



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **311029**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 J 71/00

Patentstyret

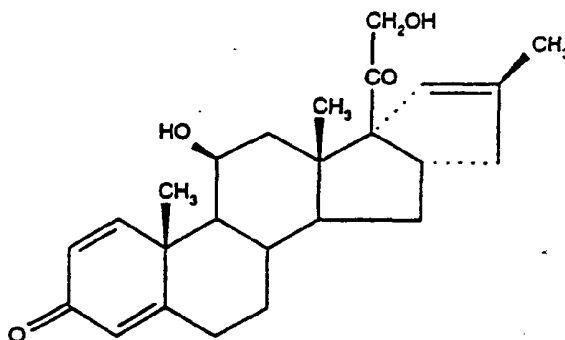
(21) Søknadsnr	19983665	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.12.04, PCT/EP96/05392
(22) Inng. dag	1998.08.11	(85) Videreføringsdag	1998.08.11
(24) Løpedag	1996.12.04	(30) Prioritet	1996.02.16, EP, 9602325
(41) Alm. tilgj.	1998.08.11		
(45) Meddelt dato	2001.10.01		

(71) Patenthaver	Gruppo Lepetit SpA, Via Roberto Lepetit, 8, I-20020 Lainate, IT
(72) Oppfinner	Luigi Forte, Brindisi, IT
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

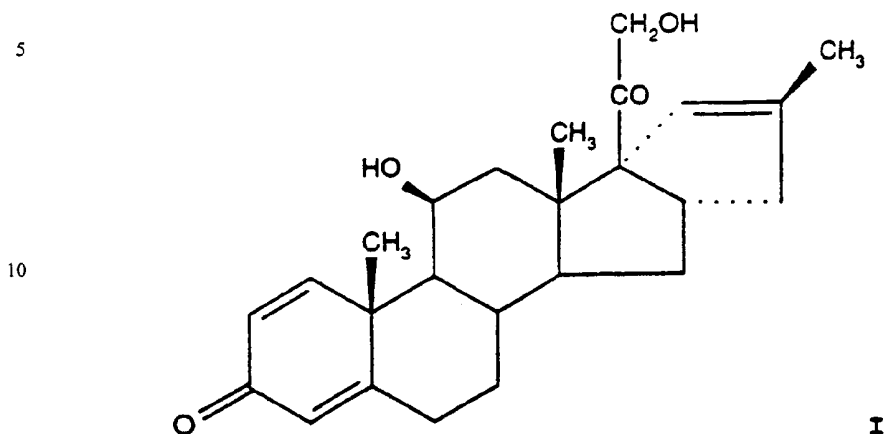
(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for rensing av 11- β -21-dihydroksey-2'-metyl-5'- β H-pregna-1,4-dieno-[17,16-d]-okszazol-3,20-dion

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av forbindelsen 11- β -21-dihydroksey-2'-metyl-5'- β H-pregna-1,4-dieno-[17,16-d]-okszolin-3,20-dion med formel (I), som innbefatter adsorpsjon av nevnte forbindelse inneholdt i en vandig oppløsning som resulterer fra fermenteringsblandinger eller prosess-strømmer, på en adsorberende polymerharpiks som har en styrenisk eller akrylisk matris og etterfølgende desorpsjon av den nevnte forbindelse ved eluering av harpiksen med en egnet blanding av vann med et vann-blandbart organisk oppløsningsmiddel.



Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny fremgangsmåte for rensing av forbindelsen 11 β -21-dihydroksy-2'-metyl-5' β H-pregna-1,4-dieno-[17,16-d]-oksazolin-3,20-dion med formel I:



15

Den ovenfor nevnte forbindelse er beslektet med deflazacort (INN - International Nonproprietary Name), ved at acetatenheten på C-21 av deflazacort er substituert med en hydroksyenhet.

20 Deflazacort er en forbindelse anvendt i gitt terapi i noen år som et kalsiumsparende gluko-corticoid-middel.

Disse forbindelser tilhører den mer generelle klasse av pregneno-oksazoliner, for hvilke anti-inflammatoriske, gluko-corticoid og hormonlignende farmakologiske aktiviteter er rapportert. Eksempler på forbindelser av den ovenfor nevnte klasse er beskrevet i US

25

patenter 3.413.286 og 4.440.764.

