

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.10.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.10.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/238278**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 4/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/031230**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/030415**

(21) Číslo dokumentu:

2003-1166

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 31/22
A 61 K 31/23
A 61 K 31/19
A 61 P 3/06
A 61 P 9/00

(71) Přihlašovatel:
BIOGAL GYOGYSZERGYAR RT, Debrecen, HU

(72) Původce:
Keri Vilmos, Debrecen, HU
Deak Lajos, Debrecen, HU
Forgacs Ilona, Debrecen, HU
Szabo Csaba, Debrecen, HU
Nagyne Arvai Edit, Debrecen, HU

(74) Zástupce:
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Sodná sůl pravastatinu, která v podstatě
neobsahuje pravastatin lakton a epi-pravastatin
a kompozice na její bázi**

(57) Anotace:
**Sodná sůl pravastatinu, která v podstatě neobsahuje
pravastatin lakton a epi-pravastatin, C-6 epimer pravastatinu.
Nové způsoby, jimiž se z fermentační pudy izoluje sodná sůl
pravastatinu v takové vysoké čistotě.**

CZ 2003 - 1166 A3

Sodná sůl pravastatinu, která v podstatě neobsahuje pravastatin lakton a epi-pravastatin, a kompozice na její bázi

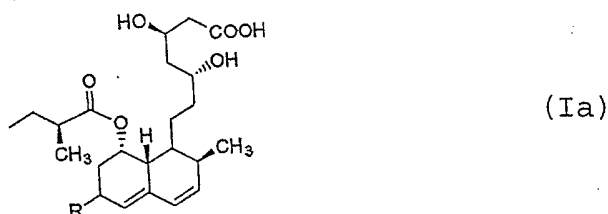
Oblast techniky

Vynález se týká statinů, konkrétněji sodné soli pravastatinu a způsobů její izolace z fermentační půdy, jako produktu enzymatické hydroxylace kompaktinu.

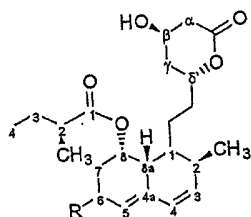
Dosavadní stav techniky

Statinová léčiva jsou v současné době terapeuticky nejúčinnějšími dostupnými léčivy pro snižování hladiny LDL v krevním oběhu pacientů ohrožených kardiovaskulární chorobou. Do této třídy léčiv patří pravastatin a také kompaktin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin a atorvastatin.

Pravastatin je generickým názvem chemické sloučeniny, [1S-[1 α (β^* , δ^*)2 α , 6 α , 8 β (R*), 8 $\alpha\alpha$]]-1,2,6,7,8,8 α -hexahydro- β , δ , 6-trihydroxy-2-methyl-8-(2-methyl-1-oxobutyloxy)-1-naftalen-heptanové kyseliny (registrační číslo CAS 81093-370). Molekulární struktura pravastatinu odpovídá obecnému vzorci Ia



kde R představuje hydroxyskupinu. Laktonová forma odpovídá obecnému vzorci Ib



(Ib)

v němž je vyznačeno číslování atomů.

Pravastatin, kompaktin (sloučenina obecného vzorce Ia, kde R představuje vodík), lovastatin (sloučenina obecného vzorce Ia, kde R představuje skupinu CH_3), simvastatin, fluvastatin a atorvastatin vždy obsahují alkylový řetězec, který je zakončen skupinou karboxylové kyseliny a který nese dvě hydroxyskupiny v polohách β a δ vzhledem ke skupině karboxylové kyseliny. Skupina karboxylové kyseliny a hydroxyskupina v poloze δ mají sklon k laktonizaci (viz obecný vzorec Ib). Laktonizovatelné sloučeniny, jako statiny, se mohou vyskytovat ve formě volné kyseliny nebo ve formě laktonu nebo jako rovnovážná směs obou těchto forem. Laktonizace je při výrobě statinových léčiv zdrojem zpracovatelských obtíží, jelikož forma volné kyseliny a forma laktonu mají rozdílnou polaritu. Při čištění jedné formy dojde pravděpodobně k odstranění druhé formy spolu s nečistotami, což povede k nižšímu výtěžku. Při zpracování laktonizovatelných sloučenin za účelem jejich izolace ve vysokém výtěžku je tudíž obvykle nutno postupovat velmi opatrně.

