

(19)



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer:

**AT 404 728 B**

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2062/96

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **C07D 503/00**  
C07D 503/18

(22) Anmeldetag: 27.11.1996

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1998

(45) Ausgabetag: 25. 2.1999

(73) Patentinhaber:

BIOCHEMIE GESELLSCHAFT M.B.H.  
A-6250 KUNDL, TIROL (AT).

(72) Erfinder:

SUMMER HARALD DR.  
MÜRL, TIROL (AT).  
RENZ ALOIS  
KRAMSACH, TIROL (AT).  
WAGNER HELMUT DR.  
KRAMSACH, TIROL (AT).

## (54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CLAVULANSÄURE-AMINSALZEN

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von Clavulansäure-Aminsalzen, sowie deren Verwendung als Zwischenprodukte zur Herstellung von Clavulansäure und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) den gesamten, nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen unfiltrierten Erntebrei, bei nativ-pH (5,5 - 7,5) mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert oder

b) den nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen Erntebrei nach einer optionalen Vorbehandlung durch Zusatz von Flockungsmitteln durch gängige Filtrationsverfahren filtriert, das Kulturfiltrat konzentriert und gegebenenfalls reinigt und danach mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole bei pH 5,5 - 7,5 extrahiert,

anschließend den Wirkstoff durch mehrstufige Extraktion bei saurem pH-Wert von 1,5 bis 2,5 in ein mit Wasser nicht mischbares Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert und nach bekannten Methoden zu einem Aminsatz der Clavulansäure umsetzt sowie ein erhaltenes Aminsatz nach bekannten Methoden in ein pharmazeutisch annehmbares Salz der Clavulansäure, wie das Kaliumsalz, umwandelt.

AT 404 728 B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von Clavulansäure-Aminsäuren, sowie deren Verwendung als Zwischenprodukte zur Herstellung von Clavulansäure und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, z.B. Kaliumclavulanat.

Clavulansäure, (2R,5R,Z)-3-(2-Hydroxyethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-aza-bicyclo-[3,2,0]-heptan-2-carbonsäure, ist wegen ihrer hemmenden Wirkung auf  $\beta$ -Lactamasen von speziellem Interesse als Zusatz für  $\beta$ -Lactamantibiotika-Formulierungen. Da die freie Säure nicht stabil ist, wird ein Alkalimetallsalz der Clavulansäure, vorwiegend Kaliumclavulanat, verwendet.

Clavulansäure wird durch mikrobielle Fermentation von verschiedenen Species der Gattung Streptomyces (z.B. *S. clavuligerus*, *S. jumoniensis* u.a.) erhalten, wobei im technischen Maßstab gerührte und belüftete Fermenter und komplexe Nährlösungen verwendet werden. Deshalb sind komplizierte Verfahren zur Isolierung und Reinigung der Wirksubstanz erforderlich. Bei einigen dieser Verfahren, wie sie z.B. in DE 25 60 074, EP 26 044 beschrieben werden, wird nach der Fermentation zuerst die Zellmasse durch geeignete Verfahren wie Filtration, Mikrofiltration oder Zentrifugation abgetrennt. Das erhaltene Filtrat wird danach auf pH 1 - 3 angesäuert und die Clavulansäure mit einem organischen Lösemittel, z.B. Butanol, Ethylacetat oder Methylisobutylketon, extrahiert.

In den in DE 25 60 074 beschriebenen Verfahren wird die Clavulansäure danach aus der organischen Lösung in eine wäßrige Pufferlösung, z.B. eine wäßrige Bikarbonatlösung, unter annähernd neutralen Bedingungen rückextrahiert, und das erhaltene Salz aus der wäßrigen Lösung durch Entfernen des Lösemittels isoliert. Dieses Rohprodukt muß dann durch aufwendige chromatographische Methoden weiter gereinigt, entsalzt und nochmals chromatographisch gereinigt werden. Diese Verfahren benötigen große Mengen an Lösemitteln und sind im großtechnischen Maßstab nur beschränkt anwendbar.

