

3565M

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás nagy tisztaságú HMG-CoA-reduktáz inhibitorok előállítására

Kivonat

A találmány tárgya eljárás HMG-CoA reduktáz inhibitorok előállítására, ahol az eljárást az jellemzi, hogy a nyers HMG-CoA reduktáz inhibitorok tisztítási eljárásában a lépések egyike kizárásos kromatográfia, amely magában foglalja egy kizorító anyag alkalmazását a HMG-CoA reduktáz inhibitor kizárására.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi nagy tisztaságú HMG-CoA reduktáz inhibitorok kinyerését, ^{magas} magas-kitermelés, ^{alacsonyabb} alacsonyabb előállítási költségek és megfelelő ökológiai egyensúly mellett.



3565M

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás nagy tisztaságú HMG-CoA-reduktáz inhibitorok előállítására

A lovasztatin, pravasztatin, szimvasztatin, mevasztatin, azok származékai és analógjai a HMG-CoA-reduktáz inhibitoroként ismertek, ezeket a vér magas koleszterin-szintjének csökkentésére ható szerként alkalmazzák. Többségüket fermentációval állítják elő az *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* vagy *Penicillium* nemzetséghez tartozó fajokként azonosított különböző típusú mikroorganizmusok alkalmazásával, más részüket a fermentációs termék kezelésével nyerik, amelynek során kémiai szintézis eljárásokat alkalmaznak, vagy ők maguk a teljes kémiai szintézis termékei.

A hatóanyag tisztasága fontos tényező a biztonságos és hatékony gyógyszerek előállítása során, különösen, ha a gyógyszerterméket tartósan kell szedni a magas plazma koleszterin szint kezelésére vagy megelőzésére. Az alacsonyabb tisztaságú gyógyszerkészítményekből származó szennyeződések felhalmozódása sok mellékhatást okozhat az orvosi kezelés ideje alatt. A jelen találmány a HMG-CoA reduktáz inhibitorok úgynevezett kiszorításos kromatográfia alkalmazásával történő izolálására szolgáló új ipari eljárásra vonatkozik. A találmány szerinti alkalmazás lehetővé teszi nagy tisztaságú HMG-CoA reduktáz inhibitorok kinyerését, magas



kitermelés, alacsonyabb előállítási költségek és megfelelő ökológiai egyensúly mellett.

A korábbi szabadalmi leírásokban ismertetett, a vér magas koleszterinszintjének csökkentésére ható anyagok elválasztási és tisztítási eljárásai az extrakciós, kromatográfiás, laktonizálási és kristályosítási eljárások különféle kombinációit foglalják magukban. Az ilyen eljárásokkal előállított végső termék tisztasága elegendő az USP szabványoknak, de a kívánt termék kitermelései viszonylag alacsonyak. Ezenkívül az ilyen eljárások esetében nagymennyiségű szerves oldószerre és az ilyen mennyiségekhez alkalmazott nagyméretű berendezésekre van szükség.

A WO 92/16276 számú PCT közzétételi iratban ismertetett elválasztási eljárás 99,5 %-nál nagyobb tisztaságú HMG-CoA-reduktáz inhibitorok kinyerésére biztosít megoldást ipari HPLC (nagyhatékonyságú folyadékkromatográf) alkalmazásával. A WO 92/16276 számú PCT közzétételi irat szerint 85 % vagy annál nagyobb tisztaságú nyers HMG-CoA-reduktáz inhibitor szerves oldószerben vagy szerves oldószer és víz elegyében oldották fel. Az elegyet ezután 2-9 pH-értékre állították be, majd HPLC oszlopra vezették. Miután a lényeges HMG-CoA-reduktáz inhibitor csúcsot összegyűjtötték, az oldószer egy részét eltávolították, majd vizet adtak hozzá vagy egy másik lehetőségként az oldószerkeverék kétharmadát eltávolították, majd a HMG-CoA reduktáz inhibitor kristályosították. Végső soron az eljárással nyert termék tisztasága legalább 99,5 % volt, körülbelül 90%-os kitermelés mellett.