V současné době je z ekonomického hlediska nejvýhodnější připravovat pravastatin mikrobiální hydroxylací kompaktinu v poloze C-6. Ačkoliv jsou enzymatické způsoby vysoce stereoselektivní, sodná sůl pravastatinu získaná po izolaci z fermentační půdy je obvykle znečištěna značným množstvím C-6 epimeru pravastatinu ("epiprava"). Uhlík v poloze 6 je bis-

allylický, a má tedy sklon k epimerizaci. Minimalizace epimerizace vyžaduje pečlivou regulaci pH a jiných podmínek během izolace pravastatinu. Známé způsoby izolace pravastatinu z fermentační půdy však nejsou vhodné pro izolaci pravastatinu ve formě sodné soli nebo se jimi získá sodná sůl pravastatinu, která je znečištěná výraznými množstvími pravastatinu laktonu a/nebo epiprava. Řešení podle vynálezu splňuje potřebu vyvinout účinný způsob izolace sodné soli pravastatinu z fermentační půdy v preparativním měřítku, jímž se získá produkt o vysoké čistotě a ve vysokém výtěžku, bez nutnosti chromatografického čištění.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je sodná sůl pravastatinu, která v podstatě neobsahuje pravastatin lakton a epiprava, C-6 epimer pravastatinu. Dále je předmětem vynálezu způsob výroby takové v podstatě čisté sodné soli pravastatinu, který lze provádět v průmyslovém měřítku.

V přednostním provedení tento způsob zahrnuje extrakci pravastatinu z vodné fermentační půdy do organického rozpouštědla, zpětnou extrakci pravastatinu do bázeického vodného roztoku a reextrakci do organického rozpouštědla za vzniku organického roztoku, který obsahuje pravastatin. Tento vynález umožňuje získat pravastatin z organického roztoku ve formě soli a následně přečistit tuto sůl překrystalováním. Překrystalovaná sůl pravastatinu se poté převede na formu sodné soli a veškerý nadbytek sodných iontů se zachytí ionexovou pryskyřicí. Sodnou sůl pravastatinu je poté možno z roztoku izolovat ve vysoce čistém stavu překrystalováním, lyofilizací nebo jinými způsoby.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

Předmětem vynálezu je sodná sůl pravastatinu, která v podstatě neobsahuje pravastatin lakton a epiprava a způsob izolace sodné soli pravastatinu o vysoké čistotě z fermentační půdy.

Enzymatická hydroxylace kompaktinu

Půdou pro enzymatickou hydroxylaci, z níž se pravastatin izoluje, může být jakákoliv vodná půda, která je známá pro fermentaci kompaktinu v průmyslovém měřítku, jako jsou způsoby popsané v US patentu č. 5 942 423 nebo 4 346 227. Enzymatická hydroxylace se přednostně provádí za použití živé kultury *Streptomyces* a živné směsi kompaktinu a dextrosy. Pokud je půda po dokončení fermentace neutrální nebo bázičká, přidává se k ní kyselina, aby se pH půdy upravilo na asi 1 až asi 6, přednostně na asi 1 až asi 5,5, a výhodněji na 2 až 4. Jako kyseliny, kterých je možno použít, lze uvést kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu sírovou, kyselinu trifluoroctovou nebo jakoukoliv jinou protickou kyselinu, přednostně kyselinu, jejíž 1M roztok ve vodě má pH méně než 1. Okyselením fermentační půdy se všechny karboxylátové soli pravastatinu převedou na volnou kyselinu a/nebo lakton.

Izolace v podstatě čisté sodné soli pravastatinu

Přednostně se pravastatin nejprve získá z vodné fermentační půdy v relativně vysoce koncentrovaném organickém roztoku sekvencí stupňů extrakce a zpětné extrakce. Organickým roztokem pravastatinu je přednostně obohacený organický roztok pravastatinu.

V prvním stupni se pravastatin přednostně extrahuje z fermentační půdy. Z vodné fermentační půdy je pravastatin