Fremstillingen av forbindelsen av formel I er beskrevet i EP-B-322.630, hvor nevnte forbindelse refereres til som 11 β -21-dihydroksy-2'-metyl-5' β H-pregna-1,4-dieno-

30

[17,16-d]-oksazolin-3,20-dion.

Ifølge fermenteringsfremgangsmåten beskrevet i det ovenfor omtalte EP-B-322.630, bringes 2'-metyl-4-pregnen-21-ol-[17a,16a-d]-oksazolinyll-3,20-dion eller 2'-metyl-4-pregnen-21-acetyloksy-[17a,16a-d]-oksazolinyll-3,20-dion-forbindelse i kontakt med en

35

sekvensielt voksende blandet kultur av en *Curvularia*-stamme og en *Arthrobacter*-stamme. Nærmere bestemt, ifølge en foretrukket utførelsesform, tilsettes den ovenfor nevnte forbindelse til en voksende kultur av *C. lunata* NRRL 2380 i et egnet

fermenteringsmedium etter 12-24 timer fra inoculum, og, etter 48-72 timer fra inoculum tilsettes en voksende kultur av *A. simplex* ATCC 6946 på 18-36 timer til blandingen, og de dyrkes videre i 40-55 timer; fermenteringen utføres under neddykkede betingelser, temperaturen holdes mellom 27°C og 32°C og pH mellom 6 og 8;

5 fermenteringsproduktet av formel I utvinnes deretter ved ekstraksjon av fermenteringsbuljongen med et organisk oppløsningsmiddel (f.eks. kloroform), konsentrering av de organiske ekstrakter og utfelling av forbindelsen ved tilsetning av et ikke-oppløsningsmiddel (f.eks. petroleumseter).

10 Ettersom konsentrasjonen av forbindelsen av formel I i fermenteringsbuljongen er meget lav, er høye mengder av organisk oppløsningsmiddel nødvendig for fullstendig å ekstrahere forbindelsen. Anvendelsen av høye mengder organiske oppløsningsmidler, spesielt halogenerte oppløsningsmidler, kan gi opphav til noen problemer med hensyn til sikkerhet, industriell hygiene og miljøbeskyttelse.

15

Det er nå funnet at forbindelsen av formel I hensiktsmessig kan utvinnes fra en vandig oppløsning som resulterer fra fermenteringsbuljonger eller prosessstrømmer, ved å adsorbere forbindelsen inneholdt i den vandige oppløsning på en adsorberende polymer harpiks som har en styrenisk eller akrylisk matriks og etterfølgende desorpsjon av den

20 nevnte forbindelse ved eluering av harpiksen med en egnet blanding av vann, med et vann-blandbart organisk oppløsningsmiddel.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt en fremgangsmåte for rensing av forbindelsen 11β-21-dihydroksy-2'-metyl-5'βH-pregna-1,4-dieno-[17,16-d]-

25 oksazolin-3,20-dion med ovenfor angitte formel I, og denne fremgangsmåten er kjenne-tegnet ved at den innbefatter

- a) adsorpsjon av nevnte forbindelse, inneholdt i en vandig oppløsning som resulterer fra fermenteringsblandinger eller prosess-strømmer, på en

30 adsorberende polymer harpiks som har en styrenisk eller akrylisk matriks,

- b) vasking av harpiksen med vann,
- c) desorpsjon av forbindelsen av formel I ved eluering av harpiksen med en

35 blanding av fra 10 til 50 % vann og et vann-blandbart organisk oppløsningsmiddel,

- d) konsentrasjon av eluatet og utvinning av forbindelsen av formel I fra dette ved filtrering.

Fordelaktige og foretrukne trekk ved denne fremgangsmåten fremgår fra de medfølgende krav 2-11.

Typiske vandige oppløsninger inneholdende forbindelsen av formel I, ledsaget av uønskede produkter, er de filtrerte fermenteringsbuljongene fra det egnede myceliet, eventuelt sammen med de vandige vaskinger av nevnte mycelier, eller delvis rensede prosesstrømmer. Eksempler på de uønskede ledsagende produkter er fargede forurensninger, biprodukter, uforbrukte utgangsmaterialer, salter og vannoppløselige komponenter av fermenteringsmediene.