A WO 92/16276 számú PCT közzétételi iratban ismertetett eljárás lehetővé teszi nagy tisztaságú HMG-CoA reduktáz inhibitorok kinyerését viszonylag magas kitermeléssel, az eljárás hátránya a hagyományos kromatográfiás oszlopokon túl a HPLC oszlopra felvitt viszonylag kismennyiségű anyag. Az oszlopokra táplálendő kis minták a kívánt anyag elegendő mennyiségének kinyerése céljából az elválasztási műveletek megnövekedett ismétlési számával, és következésképpen a nagyobb termelési költségeket eredményező nagymennyiségű felhasznált oldószerrel vannak összefüggésben.

A jelen találmány alapjául szolgáló kizárásos kromatográfiás eljárás alapján véve nem tér el az előzőleg alkalmazott kromatográfiás eljárásoktól.

A kizárásos kromatográfia az oszlopra táplált minta komponenseinek az állófázison lévő aktív helyekért történő versengésén alapszik. A minta egyes komponensei vonatszerűen szorítják ki egymást, a kiszorító anyag nagyon nagy affinitással



rendelkezik az álló fázisra nézve és a betáplált minta után fut az oszlop mentén, kényszerítve a minta komponensek egy-szakaszos zónákban történő elválasztását, amelyek a kizorító anyag sebességével mozognak. Az egyes komponensek betöményítését a tisztítással egyidejűleg hajtják végre.

A kizárásos kromatográfiás eljárás alapelve viszonylag régi, mivel már 1943. óta ismert, de a hatékony oszlopok hiánya miatt a gyakorlatba elég későn 1981-ben vezették be (Cs. Horvath és mtsai., *J. Chromatogr.*, 215 (1981) 295; *J. Chromatogr.*, 330 (1985 1; *J. Chromatogr.*, 440 (1988) 157). Ezek az írások, amelyeket referenciaként építünk a leírásba, a biológiailag aktív peptidek és polimixin antibiotikumok (polipeptidek) analitikai és preparatív elválasztását és tisztítását írják le fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás oszlopok kizárásos módban történő felhasználásával. A polimixinek esetében oktadecil szilikagél oszlopokat (250 x 4,6 mm, 5 µm szemcseméretű), mozgó fázisként 10 % acetonitrilt vízben és kizorító anyagként különböző tetraalkil-ammónium halogenideket használtak.

A legfrissebb kutatások a kizárásos kromatográfia területén (S.M. Cramer és mtsai., *Enzyme Microb. Technol.*, 11 (1989) 74; *Prep. Chromatogr.*, 1 (1988) 29; *J. Chromatogr.*, 394 (1987) 305; *J. Chromatogr.*, 439 (1988) 341; *J. Chromatogr.*, 454 (1988) 1 (elméleti optimalizálás); A. Felinger és mtsai., *J. Chromatogr.*, 609 (1992) 35 (elméleti optimalizálás), (az összes iratot referenciaként építjük be a leírásba) hasonló oszlopokat használtak; a mozgó fázis metanol volt foszfát pufferben, a kizorító anyag 2-(2-t-butoxi-etoxi)-etanol (BEE) volt acetonitrilben és nátrium-acetát. Minta-ként különböző peptideket, fehérjéket és cefalosporin C antibiotikumot használtak.

Az US 5,043,432 számú szabadalmi leírásban (1991. augusztus 27.), illetve az EP 416,416 számú szabadalmi leírásban bizonyos kis molekulatömegű (1000 dalton alatti) peptidek (különösen tuftszin és annak szintetikus származékai) kizárásos ioncserélő kromatográfiával történő tisztítási eljárását ismertetik, ahol az alkalmazott álló fázis kationcserélő gyanta, a vivő oldószer víz vagy erős savak különféle képpen hígított oldatai, és az alkalmazott kizorító anyag a trietilén-tetraammónium só különböző koncentrációi. Az US 08/875,422 számú bejelentésben, amely még nincs közzétéve, a vankomicin elválasztására és tisztítására szolgáló kizárásos kromatográfia alkalmazását ismertetjük.