Gemäß dem in EP 26 044 beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Clavulansäure und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen werden die anspruchsvollen Methoden der Reinigung mittels chromatographischer Verfahren weitgehend vermieden. Dem Verfahren liegt die Herstellung des tert.-Butylaminsalzes der Clavulansäure zugrunde. Das tert.-Butylaminsalz der Clavulansäure wird seinerseits durch die Behandlung des rohen Clavulansäure enthaltenden organischen Extraktes, der gemäß dem in DE 25 60 074 beschriebenen Verfahren hergestellt wird, mit tert.-Butylamin gewonnen.

Andere als Zwischenprodukt zur Herstellung von Clavulansäure und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen geeignete Aminsäuren werden z. B. in AT 400 033, AT 399 155, EP 387 178, EP 594 099, WO 93/25557, WO 94/21647, WO 94/22873, WO 95/23870 oder WO 96/20199 beschrieben. Zur Herstellung dieser Aminsäuren wird bei allen erwähnten Verfahren das Kulturfiltrat gegebenenfalls konzentriert, auf pH 2 - 3 angesäuert und die Clavulansäure mit einem organischen Lösemittel extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird danach gegebenenfalls gewaschen, getrocknet, aufkonzentriert und gereinigt und mit einem Amin versetzt, wobei das Aminsäure der Clavulansäure ausfällt und abfiltriert werden kann.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Clavulansäure und deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, wie das Kaliumsalz, auf eine neue und einfache Weise herzustellen, bei der man die gewünschte Substanz mit einer hohen Reinheit und einer hohen Ausbeute erhält.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß diese Aufgabe dadurch gelöst werden kann, indem man

- a) den gesamten, nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen unfiltrierten Erntebrei, bei nativ-pH (5,5 - 7,5) mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert oder
- b) den nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen Erntebrei nach einer optionalen Vorbehandlung durch Zusatz von Flockungsmitteln durch gängige Filtrationsverfahren filtriert, das Kulturfiltrat konzentriert und gegebenenfalls reinigt und danach mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole bei pH 5,5 - 7,5 extrahiert,

anschließend den Wirkstoff durch mehrstufige Extraktion bei saurem pH-Wert von 1,5 bis 2,5 in ein mit Wasser nicht mischbares Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert und nach bekannten Methoden zu einem Aminsäure der Clavulansäure umsetzt sowie ein erhaltenes Aminsäure nach bekannten Methoden in ein pharmazeutisch annehmbares Salz der Clavulansäure, wie das Kaliumsalz, umwandelt.

Diese Extraktion vor der Fällung der Aminsäuren bringt eine deutliche Verbesserung gegenüber dem bisher bekannten Verfahren bezüglich Ausbeute und Reinheit der erhaltenen Aminsäuren.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise folgende Verfahrensschritte durchgeführt werden:

- a) Vorextraktion des gesamten, unfiltrierten Erntebreis bei nativ-pH (5,5 - 7,5) mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole. Das Extraktionsverhältnis von Lösemittel zu Erntebrei beträgt vorzugsweise 0,5:1 bis 3:1.

b) Extraktion des Wirkstoffes aus dem Raffinatbrei der Vorextraktion durch mehrstufige Extraktion bei saurem pH-Wert von 1,5 bis 2,5 in ein mit Wasser nicht mischbares Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole. Das Extraktionsverhältnis von Lösemittel zu vorextrahiertem Erntebrei beträgt vorzugsweise 1:1 bis 5:1.

c) Optionales Auswaschen des wirkstoffhaltigen sauren Gesamtextraktes mit Wasser oder einem geeigneten Puffer. Nach Zumischen des Waschwassers kann die Phasentrennung von der organischen Phase entweder durch Schwerkraft oder mit Hilfe von Zentrifugen (z.B. Zentrifugalseparatoren oder Zentrifugalkantern) durchgeführt werden. Die Menge Wasser oder Puffer beträgt vorzugsweise 5 bis 30 % des organischen Extraktes.