Spesielt kan renseprosessen ifølge foreliggende oppfinnelse hensiktsmessig anvendes for utvinning av forbindelsen med formel I fra den filtrerte fermenteringsbuljongen oppnådd fra fermenteringsprosessen beskrevet i EP-B-322.630.

Egnede harpikser for foreliggende renseprosess vil ha en gjennomsnittlig partikkelstørrelse på ca. 20-50 mesh og følgende gjennomsnittlige fysiske egenskaper:

Porøsitetsvolum:	30 % - 75 %;
Overflateareal:	140 - 800 m ² /g;
Skjelettdensitet:	1.06 - 1.10 g/ml (styreniske harpikser)
	1.20 - 1.26 g/ml (akryliske harpikser);
Gjennomsnittlig porediameter:	20 - 100 Å.

Eksempler på adsorberende styrenisk baserte polymerharpikser egnet for den ovenfor omtalte renseprosess, er de kommersielt tilgjengelige harpikser såsom "Kastel S/112" (Dow Chemical), "Amberlite XAD/2", "XAD/4" eller "XAD/16" (Rohm & Haas) eller lignende. Eksempler på adsorberende akrylisk baserte polymere harpikser egnet for den ovenfor omtalte utvinningsprosess, er de kommersielt tilgjengelige harpikser, såsom "Kastel S/221" eller "S/223" (Dow Chemical), "Amberlite XAD/7" eller "XAD/8" (Rohm & Haas), og lignende.

Generelt anvendes for fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse fortrinnsvis de akrylisk baserte polymere harpikser, spesielt foretrukket de som har en partikkelstørrelse på 20 - 50 mesh, og følgende gjennomsnittlige fysiske egenskaper:

Porøsitetvolum: 30 % - 60 %;
 Overflateareal: 350 - 550 m²/g;
 Skjelettdensitet: 1.24 - 1.25 g/ml
 Gjennomsnittlig porediameter: 20 - 80 Å.

5

Eksempler på adsorberende akrylisk baserte polymere harpikser med de ovenfor nevnte egenskaper som hensiktsmessig kan anvendes er de ovenfor nevnte "Kastel S/221" og "Amberlite XAD/7".

- 10 Spesielt foretrukket for foreliggende renseprosess er akrylisk baserte polymere harpikser som har en partikkelstørrelse på 20 - 50 mesh og følgende gjennomsnittlige fysikalske egenskaper:

Porøsitetvolum: 30 % - 60 %;
 Overflateareal: 350 - 550 m²/g;
 15 Skjelettdensitet: 1.25 g/ml
 Gjennomsnittlig porediameter: 20 - 40 Å.

For eksempel kan den kommersielt tilgjengelige harpiksen "Kastel S/221" hensiktsmessig anvendes.

20

Egnede eluerende blandinger er blandinger av fra 0 til 80 % vann med et vann-blandbart organisk oppløsningsmiddel såsom lavere ketoner (f.eks. aceton, etylmetylketon); lavere alkoholer (f.eks. metanol, etanol, propanol, butanol); og lignende.

- 25 Som nevnt anvendes blandinger av fra 10 til 50 % vann med et av de ovenfor nevnte organiske oppløsningsmidler, spesielt foretrukket er en blanding inneholdende ca. 30 % vann. Aceton er det foretrukne oppløsningsmidlet.

- 30 Når fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes for rensing av forbindelsen med formel I, oppnådd i henhold til fermenteringsprosessen som beskrevet i EP-B-322.630, kan følgende generelle fremgangsmåte hensiktsmessig anvendes.

- 35 Når den nevnte fermenteringsprosess er fullført, filtreres fermenteringsmassen først i henhold til de kjente teknikker. Den myceliske kake vaskes gjentatte ganger med vann og vaskevannene kombineres deretter med den filtrerte buljongen. Alternativt kan myceliet vaskes med et organisk oppløsningsmiddel valgt blant de som er listet opp tidligere, for å gjenvinne aktiviteten inneholdt deri; i dette tilfelle kombineres

vaskingene med den filtrerte buljongen først etter at oppløsningsmidlet er fjernet, dvs. ved spalting under vakuum.