Néha nehéz a nagytisztaságú hatóanyag nagyüzemi méretben történő kinyerése, mivel a laboratóriumi méretekben felhasználható számos technológia nem eléggé gazdaságos az alkalmazását igazoló nagyüzemi termelési műveletek során

vagy nem felelnek meg a környezetvédelmi kritériumoknak. A fenti körülmények arra kényszerítik az ipart, hogy olyan új technológiákat keressenek, amelyek mind kiváló minőségű terméket, mind gazdaságilag és környezetvédelmi szempontokból elfogadható termelést fognak biztosítani.

A jelen találmány megoldja a régebbi szabadalmakból és más irodalomból ismert eljárások hátrányait, amennyiben lehetővé teszi tiszta HMG-CoA reduktáz inhibitorok kinyerését, továbbá a tisztítási eljárás *per se* nem időigényesen biztosít magas kitermelést, az oldószerek kis mennyiségének felhasználásával. Az eljárás természetbarát; továbbá a méret és energia szempontjából nem támaszt nagy igényeket, ezáltal téve lehetővé a gazdaságos nagyüzemi termelést.

A jelen találmány eljárást biztosít a HMG-CoA reduktáz inhibitorok kizárásos kromatográfia alkalmazásával történő tisztítására. Azaz a nyers HMG-CoA reduktáz inhibitor tisztítási eljárásában legalább egy lépés a kizárásos kromatográfia.

A tisztítandó HMG-CoA reduktáz inhibitor például a mevasztatin, pravasztatin, lovasztatin, szimvasztatin, fluvasztatin és atorvasztatin közül választjuk. A kiválasztott inhibitor a kizárásos kromatográfia segítségével történő tisztítás céljából lakton alakban vagy sav, illetve sójának alakjában létezhet.

A jelen találmány szerinti eljárásra jellemző kizárásos kromatográfia előnyösen a következő lépéseket foglalja magában:

- a) egy kromatográfias oszlopot megfelelő mozgó fázissal kondicionálunk,
- b) betápláljuk a mozgó fázisban feloldott nyers HMG-CoA reduktáz inhibitorot,
- c) bevezetjük a kizorító anyagot a HMG-CoA reduktáz inhibitor oszlopról történő kizorítására és
- d) kinyerjük a tisztított HMG-CoA reduktáz inhibitorot.

A tisztított HMG-CoA reduktáz inhibitor előnyösen

- d1) a frakciók összegyűjtésével és
- d2) a frakciók analitikai HPLC-vel történő vizsgálatával és a frakciók tisztaságától függő összegyűjtésével nyerjük ki.

Miután kinyertük a tisztított HMG-CoA reduktáz inhibitorot, a kromatográfias oszlopot az oszlop alkohol/víz eleggyel történő mosásával regenerálhatjuk, hogy eluáljuk a kizorító anyagot.

Az itt leírt módon nyert HMG-CoA reduktáz inhibitorokat ezt követően elválasztjuk a mozgó fázistól a technika állása szerint ismert eljárások alapján, pl. liofilizáljuk.

zálással vagy előnyösen kristályosítással, amelynek során lakton formájukat, sav formájukat vagy a só formájukat (előnyösen alkáli- vagy alkáliföldfém-sók) kapjuk.

A szennyeződések felül számottevő mennyiségű HMG-CoA reduktáz inhibitorokat tartalmazó frakciókat újra alávethetjük az eljárásnak, így 95 % fölötti összkitermelést kapunk.