efektivně možno extrahovat alkylformiáty se 2 až 4 atomy uhlíku v alkylové části a alkylestery s 1 až 4 atomy uhlíku karboxylových kyselin se 2 až 4 atomy uhlíku, kde alkylskupiny mohou mít řetězec lineární, rozvětvený nebo cyklický. Jako přednostní estery je možno uvést ethylformiát, n-propylformiát, isopropylformiát, n-butylformiát, sek-butylformiát, isobutylformiát, terc-butylformiát, methylacetát, ethylacetát, n-propylacetát, isopropylacetát, n-butylacetát, sek-butylacetát, isobutylacetát, terc-butylacetát, methylpropionát, ethylpropionát, n-propylpropionát, isopropylpropionát, butylpropionát, methylbutyrát, ethylbutyrát, n-propylbutyrát, isopropylbutyrát, butylbutyráty, methylisobutyrát, ethylisobutyrát, propylisobutyráty a butylisobutyráty. Zjistili jsme, že z těchto přednostních organických rozpouštědel jsou zvláště vhodné ethylacetát, isobutylacetát, propylacetát a ethylformiát. Nejvýhodnějším extrakčním rozpouštědlem je isobutylacetát. Namísto esterů je možno použít jiných organických rozpouštědel. Je možno použít halogenovaných uhlovodíků, aromatických sloučenin, ketonů a etherů. Jako jejich příklady lze uvést dichlormethan, chloroform, tetrachlormethan, 1,2-dichlorethan, benzen, methylbutylketon, diethylether a methylterc-butylether.

Pravastatin je popřípadě možno zpětně extrahovat do báze vodného roztoku o pH od asi 8,0 do asi 9,5. Báze je přednostně hydroxid sodný, hydroxid amonný nebo hydroxid draselný, nejvýhodněji hydroxid sodný. Extrakční rozpouštědlo se s báze vodným roztokem uvádí do styku, dokud množství pravastatinu v organické fázi není v podstatě vyčerpáno, což se stanoví chromatografií na tenké vrstvě nebo jakýmkoliv jiným postupem, včetně subjektivního posouzení, že došlo ke kontaktu, který je dostatečný pro úplnou extrakci. Za účelem optimální izolace lze provádět vícenásobnou zpětnou extrakci. Když je však organickou fází isobutylacetát, je již jediná

zpětná extrakce vysoce efektivní. Zpětné extrakce je možno použít za účelem zkoncentrování pravastatinu tak, že se použije vodné báze v objemu, který je menší než objem organického extraktu. Přednostně se zpětná extrakce provádí za použití báze vodného roztoku v objemu, který je menší než jedna třetina objemu organického extraktu, přednostně menší než jedna čtvrtina, a nejvýhodněji představuje asi jednu pětinu objemu organického extraktu.

Vodný roztok se přednostně okyselí kyselinou, přednostně kyselinou trifluoroctovou, kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou octovou nebo kyselinou fosforečnou, výhodněji kyselinou sírovou, na pH v rozmezí od asi 1,0 do asi 6,5, výhodněji od asi 2,0 do asi 3,7.

Pravastatin se přednostně reextrahuje do jednoho z organických rozpouštědel, která jsou uvedena výše jako rozpouštědla, kterých se používá pro extrakci pravastatinu z fermentační pudy. Jako organického rozpouštědla se může, ale nemusí použít stejného rozpouštědla, jakého bylo použito pro extrakci pravastatinu z fermentační pudy. Při této reextrakci se dosáhne dalšího obohacení pravastatinu tak, že se reextrahuje do množství organického rozpouštědla, které představuje přednostně méně než asi 50 % objemových vodného extraktu, výhodněji asi 33 % objemových až asi 20 % objemových, a ještě výhodněji asi 25 % objemu vodného extraktu.

Pravastatin lze zkoncentrovat ze 100 litrů fermentační pudy na 8 litrů organického roztoku s 89% výtěžkem, vztaženo na počáteční organický extrakt. Odborník v tomto oboru však bude schopen pomocí vícenásobné extrakce dosáhnout vyššího výtěžku přečištěného pravastatinu. Výše však bylo popsáno pouze přednostní provedení s jedinou extrakcí. Při tomto

přednostním provedení se dosahuje rovnováhy mezi náklady na rozpouštědla a vysokým výtěžkem produktu. Odchyly od tohoto přednostního způsobu, jimiž se dosáhne dalšího zlepšení výtěžku opakovanými extrakcemi a z nichž je výše popsáno pouze jedno provedení, nezbytně nemusejí představovat odklon od ducha vynálezu. Před zpracováním za účelem získání pravastatinu z organického roztoku "vysolováním" se organický roztok přednostně vysuší, což lze provádět za použití obvyklých sušicích činidel, jako síranu hořečnatého, síranu sodného, síranu vápenatého, siliky, perlitu apod., a popřípadě odbarví aktivním uhlím. Vysušený a/nebo odbarvený organický roztok se přednostně poté oddělí za použití obvyklých způsobů, například filtrací nebo dekantací.