d) Eindampfen des organischen Extraktes in einem geeigneten Vakuumverdampfer bis auf eine Konzentration von 20 bis 80 g Clavulansäure/kg.

e) Entfernung von Farbe und sonstigen Verunreinigungen, z.B. von Biomasseresten, durch Adsorption, wobei folgende Möglichkeiten bestehen:

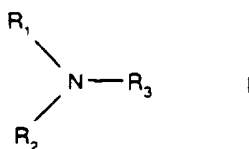
i) Aktivkohle in pulvriger Form in einer Menge von vorzugsweise 0,5 % bis 5 % auf Basis des Extraktkonzentrat-Gewichtes.

ii) Aktivkohle in granulierter Form, die, in eine Säule gefüllt, den durchperkolierenden vorkonzentrierten Extrakt reinigt.

iii) Adsorber- oder Ionentauscherharze, die geeignet sind, aus organischen Lösemitteln Farbstoffe und andere Verunreinigungen selektiv zu entfernen. Anwendung dieser Harze im Batch- oder im Säulen-Perkolations-Verfahren.

f) Aus dem gereinigten Konzentrat wird, gegebenenfalls unter Zusatz von einem Lösemittel (z.B. Aceton, Methylisobutylketon oder Diethylketon) im Bereich von 0 bis 200 % (Basis Konzentratgewicht), durch Zusatz eines Amins ein Zwischenprodukt (Aminsatz in Form eines Mono- oder Diclavulanats) hergestellt, das als zusätzlicher Reinigungsschritt für die Isolierung eines pharmazeutisch verträglichen Produkts dient.

Als Amine können Amine der Formel

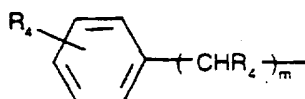


worin

a)  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  gleich oder verschieden sind und jeweils für eine gegebenenfalls substituierte cyclische Gruppe der Formel  $R(\text{CHR}_4)_m$  steht, wobei  $m$  eine ganze Zahl von 0 bis 5,  $R$  einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen Ring mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen und  $R_4$  Wasserstoff, gegebenenfalls durch Amino oder Hydroxy substituiertes Alkyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl bedeuten,  $R_2$  und  $R_3$  zusätzlich auch für Wasserstoff, gegebenenfalls durch Hydroxy oder Amino substituiertes Alkyl oder Alkenyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl stehen, oder

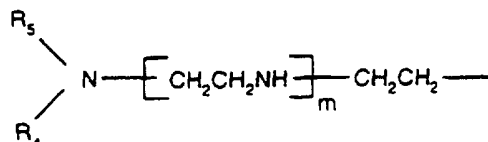
b)  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  gleich oder verschieden sind und jeweils Wasserstoff, gegebenenfalls durch Amino, Hydroxy oder Alkoxy substituiertes Alkyl oder Alkenyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl oder Alkenyl bedeuten, oder

c)  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  gleich oder verschieden sind und jeweils eine gegebenenfalls substituierte Arylgruppe der allgemeinen Formel

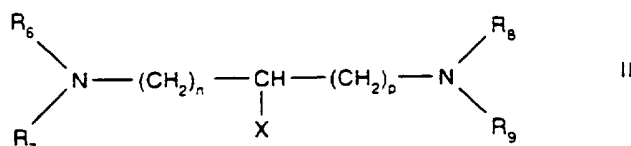


wobei  $R_4$  und  $m$  obige Bedeutung besitzen, bedeuten,  $R_2$  und  $R_3$  zusätzlich auch für Wasserstoff, gegebenenfalls durch Amino oder Hydroxy substituiertes Alkyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl stehen, oder