Den filtrerte buljongen kombinert med vaskeoppløsningene påføres deretter på toppen av en kolonne inneholdende den adsorberende harpiksen; generelt inneholder den eluerte oppløsningen bare spor av produkt. Harpiksen vaskes deretter med vann for å eliminere salter og andre vannoppløselige forurensninger (som ovenfor, også dette vaskevannet vil generelt inneholde bare spor av produktet).

Forbindelsen av formel I desorberes deretter fra harpiksen, ved eluering med en blanding av vann og et organisk oppløsningsmiddel som definert ovenfor, fortrinnsvis en blanding 30/70 vann/acetone. Eluatet konsentreres og produktet utvinnes ved filtrering. Med denne fremgangsmåten utvinnes hovedmengden av produkt fra den filtrerte buljongen; som en generell indikasjon utvinnes mer enn 90 % av den samlede mengde av den ønskede forbindelse som opprinnelig ble påført på kolonnen med denne første elueringen.

Den gjenværende mengde kan utvinnes ved å gjenta fremgangsmåten ovenfor etter å ha kombinert moderlutten fra den første eluering og vaskeoppløsningene med vann. Det samlede utvinningsutbytte er ca. 96 %.

For bedre å illustrere oppfinnelsen er følgende eksempler angitt.

Eksempel 1 Trinnvis vekst av *C. lunata* og *A. simplex*

I) Skråstilt medium

Saboraud medium (for *C. lunata*)

Antibiotisk Agar nr. 1 (for *A. simplex*)

II) Vegetative og for-kultur-medier

a) for *C. lunata*

Soyabønne-måltid 13 g/l

KH_2PO_4 5 g/l

Dekstrose 10 g/l

Pepton 5 g/l

pH regulert til 6.5- 7.5 før autoklaving;

b) for *A. simplex*

Dekstrose	1.0 g/l
Soyabønne-måltid	5.0 g/l
Pepton	5.0 g/l
5 Basamin Busch	3.0 g/l
KH ₂ PO ₄	5.0 g/l
NaCl	5.0 g/l
Silikon	0.1 ml/l

pH regulert til 6.5- 7.5 før autoklivering.

10

III) Fermenteringsmediet

Et fermenteringsmedium som har samme sammensetning som for kulturmediet for *C. lunata* angitt ovenfor.

15

IV) Fermenterings-fremgangsmåten

Skråttstillingene (slantene) anvendes for separat å inokulere 500 ml's kolber som dyrkes ved ca. 28°C i ca. 12 - 24 timer (*C. lunata*) eller 18 - 36 timer (*A. simplex*) i nærvær av 100 ml av de vegetative mediene angitt ovenfor. Disse inokulatene anvendes i fremgangsmåten beskrevet nedenfor:

20

Porsjoner (1 - 5 %) av kulturen av *C. lunata* oppnådd ovenfor overføres til en 8 liters fermentor inneholdende det ovenfor angitte fermenteringsmediet og dyrkes i ca. 24 timer ved 29 - 32°C.

25

Deretter tilsettes 4 g av 2'-metyl-4-pregnen-21-ol-[17a,16a-d]-oksazoliny-3,20-dion og fermenteringen fortsettes inntil 36 - 72 timer fra inokulum.

Deretter tilsettes 18 - 36 timers kulturen av *A. simplex* til dette og fermenteringen fortsettes i ytterligere 40 - 55 timer.

30

Reaksjonsforløpet overvåkes som kjent innen teknikken ved hjelp av TLC eller fortrinnsvis HPLC ved å følge forsvinningen av utgangsmaterialet og/eller tilsynekomsten av sluttproduktet. Som en ytterligere kontroll kan tilsynekomsten/-forsvinningen av mellomproduktene også følges. HPLC omdanningsutbytte: 70-75 %.

35

Eksempel 2 Utvinning av forbindelsen med formel I

Etter 40 - 55 timer fra tilsetningen av *A. simplex* kan transformasjonen generelt betraktes som fullført og fermenteringsmassen kan opparbeides for å isolere den ønskede forbindelse av formel I.