Az alkalmazott álló fázis fordított fázis, ahol természetes (különböző hosszúságú alkiláncokkal rendelkező szilikagél) vagy szintetikus (szerves C-18 vagy C-8) álló fázisok az alkalmasak. Előnyösen a sztírol és divinil-benzol szintetikus térhálósított polimer mátrixát használjuk. Az álló fázis részecskemérete megfelelően 3-20 μm , előnyösen 7-15 μm .

Az alkalmazott mozgó fázist előnyösen a következők közül választjuk: víz, acetonitril/víz oldat, kis szénatomszámú (előnyösen 1-4 szénatomszámú) alkoholok vizes oldata; szerves, halogénezett szerves- és szervesetlen savak pufferolt híg oldatai, pl. hangyasav, ecetsav, propionsav, sósav, bórsav, foszforsav, szénsav vagy kénsav alkálifémekkel, ammóniával vagy aminokkal pufferolt oldatai. A víz és az acetonitrillel, illetve főleg metanollal vagy etanollal készített vizes oldatok különösen előnyösek, és a vizes oldat szerves oldószer tartalma előnyösen 80 % vagy kisebb, előnyösebben 45 % vagy kisebb, különösen 30 % vagy kisebb. Mivel a toxikus metanol a mozgó fázisban a kevésbé toxikus etanollal vagy vízzel legalább részlegesen jó eredménnyel helyettesíthető, a szennyező oldószerek eltávolítása egyszerűbb, ezért a jelen találmány ökológiai szempontból észrevehető javulást jelent a technika állásához viszonyítva.

Az alkalmazott mozgó fázis pH-ja előnyösen 4,5 és 10,5 közötti, előnyösebben 6,5 és 8 közötti, különösen 7 körül van. A mozgó fázis áramlási sebességét az oszlopban 1,5 és 30 $\text{ml}/(\text{perc}\cdot\text{cm}^2)$ közötti, előnyösen 3 és 15 $\text{ml}/(\text{perc}\cdot\text{cm}^2)$ közötti értékre állítjuk be. Akkor, amikor összekeverve a mozgó fázissal a kiszorító anyagot bevezetjük a kromatográfiás oszlopra, az áramlási sebességet előnyösen 1,5 és 15 $\text{ml}/(\text{perc}\cdot\text{cm}^2)$ közötti és különösen 3-10 $\text{ml}/(\text{perc}\cdot\text{cm}^2)$ értékre állítjuk, mivel a nagyobb áramlási sebességek az összegyűjtendő minták hígulását okozzák, és az elválasztás is rosszabbá válik.

A kiszorító anyag előnyösen egy amfifil szerkezettel rendelkező vegyület, pl. felületaktív anyag, detergens és hasonló. A kiszorító anyagok példái a hosszú szén-szénláncú alkoholok, hosszú szén-szénláncú karbonsavak, hosszú szén-szénláncú alkil-amónium sók, aromás dikarbonsav észterek, oxo- és dioxo-alkoholok,

polialkilén-poliglikol- éterek, pl.: dietilén-glikol-mono(vagy di)alkiléterek, poliaryl- vagy polialkilén-poliaryl- éterek, pl.: Triton® X-100, stb. A fenti "hosszú szénláncú" kifejezés jelentése legalább 4 szénatomszámú lánccal, előnyösen legalább 10 szénatomszámú lánccal és előnyösebben legalább 14 vagy hosszabb szénatomszámú lánccal rendelkező alkilcsoport.

A kizorító anyag koncentrációját a mozgó fázisban általában 1-35 %-ra, előnyösen 2-20 %-ra és különösen 7-14 %-ra állítjuk be.

A kromatográfiás oszlopról eluált egyes frakciókban a tisztaság szabályozására előnyösen a vizsgálandó HMG-CoA reduktáz inhibitorokra irányított analitikai HPLC eljárást végezhetünk az alábbiak szerint.