Tento vynález umožňuje získat pevný pravastatin z organického roztoku vysolovacím způsobem. Vysolovací způsob přednostně zahrnuje stupně, v nichž se pevný pravastatin získá ve formě soli pravastatinu. Kationtem soli pravastatinu může být ammonium nebo aminový kation. Alternativně kationtem soli pravastatinu může být kation alkalického kovu. Jako přednostní kationty alkalického kovu je možno uvést kationty lithia, sodíku a draslíku.

V jednom provedení tohoto vynálezu se pevný pravastatin z organického roztoku vysolí působením amonia nebo aminového kationtu. Aminem může být primární, sekundární nebo terciární amin. Lze použít jakéhokoliv alkyl- nebo arylaminu, který není bráněný takovým způsobem, který by znemožnil iontovou interakci mezi aminovým dusíkem a karboxyskupinou pravastatinu. Jako neomezující příklady aminů lze uvést methyl-, dimethyl-, trimethyl-, ethyl-, diethyl-, triethylamin a jiné primární, sekundární a terciární aminy s 1 až 6 atomy uhlíku v každém z uhlovodíkových zbytků, a dále morfolin, N-methylmorfolin, isopropylcyklohexylamin, piperidin apod. Bez

ohledu na absenci, přítomnost nebo vícenásobnost substituce na dusíku se sůl vznikající reakcí s amoniakem nebo aminem dále označuje jako amonná sůl. Pod tímto termínem se tedy rozumějí jak soli s aminy, tak soli s amoniakem.

Srážení amonné soli pravastatinu je také možno vyvolat přidavkem amonné soli, a to buď samotné nebo v kombinaci s amoniakem nebo aminem. Z amonných solí se dává přednost následujícím solím amoniaku: chloridu amonnému, NH_4Cl ; bromidu amonnému, NH_4Br ; jodidu amonnému, NH_4I ; síranu amonnému, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; dusičnanu amonnému, NH_4NO_3 ; fosforečnanu amonnému, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$; siřičitanu amonnému, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_4$; a octanu amonnému, NH_4OAc . Největší přednost se dává chloridu amonnému. Amonné soli a vysokovroucí kapalně a pevně aminy je možno přidávat obvyklými způsoby, přednostně v prostorách s dobrým větráním, buď jako pevné látky, kapaliny in substancia nebo roztoky ve vodných nebo organických rozpouštědlech. Přidávání plynného amoniaku vyžaduje speciální vybavení pro zacházení s leptavými plyny. Takové vybavení, jako tlakové nádoby, regulátory, ventily a potrubí jsou dobře dostupné. Ve zvláště přednostním provedení se pravastatin z organického roztoku získá jako amonná sůl tak, že se k organickému roztoku přidá plynný amoniak a chlorid amonný.

Teplotu, při níž by se měl přidávat amoniak, amin a/nebo amonná sůl, lze stanovit rutinními zkouškami, tak že se provede reakce v malém měřítku a monitoruje se její exotermičnost. V přednostním provedení se neumožní zvýšení teploty roztoku nad 40°C . Ačkoliv lze použít i tak vysokých teplot, jako 80°C , aniž by došlo k významnému rozkladu pravastatinu, řada rozpouštědel používaných pro účely tohoto vynálezu bude vřít při teplotách nižších. Pokud se používá amoniaku, teplota přednostně leží v rozmezí od asi -10 do asi 40°C .

V alternativním provedení je pevný pravastatin možno vysolit z organického roztoku ve formě soli s alkalickým kovem tak, že se k organickému roztoku přidá kation alkalického kovu ve formě soli alkalického kovu. Jako přednostní kationty alkalického kovu je možno uvést kationty lithia, sodíku a draslíku.

Získaný pevný pravastatin může být ve formě krystalu nebo ve formě amorfni sraženiny.

Přednostně jakmile se tvorba pevného pravastatinu zastaví nebo se jinými prostředky určí, že pravastatin byl v podstatě spotřebován, mělo by se přidávání aminu nebo soli alkalického kovu ukončit.

Pevný pravastatin podle tohoto vynálezu může být ve formě krystalu. Alternativně pevný pravastatin může být ve formě amorfni pevné látky.