5

Fermenteringsmassens pH reguleres til ca. 3 - 4 med H_2SO_4 og blandingen separeres ved filtrering ved anvendelse av filter-hjelpemiddel; det filtrerte mycelium vaskes deretter gjentatte ganger med surgjort vann ($3 < pH < 4$). Den filtrerte buljong og vaskeoppløsningen kombineres idet det oppnås 1 l liter av en blanding inneholdende

10 forbindelse av formel I, med en mengde på 270 ppm (bestemt ved HPLC på silikagel; kolonne "Spherisorb 3 μm ", 100x4,6 mm; strømningshastighet 1,3 ml/minutt, mobil fase 0,0025 M NaH_2PO_4 : CH_3CN 7:3, UV-detektor ved 254 nm). Blandingene ovenfor påføres deretter ved romtemperatur på toppen av en kromatografisk kolonne (6 x 11 cm) inneholdende ca. 300 ml av en vandig-svullet akrylisk basert polymer harpiks ("Kastel

15 S/221", Dow Chemical) ved en strømningshastighet på ca. 300 ml/time. Den eluerte blandingen (moderlut) som inneholder mindre enn 2 ppm aktivitet, samles separat.

Harpiksen vaskes deretter med 600 ml demineralisert vann for å fjerne salter og andre vannoppløselige forurensninger. Videre samles i dette tilfelle eluatet

20 (vaskeoppløsningene) som inneholder mindre enn 2 ppm aktivitet, separat.

Produktet desorberes deretter fra harpiksen ved eluering med en blanding 70/30 av aceton/vann ved en strømningshastighet på ca. 150 ml/time, idet det samles ca. 200 ml eluat. Eluatet konsentreres under vakuum ved et volum på ca. 100 ml, mens produktet

25 utfelles.

Suspensjonen avkjøles til ca. 5°C og etter 2 timer samles utfellingen ved filtrering og vaskes med kaldt vann. Etter tørking under vakuum ved 50°C oppnås 2,8 g av forbindelsen av formel I (mengde, 98 %).

30

Moderluter og vaskeoppløsninger kombineres og etter fortykning med vann (ca. 1 - 2 volumdelere med hensyn til volumet av moderluter) påføres på toppen av en kolonne (2 x 13 cm) inneholdende 40 ml av den ovenfor omtalte svullede harpiks ved en strømningshastighet på ca. 40 ml/time.

35

Etter vasking av harpiksen med 80 ml vann desorberes produktet ved eluering med en blanding 70/30 av aceton/vann, ved en strømningshastighet på ca. 20 ml/time. Ved

konsentrasjon under vakuum, avkjøling, filtrering, vasking med kaldt vann og tørking, oppnås ytterligere 0,14 g av forbindelsen av formel I.

Det totale utvinningsutbytte fra fermenteringsblandingen er typisk ca. 96 %.

5

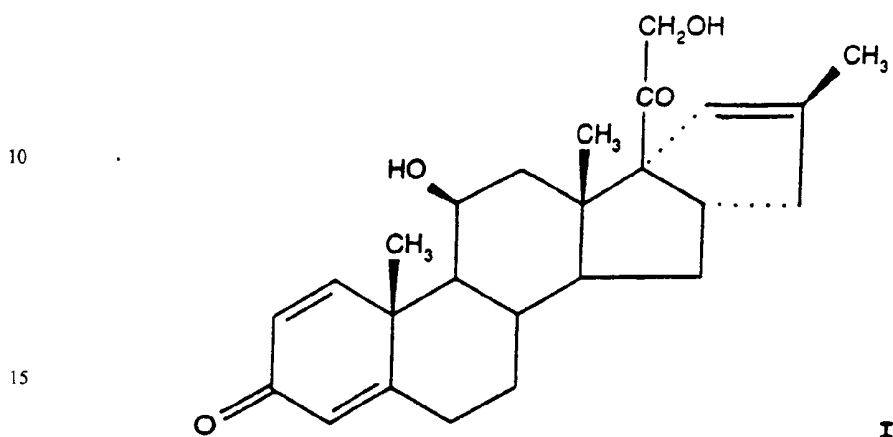
Ved å gjenta fremgangsmåten angitt i eksemplene 1 og 2, men ved anvendelse av 2'-metyl-4-pregnen-21-acetyloksy-[17a,16a-d]-oksazolinyll-3,20-dion i stedet for 2'-metyl-4-pregnen-21-ol-[17a,16a-d]-oksazolinyll-3,20-dion, oppnås forbindelsen av formel I i det vesentlige med samme utbytter.