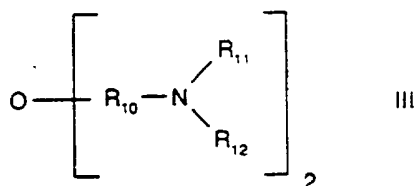
d)  $R_1$ ,  $R_2$  und gegebenenfalls  $R_3$  gemeinsam mit dem Stickstoffatom einen gegebenenfalls substituierten Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls ein oder mehrere zusätzliche Heteroatome enthalten kann, wobei  $R_3$  falls  $R_3$  nicht Teil des Ringsystems ist, für Wasserstoff, gegebenenfalls durch Hydroxy oder Amino substituiertes Alkyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl steht, oder  
 e)  $R_1$  für eine Gruppe der Formel



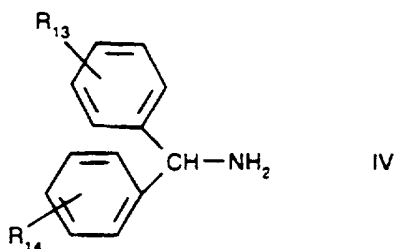
steht, wobei  $R_4$  und  $R_5$  gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, gegebenenfalls durch Amino substituiertes Alkyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl stehen,  $R_2$  und  $R_3$  gleich oder verschieden sind und jeweils Wasserstoff, gegebenenfalls durch Amino oder Hydroxy substituiertes Alkyl oder substituiertes durch Amino substituiertes Alkyl bedeuten und  $m$  obige Bedeutung besitzt, oder  
 f) einer oder beide Substituierten  $R_1$  und  $R_2$  Wasserstoff bedeuten und  $R_3$  für den Rest einer Aminosäure steht, wobei die Carboxygruppe der Aminosäure verestert oder in Form des Amids vorliegen kann,  
 oder Amine der Formel



worin  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$  und  $R_9$  gleich oder verschieden sind und jeweils für gegebenenfalls substituiertes  $(\text{C}_1-8)$ Alkyl,  $(\text{C}_3-8)$ Cycloalkyl oder  $(\text{C}_3-8)$ Cycloalkyl $(\text{C}_1-8)$ alkyl stehen oder Ringssysteme mit 4 bis 7 Ringatomen bilden,  $X$  Wasserstoff oder einen Wasserstoffbrückenbildende Gruppe bedeutet und  $n$  und  $p$  gleich oder verschieden sind und jeweils für einen ganze Zahl von 0 bis 5 stehen,  
 oder Amine der Formel



worin  $R_{10}$  für eine Alkylengruppe steht, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten hat,  $R_{11}$  und  $R_{12}$  gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff oder eine Alkylgruppe stehen, die gegebenenfalls einen oder mehrer inerte Substituenten haben, oder  $R_{11}$  und  $R_{12}$  gemeinsam mit dem N-Atom einen heterozyklischen Ring mit 4 bis 7 C-Atomen bilden, der wiederum gegebenenfalls einen oder mehrere inerte Substituenten haben kann,  
 oder Amine der Formel



worin  $R_{13}$  und  $R_{14}$  unabhängig voneinander Wasserstoff, niederes Alkyl, Halogenalkyl, Alkoxy oder Acyloxy bedeuten, verwendet werden.

Bei der Durchführung dieser Verfahrensschritte können gegebenenfalls folgende Vorgangsweisen gewählt werden:

