8
156.0s	C-3	33.9t,t	C-9,C-2'
117.7d	C-2	31.6t	C-4'*
74.9d	C-5	28.9t	C-5'*
71.4d	C-13	28.8t	C-6'*
70.4d	C-7	28.5t	C-8'*
69.0d	C-6	25.9t	C-7'
65.3t	C-16	24.6t	C-3'
63.9t	C-9'	20.8q	C-14
61.3d	C-11	19.1q	C-15
55.6d	C-10	12.7g	C-17

* zameniteľné priradenie

Hmotové špektrum

Charakteristické špektrálne dáta :

M/z	RI (%)	Priradenie
501	100	(M + H) ⁺
327	45	(M + H - HO/CH ₂ / ₈ COOH) ⁺
309	16	(M/z 327 -H ₂ O) ⁺
227	33	(C ₁₂ H ₁₉ O ₄) ⁺

Príklad 2

Hodnota pH piatich litrov kultivačného bujónu so 1500 µg/ml mupirocínu bola upravená za kontinuálneho miešania na 4,5 prostredníctvom 20 % kyseliny sírovej. Okyselená tekutina bola extrahovaná 2,5 litra izobutylacetátu. Fáze boli separované a ostrá fáza bola pripravená z emulgovanej organickej fáze odstredením. Podľa predchádzajúceho kroku bol kultivačný bujón extrahovaný opäť 1,25 litru izobutylacetátu. Spojené izobutylacetátové extrakty boli premyté s 1,25 litra deionizovanej vody. Fáze boli oddelené a do izobutylacetátového extraktu bolo pridaných 0,5 litra deionizovanej vody. pH zmesnej fáze bolo upravené na 8,0±0,2 5 % hydroxidom amonným. Fáze boli oddelené a izobutylacetátový extrakt bol opäť extrahovaný s 0,5 litru deionizovanej vody pri pH 8,0±0,2. Spojené alkalické extrakty boli ochladené pod 20° C a pH extraktu bolo upravené za kontinuálneho miešania na 4,5 20 % kyselinou sírovou. Získaný kyselý roztok bol extrahovaný jedenkrát s 0,5 litra a potom jedenkrát s 0,25 litra izobutylacetátu. Spojené izobutylacetátové extrakty boli

premyté s 0,25 litra deionizovanej vody, potom bol izobutylacetátový extrakt čistený pri izbovej teplote dreveným uhlím (0,52 g). Po vyčistení bol izobutylacetátový extrakt koncentrovaný vo vákuu na finálny objem 13 ml. Potom kryštalizácia a rekryštalizácia mupirocínu prebiehala ako v príklade 1. Týmto spôsobom bolo získaných 3,75 g mupirocínu, ktorý má rovnaké fyzikálne vlastnosti, ako je popísané v príklade 1.

Príklad 3

80 litrov kultivačného bujónu s koncentráciou mupirocínu 1000 µg/ml bolo odstredené na super odstredivke typu F-100 (výrobca : Budapesti Vegyipari Gépgyár), potom bolo pH supernatantu upravené na 4,5 prostredníctvom kyseliny oxalovej (okolo 0,69 litru). Okyselený roztok bol extrahovaný dvakrát 24 litrami metylénchloridu, a spojené extrakty boli odparené vo vákuu. Olejový zvyšok (asi 0,14 kg) bol rozpustený v 0,56 litra metanolu obsahujúceho 10 % vody a potom bol roztok extrahovaný dvakrát 0,56 litra n-hexánu. Metanolový roztok bol zriedený deionizovanou vodou na obsah 25 % vody a roztok bol extrahovaný dvakrát 0,56 litra toluénu. Nasledovne bol metanolový roztok zriedený deionizovanou vodou na obsah vody 50 % a roztok bol extrahovaný raz 0,56 litra metylénchloridu, potom raz 0,28 litra metylénchloridu. Spojené metylénchloridové extrakty boli odparené vo vákuu. Po odparení získaný zvyšok (asi 0,11 kg) bol spracovaný podľa postupu v príklade 1, za získania 44 g mupirocínu, ktorý má rovnaké fyzikálne vlastnosti, ako v príklade 1.