10

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for rensing av forbindelsen 11 β -21-dihydroksey-2'-metyl-5' β H-pregna-
 5 1,4-dieno-[17,16-d]-oksazolin-3,20-dion med formelen:



20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n i n n b e f a t t e r

- a) adsorpsjon av nevnte forbindelse, inneholdt i en vandig oppløsning som resulterer fra fermenteringsblandinger eller prosess-strømmer, på en adsorberende polymer harpiks som har en styrenisk eller akrylisk matris,
- 25 b) vasking av harpiksen med vann,
- c) desorpsjon av forbindelsen av formel I ved eluering av harpiksen med en blanding av fra 10 til 50 % vann og et vann-blandbart organisk oppløsningsmiddel,
- 30 d) konsentrasjon av eluatet og utvinning av forbindelsen av formel I fra dette ved filtrering.

2.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fermenteringsblandingen inneholdende forbindelsen av formel I er den som oppnås fra fermenteringsprosessen for oppnåelse av nevnte forbindelse, som innbefatter at 2'-

metyl-4-pregnen-21-ol-[17a,16a-d]-oksazoliny-3,20-dion i stedet for 2'-metyl-4-pregnen-21-acetyloksy-[17a,16a-d]-oksazoliny-3,20-dion bringes i kontakt med en sekvensielt voksende blandet kultur av en Curvularia-stamme og en Arthrobacter-stamme.

5

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at elueringsblandingen fra trinn c) inneholder ca. 30 % vann.

10

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at

- a) fermenteringsmassen filtreres først, myceliekaken vaskes gjentatte ganger med vann og vaskeoppløsningene kombineres deretter med den filtrerte blanding;
- 15 b) den filtrerte blanding kombinert med vaskeoppløsningene påføres deretter på toppen av en kolonne inneholdende den vandig-svellede adsorberende harpiks;
- b') harpiksen vaskes med vann;
- 20 c) forbindelsen av formel I desorberes fra harpiksen ved eluering med en blanding 30/70 vann/acetone;
- d) eluatet konsentreres og forbindelsen av formel I utvinnes ved filtrering.

25

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at renseprosedyren gjentas på de kombinerte moderluter og vaskeoppløsninger oppnådd fra eluering i henhold til trinn b) og b').

30

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4 eller 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den adsorberende polymer-harpiks er en polymer harpiks som har en styrenisk eller akrylisk matriks, som har en partikkelstørrelse på 20 - 50 mesh, og med følgende gjennomsnittlige fysikalske egenskaper:

- 35 porøsitetvolum: 30 % - 75 %;
- overflateareal: 140 - 800 m²/g;
- skjelettdensitet: 1.06 - 1.10 g/ml for styreniske harpikser,

1.20 - 1.26 g/ml for akryliske harpikser;
gjennomsnittlig porediameter: 20 - 100 Å.

7.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4 eller 5, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den adsorberende polymer-harpiks er en akrylisk basert polymer harpiks
som har en partikkelstørrelse på 20 - 50 mesh, og har følgende gjennomsnittlige
fysikalske egenskaper:

porøsitetsvolum: 30 % - 60 %;
10 overflateareal: 350 - 550 m²/g;
skjelettdensitet: 1.24 - 1.25 g/ml;
gjennomsnittlig porediameter: 20 - 80 Å.

8.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4 eller 5, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den adsorberende polymer-harpiksen er en akrylisk basert polymer harpiks
som har en partikkelstørrelse på 20 - 50 mesh, og har følgende gjennomsnittlige
fysikalske egenskaper:

porøsitetsvolum: 30 % - 60 %;
20 overflateareal: 350 - 550 m²/g;
skjelettdensitet: 1.25 g/ml;
gjennomsnittlig porediameter: 20 - 40 Å.

9.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 6 eller 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det vann-blandbare organiske oppløsningsmiddel er et lavere keton eller en
lavere alkohol.

10.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 6 eller 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det organiske oppløsningsmiddel er aceton.

11.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 6 eller 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den eluerende blanding er en blanding 30/70 vann/aceton.