- a) Vorbehandlung des Erntebreies durch spezifische pH-Adjustierung und/oder Zusatz von Flockungsmitteln.
- b) Trennung von Kulturfiltrat und Biomasse durch gängige Filtrationsverfahren, z.B.
  - i) Precoatfiltration am Vakuumdrehfilter unter Zuhilfenahme von Filterhilfsmitteln auf mineralischer- oder Zellulose-Basis,
  - ii) Crossflow-Filtration mit oder ohne vorhergehender Siebung von Grobanteilen.
- c) Konzentrieren des Kulturfiltrates auf eine für die nachfolgende Extraktion geeignete Wirkstoffkonzentration von 10 bis 30 g/kg, wobei folgende Methoden angewendet werden können:
  - i) Feinvakuumverdampfer
  - ii) Crossflow-Reverse-Osmose (RO)
  - iii) Crossflow-Nanofiltration (NF)
- d) Zusätzliche Reinigung des wäßrigen Konzentrats durch
  - i) Permeation über eine UF von sehr geringer Porenweite (1-3 kD) in Crossflow-Fahrweise
  - ii) Aktivkohle in pulvriger Form in einer Menge von vorzugsweise 0,5 % bis 5 % auf Basis des Extraktkonzentrat-Gewichtes
  - iii) Aktivkohle in granulierter Form, die, in eine Säule gefüllt, das durchperkolierende wäßrige Konzentrat reinigt
  - iv) Adsorber- oder Ionentauscherharze, die geeignet sind, aus dem wäßrigen Konzentrat Farbstoffe und andere Verunreinigungen selektiv zu entfernen
- e) Vorextraktion des optional vorgereinigten, wäßrigen Konzentrates bei pH 5,5 - 7,5 mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole. Zur Phasentrennung im technischen Maßstab werden Zentrifugalseparatoren oder Zentrifugaldekanter in einer oder mehreren Stufen verwendet. Das Extraktionsverhältnis von Lösemittel zu Konzentrat beträgt vorzugsweise 0,5:1 bis 3:1.
- f) Extraktion des Wirkstoffes aus dem wäßrigen Raffinat der Vorextraktion durch mehrstufige Extraktion bei saurem pH-Wert von 1,5 bis 2,5 in ein mit Wasser nicht mischbares Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole. Das Extraktionsverhältnis von Lösemittel zu wäßrigem Raffinat beträgt vorzugsweise 1:1 bis 5:1.
- g) Auswaschen des wirkstoffhaltigen sauren Gesamtexttraktes mit Wasser oder einem geeigneten Puffer. Die Menge Wasser oder Puffer beträgt vorzugsweise 5 bis 100 % des organischen Extraktes.
- h) Eindampfen des organischen Extraktes in einem geeigneten Vakuumverdampfer bis auf eine Konzentration von 20 bis 80 g Clavulansäure/kg, wobei der Verdampfer so konstruiert ist, daß eine weitgehende Abreicherung des im gewaschenen Extrakt gelösten Wassers nach dem Prinzip der Heteroazeotropdestillation erfolgt.
- i) Entfernung von Farbe und sonstigen Verunreinigungen, wobei folgende Möglichkeiten bestehen:
  - $\alpha$ ) Aktivkohle in pulvriger Form in einer Menge von vorzugsweise 0,5 % bis 5 % auf Basis des Extraktkonzentrat-Gewichtes
  - $\beta$ ) Aktivkohle in granulierter Form, die, in eine Säule gefüllt, den durchperkolierenden vorkonzentrierten Extrakt reinigt
  - $\chi$ ) Adsorber- oder Ionentauscherharze, die geeignet sind, aus organischen Lösemitteln Farbstoffe und andere Verunreinigungen selektiv zu entfernen.
- j) Herstellung eines Aminsalzes der Clavulansäure aus dem gereinigten Konzentrat nach bekannten und/oder beschriebenen Methoden.

Beispielsweise kann beim erfindungsgemäßen Verfahren folgendermaßen vorgegangen werden:

Der nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltene Erntebrei mit einem pH-Wert von 5,5 bis 7,5 wird im Volumsverhältnis von 1 Teil Erntebrei zu 0,5 bis 3,0 Teile, bevorzugt 1,0 bis 1,5 Teile eines mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösemittels extrahiert. Als  
 5 Lösemittel können alle mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole verwendet werden, bevorzugt werden gängige Lösemittel wie Methylisobutylketon, Methylethylketon, Diethylketon, Ethylacetat, Propylacetat, n-Butanol oder i-Butanol, insbesondere bevorzugt werden jene Lösemittel, die anschließend zur Extraktion der Clavulansäure verwendet werden, wie Ethylacetat, Methylisobutylketon oder Diethylketon, da dadurch die Rückgewinnung der Lösemittel beträcht-  
 10 lich vereinfacht werden kann. Der extrahierte Erntebrei wird danach nach bekannten Methoden mit einer Säure auf pH 1,0 bis 3,0, bevorzugt 1,5 bis 2,5 gestellt und gleichzeitig mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert, wobei die Clavulansäure in die organische Phase extrahiert wird. Die weitere Aufarbeitung erfolgt nach bekannten Methoden durch Waschen der organischen Phase, Aufkonzentrieren, Reinigen durch Aktivkohle, Versetzen  
 15 mit einem Cosolvens aus der Gruppe Aceton, Methylisobutylketon oder Diethylketon, sowie Fällung eines Aminsalzes. Diese Methoden sind z.B. in WO 95/23870, AT 399 155, WO 94/21647, WO 93/25557, EP 26 044, EP 387 178, EP 594 099 oder WO 94/22873 beschrieben.