Když se použije amoniaku nebo těkavého aminu, nádoba by přednostně měla být větrána, aby došlo k rozptýlení nadměrných výparů. Pevný pravastatin lze poté izolovat filtrací, dekantací rozpouštědla, odpařením rozpouštědla nebo jiným takovým způsobem, přednostně filtrací. Následně je pevný pravastatin možno promýt, přednostně isobutylacetátem a acetonem.

Po případném promytí pevného pravastatinu se amonná sůl pravastatinu přednostně přečistí jednonásobným nebo vícenásobným, nejvýhodněji trojnásobným, překrystalováním. Za účelem přečištění se sůl pravastatinu přednostně rozpustí ve vodě. Polarita roztoku se přednostně sníží přidávkou antirozpouštědla. Antirozpouštědlem je přednostně vodorozpustné organické rozpouštědlo nebo rozpouštědlová směs, v nichž je pravastatin špatně rozpustný. Antirozpouštědlem je nejvýhodněji isobutylacetát a aceton.

Sůl pravastatinu je možno nechat překrystalovat spontánně nebo je možno její překrystalování indukovat tak, že se provede další stupeň, v němž se přidá společný ion. Při přednostním způsobu, při němž se pravastatin čistí ve formě amonné soli, se překrystalování této amonné soli indukuje přidavkem chloridu amonného.

Překrystalování je možno provádět při asi -10°C až asi 40°C , přednostně při asi 0 až asi 40°C . Poté, co je sůl pravastatinu z roztoku v podstatě překrystalována, se krystaly izolují a je možno je promýt, například směsí isobutylacetátu a acetonu v poměru $1 : 1$, a vysušit. Sušení lze provádět při teplotě okolí, přednostně však při mírně zvýšené teplotě nižší než 45°C , přednostně při asi 40°C . Aby se dosáhlo dobrého účinku, jako při postupech podle příkladů 3 a 4, je překrystalování popřípadě možno opakovat. Každé opakování probíhá s výtěžkem asi 92 %.

Po přečištění soli pravastatinu se kation soli pravastatinu přednostně převede za vzniku sodné soli pravastatinu.

Bez omezení jakoukoliv teorií máme za to, že je výhodné převést kation soli pravastatinu za vzniku sodné soli pravastatinu, jelikož v tomto stupni výměny protiontu dochází k odstranění anorganických nečistot.

Pravastatin se přednostně uvolní ze své soli s aminem nebo alkalickým kovem tak, že se rozpustí ve vodném rozpouštědle, vodný roztok se okyselí jakoukoliv protickou kyselinou, přednostně kyselinou sírovou, na pH asi 2 až asi 4, výhodněji na pH asi 3,1, a pravastatin se extrahuje organickým rozpouštědlem. Organické rozpouštědlo, kterým může být kterýkoliv z výše uvedených organických rozpouštědel, přednostně však isobutylacetát, se popřípadě uvádí do styku s okyseleným

roztokem dokud pravastatin není v podstatě úplně převeden do organické fáze. Organická fáze se přednostně oddělí od vodné fáze a po případném promytí vodou, kterým se odstraní zbytky, se pravastatin zpětně extrahuje vodným roztokem hydroxidu sodného při pH od asi 7,4 do asi 13,0. Zpětná extrakce se přednostně provádí při snížené teplotě od asi 8 do asi 10°C.

Po extrakci do vodného hydroxidu sodného se nadbytek sodných kationtů zachytí, aby se dosáhlo ekvivalence sodného kationtu a pravastatinu téměř 1 : 1, za použití ionexové pryskyřice, která je nerozpustná ve vodě. Vhodnými ionexovými pryskyřicemi jsou pryskyřice kationtového a chelátového typu, přednostně silně a slabě kyselé ionexové pryskyřice.

K silně kyselým katexovým pryskyřicím, kterých je možno použít, patří katexy obsahující skupiny sulfonové kyseliny (SO_3H^+). Jako jejich příklady lze uvést komerční produkty Amberlite^(R) IR-118, IR-120, 252H; Amberlyst^(R) 15, 36; Amberjet^(R) 1200 (H) (Rohm and Haas); Dowex^(R) řady 50WX, Dowex HCR-W2, Dowex 650C, Dowex Marathon C, Dowex DR-2030 a Dowex HCR-S, ionexové pryskyřice (Dow Chemical Co.); pryskyřice řady Diaion SK 102 až Diaion SK 116 a Lewatit SP 120 (Bayer). Přednostní silně kyselou katexovou pryskyřicí je Amberlite^(R) 120, Dowex 50WX a řada Diaion SK.