Príklad 4

Hodnota pH 160 litrov kultivačného bujónu obsahujúceho mupirocín v koncentrácii 1200 µg/ml bola upravená za kontinuálneho miešenia na $4,5 \pm 0,2$ prostredníctvom 20 %

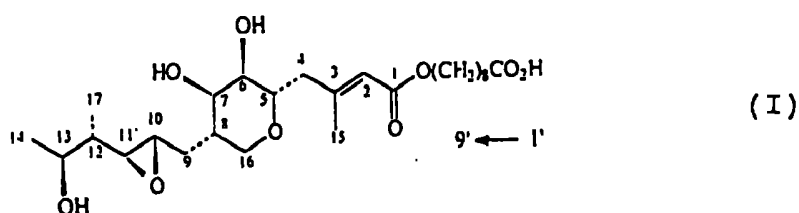
kyseliny sírovej (asi 2,7 litru). Potom bola okyselená tekutina extrahovaná 80 litrami izobutylacetátu. Po 30 minútach miešania bol pridaný 0,1 % deemulgátor (1 g Armogard D5397/liter bujónu v roztoku izobutylacetátu). Fáze boli separované separátorom typu Westfalia SA1-01-175 (Westfalia Separator A.G., Oelde, Nemecko). Kultivačný bujón bol opäť extrahovaný 40 litrami izobutylacetátu a separovaný podľa predchádzajúcich krokov. Izobutylacetátové extrakty boli premyté 40 litrami deionizovanej vody. Premytý izobutylacetátový extrakt bol zmiešaný s 20 litrami deionizovanej vody, a potom bolo pridaných do zmesi 400 ml roztoku 10 % hmotn. roztoku síranu horečnatého ako deemulgátoru. Nasledovne bolo pH vodnej zmesi izobutylacetátu upravené hydroxidom sodným na $8,0 \pm 0,2$. Po 20 minútach miešania boli fáze oddelené a izobutylacetátový extrakt bol opäť extrahovaný pri $pH 8,0 \pm 0,2$. Spojený vodný alkalický roztok bol extrahovaný 12 litrami izobutylacetátu za prítomnosti 800 ml 10 % hmotn. síranu horečnatého. Po oddelení fáz bolo do vodnej fáze pridaných 8 litrov izobutylacetátu, potom bolo pH vodnej izobutylacetátovej zmesi upravené na $4,5 \pm 0,2$ 20 % roztokom kyseliny sírovej. Po 20 minútach miešania boli fáze separované a okyselený roztok bol opäť extrahovaný, ako bolo popísané vyššie. Spojené izobutylacetátové extrakty boli premyté 5 litrami deionizovanej vody za prítomnosti 100 ml 10 % hmotn. roztoku síranu sodného. Fáze boli oddelené a izobutylacetátový extrakt bol odparený vo vákuu na finálny objem 1,1 litra. Izobutylacetátový koncentrát bol zmiešaný so 110 ml petroléteru (rozpätie varu $60^{\circ} - 95^{\circ} C$), a kryštalizácia prebiehala pri $0-5^{\circ} C$ po 24 hodín. Vyzrážané kryštály boli odfiltrované a premyté chladným (pod $5^{\circ} C$) izobutylacetátom. Potom bol vlhký surový produkt suspendovaný v 600 ml petroléteru, filtrovaný a sušený vo vákuu pri $40^{\circ} C$. Získaný mupirocín bol rozpustený v 550 ml acetonitrilu pri $40^{\circ} - 50^{\circ} C$, a čistený pri predchádzajúcej teplote s dreveným uhlím (5,5 g). Po vyčistení bol roztok ochladený na izbovú teplotu, potom udržiavaný pri $0^{\circ} - 5^{\circ} C$ po 24 hodín. Vyzrážaný mupirocín bol

odfiltrovaný, potom bolo uskutočnené premývanie 50 ml chladného (pod 5° C) acetonitrilu. Vlhké kryštály boli suspendované v 200 ml deionizovanej vody, potom bolo do suspenzie pridané ďalšie množstvo 200 ml deionizovanej vody. Potom prebiehala kryštalizácia pri 0°-5° C po 24 hodín. Kryštály boli odfiltrované, potom bolo uskutočnené premývanie 2 x 50 ml deionizovanej vody. Produkt bol sušený pod vákuom pri 40° C po 72 hodín. Týmto spôsobom bolo získaných 80,6 g mupirocínu, ktorý má rovnaké fyzikálne vlastnosti ako v príklade 1.