A vizsgálandó mintát 100-szorosra hígítjuk a 20 mM vizes NH_4HCO_3 oldatot és acetonitrilt tartalmazó mozgó fázissal (az acetonitril arányt úgy állítjuk be, hogy a vizsgálandó minta retenciós tényezője 5 és 10 között legyen). A minta 10 μl -ét Hypersil ODS oszlopra visszük fel (Hypersil, UK, részecskeméret 3 μm , oszlopméret 50 x 4,6 mm) nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia céljából. Az oszlopot a mozgó fázissal mossuk 2 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 235 nm hullámhosszon mérjük. A minta HPLC-s tisztaságát a kromatogramon lévő egyes csúcsok területei közötti arányból számoljuk.

A kromatográfia befejezését követően az állófázist előnyösen regeneráljuk, pl. a mozgó fázist rövid szénszénláncú alkohol 20-100 %-os vizes oldatával alkalmazva.

A találmányt nem korlátozó jelleggel a következő példákon mutatjuk be.

1. példa

Pravasztatin (1,0 g, HPLC-s tisztasága 88 %, hatóanyagtartalom 85 %) nyers nátrium sóját 10 ml A. mozgó fázisban (desztillált víz) oldottuk fel, a pH-t 0,2 M NaOH oldattal 7-re állítottuk be és az oldatot leszűrtük. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot a B. mozgó fázissal mostuk, amely 7 % dietilén-glikol-monobutilétert tartalmaz az A. mozgó fázisban, 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 0,5 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml 70 %-os metanollal mostuk. A kapott frakciókat a fenti HPLC-s

analitikai eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban (7 ml) a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

2. példa

Pravasztatin (0,4 g, HPLC-s tisztasága 88 %, hatóanyagtartalom 85 %) nyers nátrium sóját 5 ml A. mozgó fázisban (desztillált víz) oldottuk fel, a pH-t 0,2 M NaOH oldattal 7-re állítottuk be, és az oldatot leszűrtük. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Kromasil 100 C-18 oszlopra (EKA Chemicals AB, Sweden) tápláltuk, amelynek részecskemérete 10 μm , oszlopmérete 200 x 10 mm. Az oszlopot 7 % Triton X-100-at A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 0,5 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. A kapott frakciókat a fenti HPLC-s analitikai eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban (3 ml) a HPLC-s tisztaság 99,7 % volt.

3. példa

0,6 g nyers pravasztatin-nátriumsót 5 ml desztillált vízben feloldottunk. Az 1. példában ismertetett protokollt használtuk az alkalmazott mozgó fázis (30 % vizes metanol oldat) kivételével és 99,8 % HPLC-s tisztaságú összegyűjtött frakciókat kaptunk.

4. példa

A 3. példában ismertetett eljárást megismételtük, ahol a kizorító anyag koncentrációja a mozgó fázisban 14 % volt. Az 1. példában leírt kritérium szerint az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

5. példa

Pravasztatin-laktont (0,4 g, HPLC-s tisztasága 85 %) 33 ml, 45 % metanolt tartalmazó A. mozgó fázisban feloldottunk. Az oszlopot A. mozgó fázissal

ekvilibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 7 % dietilén-glikol-dibutilétert A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és az 1 ml-es frakciókat az abszobanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml 70 %-os metanollal mostuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,7 % volt.

6. példa

Pravasztatin-laktont (0,3 g, HPLC-s tisztasága 85 %) 80 ml, 30 % metanolt tartalmazó A. mozgó fázisban feloldottunk. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Licrosphere RP 18 oszlopra tápláltuk, amelynek részecskemérete 12 μm , oszlopmérete 200 x 10 mm. Az oszlopot 5 % dietilén-glikol-mono-n-hexilétert A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 235 nm hullámhosszon mértük és az 1 ml-es frakciókat az abszobanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml 90 %-os metanollal mostuk. A kapott frakciókat a fenti HPLC-s analitikai eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