Alternativ dazu kann das Verfahren so durchgeführt werden, daß der nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltene Erntebrei durch gängige Filtrationsverfahren, z.B.  
 20 Precoatfiltration oder Crossflowfiltration, filtriert wird. Das erhaltene Filtrat wird danach aufkonzentriert, bis eine Wirkstoffkonzentration von 10 - 30 g / kg erreicht wird, und danach mit pulvriger Aktivkohle in einer Menge von 0,5 % bis 5 % behandelt. Das erhaltene vorgereinigte wäßrige Konzentrat wird dann bei pH 5,5 bis 7,5 im Volumsverhältnis von 1 Teil Erntebrei zu 0,5 bis 3,0 Teile, bevorzugt 1,0 bis 1,5 Teile eines mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösemittels extrahiert. Für die Auswahl des Lösemittels gelten  
 25 dieselben Kriterien wie für die Gesamtbreiextraktion, die weitere Verarbeitung kann ebenfalls gleich wie bei der Gesamtbreiextraktion erfolgen.

Im technischen Maßstab werden zur Phasentrennung bei der Gesamtbreiextraktion oder auch bei der Extraktion aus dem konzentrierten Kulturfiltrat sowie bei der Waschung der organischen Extrakte vorzugsweise Zentrifugalseparatoren oder Zentrifugaldekanter verwendet, wobei aufgrund des schlechten Verteilungskoeffizienten der Clavulansäure die Extraktion des Produktes in die organische Phase nur mit mehrstufiger Gegenstromfahrweise zu wirtschaftlich sinnvollen Ausbeuten führt. Zur Erreichung einer zufriedenstellenden Phasentrennung kann der Zusatz von geeigneten Flockungs- oder Netzmitteln in Mengen von 0,001 bis 1 % (Netzmittel, z.B. Armogard D-5411®, Cetyltrimethylammoniumbromid, Dodi-  
 30 gen®, Demulso® und vergleichbare und/oder Flockungsmittel wie Bozefloc®, Ferrocryl®, Locron® und vergleichbare) erforderlich sein. Bei der Crossflow-Filtration zur Abtrennung der Biomasse aus dem Erntebrei sind verschiedenste Modulbauarten handelsüblich, z.B.: Platten-, Rohr- oder Spiralmodule; die Werkstoffe der Membranen können auf Polymerbasis oder auf Keramikbasis sein. Die Trenngrenzen der Membranen können sich vom UF-Bereich (ca. 10 - 300 kD oder 0,005 bis 0,1 µm) bis zum MF-Bereich (ca. 0,1 bis 2 µm) bewegen. Die üblichen Querstrom-Pumpgeschwindigkeiten liegen um 2 bis 7, vorzugsweise 4  
 35 bis 6 m/s, um Membranfouling zu minimieren.