Aj keď tu boli popísané niektoré výhodné uskutočnenia vynálezu, je odborníkovi znalému stavu techniky zrejmé, že môžu byť uskutočnené rôzne obmeny a variácie popísaného uskutočnenia, aniž, že by bol opustený duch a rozsah vynálezu. Preto sa predpokladá, že vynález je obmedzený iba rozsahom daným pripojenými nárokami a aplikovateľnými právnymi pravidlami.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob izolácie antibiotickej pseudomonovej kyseliny A vzorca (I)



vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kroky :

extrakciu pseudomonovej kyseliny A z kultúry druhov rodu baktérií *Pseudomonas*, produkujúcich pseudomonovú kyselinu A, pri kyselom pH, použitím chlorovaného alifatického uhlovodíku alebo izobutylacetátu tak, že sa získa extrakt obsahujúci pseudomonovú kyselinu A; a

purifikáciu pseudomonovej kyseliny A z uvedeného extraktu.

2. Spôsob podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že purifikačný krok zahŕňa rozdelenie extraktu medzi vodno-alkoholovú fázu a organickú fázu obsahujúcu aspoň jedno organické rozpúšťadlo; a odparenie organického rozpúšťadla.

3. Spôsob podľa nároku 2 vyznačujúci sa tým, že uvedeným alkoholom je metanol.

4. Spôsob podľa nároku 3 vyznačujúci sa tým, že extrakt sa rozdelí medzi roztok 10 % vody - metanolu a alifatický uhlovodík.

5. Spôsob podľa nároku 4 vyznačujúci sa tým, že alifatický uhľovodík je hexán alebo heptán.

6. Spôsob podľa nároku 5 vyznačujúci sa tým, že alifatický uhľovodík je n - hexán.

7. Spôsob podľa nároku 3 vyznačujúci sa tým, že extrakt sa rozdelí medzi roztok 25 % vody - metanolu a aromatický uhľovodík.

8. Spôsob podľa nároku 7 vyznačujúci sa tým, že aromatický uhľovodík je toluén.

9. Spôsob podľa nároku 3 vyznačujúci sa tým, že extrakt sa rozdelí medzi roztok 50 % vody - metanolu a rozpúšťadlo je nemiešateľné s vodou.

10. Spôsob podľa nároku 9 vyznačujúci sa tým, že rozpúšťadlo nemiešateľné s vodou je vybraté zo skupiny pozostávajúcej z metylénchloridu, etylacetátu, metylizobutylketónu, n- butylacetátu a izobutylacetátu.

11. Spôsob podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že krok purifikácie zahŕňa získanie pseudomonovej kyseliny A z extraktu vodným roztokom hydrogénuhličitanu amonného, hydroxidu alkalického kovu alebo hydroxidu amonného tak, že sa vytvorí alkalický roztok; okyselenie alkalického roztoku, takže sa vytvorí kyselinový roztok; a extrakciu kyselého roztoku izobutylacetátom.

12. Spôsob podľa nároku 11 vyznačujúci sa tým, že pseudomonová kyselina A sa získa z extraktu vodným roztokom hydroxidu sodného.

13. Spôsob podľa nároku 11 vyznačujúci sa tým, že pseudomonová kyselina A sa získa z extraktu vodným roztokom hydroxidu amonného.

14. Spôsob podľa nároku 11 vyznačujúci sa tým, že pseudomonová kyselina sa získa z extraktu vodným roztokom hydrogénuhličitanu amonného.

15. Spôsob podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že ďalej zahŕňa krok odparenia a kryštalizácie purifikovanej pseudomonovej kyseliny A.

16. Spôsob podľa nároku 15 vyznačujúci sa tým, že surová pseudomonová kyselina A kryštalizuje z izobutylacetátu alebo zmesi izobutylacetát-petroléteru.

17. Spôsob podľa nároku 15 vyznačujúci sa tým, že surová pseudomonová kyselina A kryštalizuje z acetonitrilu, vody alebo zmesi acetonitrilu a vody.