7. példa

Pravasztatin-laktont (0,3 g, HPLC-s tisztasága 85 %) 25 ml, 35 % acetonitrilt tartalmazó A. mozgó fázisban feloldottunk. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Licrosphere RP 18 oszlopra tápláltuk, amelynek részecskemérete 12 μm , oszlopmérete 200 x 10 mm. Az oszlopot 1 % dietilén-glikol-dibutil-étert A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 235 nm hullámhosszon mértük és az 1 ml-es frakciókat az abszobanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml 90 %-os metanollal mostuk. A kapott frakciókat a fenti HPLC-s analitikai eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú

frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

8. példa

A 7. példában ismertetett eljárást megismételtük, ahol a B. mobil fázis 0,85 % dietil-ftalát volt az A. mozgó fázisban.

A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

9. példa

Szimvasztatin-laktont (0,42 g, HPLC-s tisztasága 87 %) 6 ml, 66 % acetonitrilben feloldottunk és 1,2 mmol nátrium-hidroxiddal hidrolizáltuk. Az acetonitrilt eltávolítottuk és a pH-t hígított H_3PO_4 -val 7-re állítottuk be. Az oszlopot 14 % metanolt tartalmazó A. mozgó fázissal ekvibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 6,7 % dietilén-glikol-mono-n-hexilétert A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 0,5 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

10. példa

Szimvasztatin-laktont (0,5 g, HPLC-s tisztasága 87 %) 20 ml, 70 % metanolt tartalmazó mozgó fázisban feloldottunk. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 3 % dekánsavat A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 0,75 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől

gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk. A kapott frakciókat a fenti eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,7 % volt.

11. példa

Szimvasztatin-laktont (0,5 g, HPLC-s tisztasága 87 %) 20 ml, 60 % acetonitrilt tartalmazó mozgó fázisban oldottuk fel. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 2 % tetrakis(decil)-ammónium bromid A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 4,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és az 1 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

12. példa

Lovasztatin-laktont (0,5 g, HPLC-s tisztasága 87 %) 60 ml, 75 % metanolban feloldottunk. Az oszlopot 70 % metanolt tartalmazó A. mozgó fázissal ekvibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 70 % metanolt és 4,5 % dekánsavat A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 6 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 1 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk.

A kapott frakciókat a fent leírt HPLC-s analitikai eljárással vizsgáltuk.

A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,9 % volt.

13. példa



Lovasztatin-laktont (0,42 g, HPLC-s tisztasága 87 %) 8 ml, 50 % acetonitrilben feloldottunk és 1,5 mmol nátrium-hidroxiddal hidrolizáltuk. Az acetonitrilt eltávolítottuk és a pH-t hígított H_3PO_4 -val 7-re állítottuk be. Az oszlopot 14 % metanolt tartalmazó A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 6,7 % dietilén-glikol-mono-n-hexilétert A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 0,25 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk.

A kapott frakciókat a 9. példában leírt eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

14. példa

Mevasztatin-laktont (0,5 g, HPLC-s tisztasága 85 %) 150 ml, 70 % metanolt tartalmazó mozgó fázisban oldottuk fel. Az oszlopot A. mozgó fázissal ekvilibráltuk. A kapott mintát Grom-Sil 120-ODS HE oszlopra (Grom Analytic + HPLC GmbH, Germany) tápláltuk, amelynek részecskemérete 11 μm , oszlopmérete 250 x 10 mm. Az oszlopot 4,5 % dekánsavat A. mozgó fázisban tartalmazó B. mozgó fázissal mostuk 6 ml/perc áramlási sebességgel. Az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon mértük és a 1 ml-es frakciókat az abszorbanciában megjelenő kezdeti növekedéstől gyűjtöttük. Amikor a jel lecsökkent, az oszlopot 25 ml metanollal mostuk.