Jako slabě kyselé katexové pryskyřice lze uvést pryskyřice obsahující pendantní skupiny karboxylové kyseliny. Jako slabě kyselé katexové pryskyřice je možno jmenovat komerční produkty Amberlite CG-50, IRP-64, IRC 50 a C 67, řady Dowex CCR, řady Lewatit CNP (Bayer) a řady Diaion WK (Mitsubishi), z nichž se největší přednost dává pryskyřicím Amberlite^(R) IRC50, Lewatit CNP80 a Diaion WK 10. Menší přednost se dává ionexovým pryskyřicím chelátového typu. Jako některé z druhů dostupných na trhu lze uvést Amberlite^(R) IRC-718 a IRC-467.

Roztok obsahující sodnou sůl pravastatinu a nadbytek sodných kationtů je možno uvést do styku s ionexovou pryskyřicí jakýmkoliv způsobem známým v tomto oboru, například tak, že se roztok nechá projít sloupцем nebo ložem pryskyřice nebo že se roztok v nádobě míchá s dostatečným množstvím pryskyřice. Způsob kontaktu není rozhodující. Po zachycení nadbytku sodných iontů by pH roztoku sodné soli pravastatinu mělo být v rozmezí od asi 7 do asi 10, přednostně od asi 7,4 do asi 7,8, ačkoliv se pH bude měnit v závislosti na zředění. Snížení pH roztoku sodné soli pravastatinu z vyšší hodnoty na nižší a jeho ustálení na nižší hodnotě je důkazem, že zachycování nadbytku sodných iontů je v podstatě dokončeno. Poté, co je zachycování v podstatě dokončeno, se roztok sodné soli pravastatinu přednostně od pryskyřice obvyklým způsobem oddělí. Roztok je možno shromáždit jako eluát ze sloupce nebo lože, nebo ho lze odfiltrovat, dekantovat apod.

Sodnou sůl pravastatinu je z roztoku sodné soli pravastatinu možno izolovat krystalizací. Efektivní krystalizace může nejprve vyžadovat částečné odstranění vody, což lze provést vakuovou destilací nebo nanofiltrací. V přednostním provedení se vodný roztok sodné soli pravastatinu před krystalizací zkoncentruje na asi 20 až asi 50 % (hmotn./objem). V případě potřeby lze po zkoncentrování vodného roztoku sodné soli pravastatinu upravit pH na asi 7 až asi 10 za použití ionexové pryskyřice v H^+ formě.

Krystalizaci může usnadnit přídavek vodorozpustného organického rozpouštědla nebo organické rozpouštědlové směsi k roztoku sodné soli pravastatinu. V této souvislosti lze zmínit zejména aceton a směsi acetonu a acetonitrilu, ethanolu a acetonitrilu, a ethanolu a ethylacetátu. Jedním z nejvýhodnějších rozpouštědlových systémů pro krystalizaci sodné soli pravastatinu je směs vody, acetonu a acetonitrilu v poměru 1 : 3 : 12, která vznikne tak, že se roztok sodné soli

pravastatinu zkoncentruje na asi 30 % (hmotn./objem) a poté se k němu přidá příslušný objem směsi acetonu a acetonitrilu v poměru 1 : 4. Nejvýhodnější krystalizační rozpouštědlovou směsí je směs vody a acetonu v poměru 1 : 15.

Sodnou sůl pravastatinu lze také izolovat lyofilizací vodného roztoku sodné soli pravastatinu.

Bez ohledu na to, zda izolace provádí lyofilizací nebo krystalizací nebo jinými způsoby, které nesnižují čistotu produktu, sodná sůl pravastatinu izolovaná při provádění tohoto vynálezu v podstatě neobsahuje pravastatin lakton a epiprava. Jak dokládají dále uvedené příklady, je možno izolovat sodnou sůl pravastatinu, která obsahuje méně než 0,5 % hmotn. znečištění tvořeného pravastatin laktonem a méně než 0,2 % hmotn. znečištění tvořeného epiprava. Za použití přednostních provedení vynálezu, z nichž dvě jsou popsána v příkladech 1 a 3, lze izolovat sodnou sůl pravastatinu, která obsahuje méně než 0,2 % hmotn. pravastatin laktonu a 0,1 % epiprava.