Für das thermische Aufkonzentrieren von wäßrigen Kulturfiltraten sind spezielle Vakuumverdampfer erforderlich, die bei sehr niedrigen Drücken und kurzer Verweilzeit das Produkt schonen, am besten eignen sich dazu Kurzweg-Dünnschichtverdampfer. Als modernere Alternative dazu werden Membranverfahren wie Reverse Osmose (RO) oder Nanofiltration (NF) verwendet. Es sind verschiedene Membranmaterialien  
 45 (Polymere oder Keramik) sowie verschiedene Modulbauarten (Spiral, Rohr, Platten) bekannt. RO und NF unterscheiden sich durch die Trenngrenze; während die RO alle gelösten Stoffe > 98-99 % zurückhält, können bei der NF monovalente kleine Ionen ins Permeat passieren, so daß aufgrund des verringerten osmotischen Drucks höhere Produktkonzentrationen im Retentat möglich sind. Die zusätzliche Reinigung des RO/NF-Konzentrats von hochmolekularen Substanzen erfolgt effektiv über sehr enge UF-Membranen,  
 50 die z.B. als Spiralmodule mit Trenngrenzen von 1-3 kD am Markt erhältlich sind.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne ihren Umfang einzuschränken. Alle Temperaturangaben erfolgen in Celsiusgraden.

#### Beispiel 1:

55

105 kg Erntebrei werden durch Crossflow-Ultra/Diafiltration von der Biomasse befreit. Es werden 200 kg Permeat erhalten, die mittels RO unter guter Kühlung auf einen Clavulansäuregehalt von rund 15 g/kg aufkonzentriert werden. 34 kg RO-Konzentrat werden mit der dreifachen Menge Ethylacetat unter Kühlung

bei neutralem pH vorextrahiert. Das vorextrahierte Konzentrat wird unter guter Kühlung bei pH 2 in mehreren Stufen mit Ethylacetat extrahiert, es werden mit HPLC 80 % Extraktionsausbeute nachgewiesen. Die gesammelten Extrakte werden im Vakuum auf ca. 8 g/kg eingedampft und das Konzentrat mit 350 g Na-Sulfat (wasserfrei) getrocknet. Zu der Ethylacetat/Na-Sulfat-Mischung werden 140 g Aktivkohle zugegeben und dann blankfiltriert. Der gereinigte Extrakt wird auf rund 30 g/kg eingedampft und das Konzentrat im Verhältnis 1:1 mit Aceton verdünnt. Die Fällung des Aminsalzes erfolgt bei 20 ° durch Zugabe einer 15 %-igen Lösung von tert. Butylamin in Aceton bis pH 6,1. Nachkristallisation 1 Stunde bei ca. 20 °. Es entsteht eine flockige, grobe Fällung. Das tert. Butylamin Clavulanat wird isoliert und nach Waschen mit Aceton getrocknet. Das erhaltene Acetonsolvat des Aminsalzes hat einen HPLC-Gehalt von 95 % (auf lösemittelfreier Basis).

### Beispiel 2:

900 kg Erntebrei (pH 7,0) werden über eine Crossflow-Ultrafiltrationsanlage vorkonzentriert und das Retentat durch Zugabe von entionisiertem Wasser zur Ausbeuteverbesserung diafiltriert. Es werden 2700 kg Kulturfiltrat erhalten. 1200 kg Filtrat werden bei 4 ° über RO/NF auf einen Clavulansäuregehalt von 9 g/kg aufkonzentriert. Das Retentat wird durch Ultrafiltration (2 - 3 kD) zusätzlich gereinigt. 62 kg Permeat werden bei neutralem pH mit der dreifachen Menge Ethylacetat vorextrahiert, wobei etwa die gleiche Menge an lipophilen Verunreinigungen entfernt wird wie Clavulansäure in der wässrigen Phase verbleibt. Die vorgereinigte wässrige Lösung wird bei pH 2,0 unter guter Kühlung über eine zweistufige Gegenstromextraktionsanlage (2 Zentrifugalseparatoren) kontinuierlich mit der vierfachen Menge Ethylacetat extrahiert. 320 kg Ethylacetatextrakt werden im Rührkesselverdampfer auf eine Wirkstoffkonzentration von 80 g/kg eingedampft. 1,9 kg Konzentrat werden mit der 0,3 fachen Aktivkohlemenge bezogen auf Wirkstoffmasse behandelt und blankfiltriert. Die Kohle wird mit Ethylacetat nachgewaschen, bis die Konzentration im Filtrat 30 g/kg beträgt. Nach Zusatz der gleichen Menge Aceton wird die Aminsalz-fällung bei 20 ° durch langsame Zugabe von 1,2 Äquivalenten einer 25 %-igen Lösung von tert. Octylamin in Aceton erwirkt (pH 6,3). Nach Kühlung auf 4 ° wird das Kristallisat isoliert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Das erhaltene tert. Octylamin Clavulanat hat einen HPLC-Gehalt von 98 % (atro).