A kapott frakciókat a fenti HPLC-s analitikai eljárással vizsgáltuk. A 99,5 % vagy annál nagyobb tisztaságú frakciókat összegyűjtöttük. Az összegyűjtött frakciókban a HPLC-s tisztaság 99,8 % volt.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás HMG-CoA reduktáz inhibitorok előállítására, azzal jellemezve, hogy a nyers HMG-CoA reduktáz inhibitorok tisztítási eljárásában a lépések egyike kizárásos kromatográfia, amely magában foglalja egy kizorító anyag alkalmazását a HMG-CoA reduktáz inhibitor kizárására.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a HMG-CoA reduktáz inhibitor a mevasztatin, pravasztatin, lovasztatin, szimvasztatin, fluvasztatin és atorvasztatin közül választjuk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a HMG-CoA reduktáz inhibitor lakton alakban vagy sav, illetve annak sójának alakjában van.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kizárásos kromatográfia a következő lépéseket foglalja magában:

- a) egy kromatográfias oszlopot egy mozgó fázissal kondicionálunk,
- b) mozgó fázisban feloldott nyers HMG-CoA reduktáz inhibitorot táplálunk be,
- c) bevezetjük a kizorító anyagot a HMG-CoA reduktáz inhibitor oszlopról történő kizorítására és
- d) kinyerjük a tisztított HMG-CoA reduktáz inhibitorot.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztított HMG-CoA reduktáz inhibitorot

- d1) a frakciók összegyűjtésével és
- d2) a frakciók analitikai HPLC-vel történő vizsgálatával és a frakciók tisztaságtól függő összegyűjtésével nyerjük ki.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kizárásos kromatográfia egy azt követő további lépést foglal magában:

- e) a kromatográfias oszlopot az oszlop alkohol/víz elegyével történő mosásával regeneráljuk, hogy a kizorító anyagot eluáljuk.



7. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázist a víz, acetonitril/víz oldatok vagy a rövidszénláncú alkoholok vizes oldatai, valamint a szerves, halogénezett szerves vagy szervetlen savak fém kationokkal, ammóniával vagy aminosavakkal pufferolt híg oldatai közül választjuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázis a víz, egy acetonitril/víz oldat vagy rövidszénláncú alkoholok vizes oldatának valamelyike.

9. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alkalmazott mozgó fázis pH-ja 4,5 és 10,5 között van.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alkalmazott mozgó fázis pH-ja 6,5 és 8 között van.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alkalmazott mozgó fázis pH-ja 7.

12. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázis átáramlási sebessége a kromatográfiás oszlopon 1,5 és 30 ml/(perc·cm²) között van.

13. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mozgó fázis/kiszorító anyag elegyének átáramlási sebessége a kromatográfiás oszlopon 3 és 15 ml/(perc·cm²) között van.

14. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázist a kromatográfia befejezését követően rövidszénláncú alkoholok 20-100 %-os vizes oldatával regeneráljuk.

15. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis fordított fázis.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis egy természetes alapú fordított fázis, így szilikagél különböző hosszúságú alkilcsoportokkal.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis vagy C-18, vagy C-8.

18. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis egy szintetikus térhálósított polimer mátrix.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a térhálósított polimer mátrix sztírol és divinil-benzol kopolimere.

20. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis részecskemérete 3 és 20 μm között van.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az álló fázis részecskemérete 7 és 15 μm között van.


22. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kizorító anyagot a hosszúszenlácú alkoholok, hosszúszenlácú karbonsavak, hosszúszenlácú alkilammónium sók, aromás dikarbonsav-észterek, oxo- és dioxo-alkoholok, poli(alkilén)-poliglükol-éterek és poliaril- vagy polialkilén-poliaril-éterek közül választjuk.

23. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kizorító anyag koncentrációja a mozgó fázisban 1 és 35 % között van.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kizorító anyag koncentrációja a mozgó fázisban 2 és 20 % között van.

25. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazása egy 99,7 %-ot meghaladó HPLC-s tisztaságú HMG-CoA reduktáz inhibitor előállítására.

A meghatalmazott


GÓDOLLE, KÉKES, Mészáros & SZABÓ
Szabadelmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadelmi ügyvivő