### Beispiel 3:

1000 kg Erntebrei (pH 7,0) werden mittels Crossflow-Ultrafiltration auf 750 kg Retentat konzentriert und anschließend mit 2200 kg entionisiertem Wasser diafiltriert. Rund 1000 kg Kulturfiltrat werden mittels Nanofiltration auf einen Clavulansäuregehalt von 6-10 g/kg aufkonzentriert. Rund 140 kg Konzentrat werden mit 340 kg Ethylacetat bei neutralem pH vorextrahiert. Das vorgereinigte Konzentrat wird unter guter Kühlung bei pH 2,0 über eine zweistufige Gegenstromextraktionsanlage mit 700 kg Ethylacetat kontinuierlich extrahiert. Der Ethylacetatextrakt wird in einem Vakuumverdampfer auf eine Wirkstoffkonzentration von 37 g/kg aufkonzentriert. Das Konzentrat wird mit der 0,5 fachen Aktivkohlemenge Norit CG1, bezogen auf Clavulansäuremasse, behandelt und blankfiltriert. Das Filtrat wird mit Aceton (1:1, G/G) verdünnt. Die Aminsalz-fällung wird bei 20 ° durch langsame Zugabe einer 25 %-igen Lösung von tert. Octylamin in Aceton durchgeführt. Es wird bis pH 6,0 zugegeben, wobei 1,1 Äquivalent tert. Octylamin verbraucht werden. Nach Kristallisation bei 4 °, Isolierung und Trocknung wird in 65 %-iger Ausbeute tert. Octylamin Clavulanat mit einer HPLC-Reinheit von 98 % (atro) erhalten.

### Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung von Clavulansäure und ihren Alkalisalzen durch Extraktion der Clavulansäure aus dem durch mikrobielle Fermentation erhaltenen Kulturbrei, Reaktion mit einem Amin zu einem Aminsalt der Clavulansäure und Umsetzung zu Clavulansäurealkalisalzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
  - den gesamten, nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen unfiltrierten Erntebrei, bei nativ-pH (5,5 - 7,5) mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert oder
  - den nach der Fermentation mit einem Clavulansäure produzierenden Mikroorganismus erhaltenen Erntebrei nach einer optionalen Vorbehandlung durch Zusatz von Flockungsmitteln durch gängige Filtrationsverfahren filtriert, das Kulturfiltrat konzentriert und gegebenenfalls reinigt und danach mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ether, Ketone, Ester oder Alkohole bei pH 5,5 - 7,5 extrahiert,

## AT 404 728 B

anschließend den Wirkstoff durch mehrstufige Extraktion bei saurem pH-Wert von 1,5 bis 2,5 in ein mit Wasser nicht mischbares Lösemittel aus der Verbindungsklasse der Ketone, Ester oder Alkohole extrahiert und nach bekannten Methoden zu einem Aminsatz der Clavulansäure umsetzt sowie ein erhaltenes Aminsatz nach bekannten Methoden in ein pharmazeutisch annehmbares Salz der Clavulansäure umwandelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als das mit Wasser nicht mischbare Lösemittel Methylisobutylketon, Methylethylketon, Diethylketon, Ethylacetat, Propylacetat, n-Butanol oder i-Butanol verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das mit Wasser nicht mischbare Lösemittel in einem Volumsverhältnis von 1 Teil Erntebrei/Kulturfiltrat zu 0,5 bis 3, vorzugsweise 1 bis 1,5 Teilen Lösemittel eingesetzt wird.