Vysoce čisté sodné soli pravastatinu získané způsobem podle tohoto vynálezu se přednostně používá při léčení hypercholesterolemie a za tímto účelem ji lze podávat savcům jakýmkoliv způsobem. Nejvýhodnějším předepsaným způsobem podávání je denní perorální režim. U lidí s normální funkcí jater a střední tělesnou hmotností je snížení hladiny cholesterolu v séru typicky pozorováno při perorálním podávání denní dávky sodné soli pravastatinu 10 mg nebo více. Podávaným množstvím vysoce čisté sodné soli pravastatinu může být jakékoliv účinné množství. Přednostní dávky při perorálním podávání obsahují asi 10 mg až asi 40 mg sodné soli pravastatinu. Jako perorální dávkovací formy je možno uvést tablety, pilule, tobolky, pastilky, sáčky, suspenze, prášky, elixíry apod. V podstatě čistou sodnou sůl pravastatinu lze

podávat jakýmkoliv způsobem, ale přednost se dává perorálnímu podáváníí.

Vysoce čistý pravastatin je možno podávat samotný nebo v kompozici obsahující farmaceutické excipienty. Bez ohledu na to, zda je podáván samotný nebo v kompozici, vysoce čistá sodná sůl pravastatinu podle vynálezu může mít formu roztoku nebo pevné látky, jako prášku, granulí, agregátů nebo jakoukoliv jinou pevnou formu.

Do rozsahu kompozic podle vynálezu spadají tabletovací kompozice. V závislosti na použitém způsobu tabletování, na požadované rychlosti uvolňování a jiných faktorech kompozice podle vynálezu mohou obsahovat menší či větší počet excipientů. Kompozice podle vynálezu mohou například obsahovat ředidla, jako látky odvozené od celulosy, jako práškovanou celulosu, mikrokrytalickou celulosu, mikrojemnou celulosu, methylcelulosu, ethylcelulosu, hydroxyethylcelulosu, hydroxypropylcelulosu, hydroxypropylmethylcelulosu, soli karboxymethylcelulosy a jiné substituované a nesubstituované deriváty celulosy; škrob; předželatinovaný škrob; anorganická ředidla, jako uhličitan vápenatý a hydrogenfosforečnan vápenatý a jiná ředidla známá ve farmaceutickém průmyslu. Jako ještě další vhodná ředidla lze uvést vosky, cukry a cukerné alkoholy, jako mannitol a sorbitol, akrylátové polymery a kopolymery a také pektin, dextrin a želatinu.

Dalšími tabletovacími excipienty jsou pojiva, jako klovatina, předželatinovaný škrob, alginát sodný, glukosa a jiná pojiva, kterých se používá při vlhké a suché granulaci a přípravě tablet přímým lisováním. Jako excipienty, které rovněž mohou být přítomny v pevných kompozicích nových forem sodné soli pravastatinu, lze dále uvést rozvolňovadla, jako sodnou sůl škrobového glykolátu, krospovidon, nízkosubsti-

tuovanou hydroxypropylcelulosu atd. Dalšími excipienty jsou tabletovací lubrikanty, jako stearan hořečnatý a vápenatý a stearyl fumarát sodný; aromatizační a ochucovací látky; sladidla; konzervační činidla; farmaceuticky vhodná barviva a kluzné látky, jako oxid křemičitý.

Tobolkové aplikační formy mohou obsahovat pevnou kompozici uvnitř tobolky, která je vytvořena z želatiny nebo jiné obalové látky. Tablety a prášky mohou být potahované. Tablety a prášky mohou být potaženy enterosolventními povlaky. Enterosolventní povlaky práškových forem mohou obsahovat acetát ftalát celulosy, ftalát hydroxypropylmethylcelulosy, ftalát polyvinylalkoholu, karboxymethylcelulosu, kopolymer styrenu a kyseliny maleinové, kopolymer methakrylové kyseliny a methylmethakrylátu a podobné látky a v případě potřeby je možno použít vhodných změkčovadel a/nebo ředidel. Potahovaná tableta může obsahovat povlak na svém povrchu nebo může být vylisována z prášku nebo granulí opatřených enterosolventními povlaky.

Vysoce čistou sodnou sůl pravastatinu je také možno podávat v injekčních aplikačních formách, jako rozpuštěnou látku nebo suspendovanou pevnou látku ve sterilním roztoku nebo suspenzi. Jako vhodné nosiče pro sterilní injekční aplikační formy lze uvést vodu a oleje.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Přečištění pravastatinu

Fermentační půda (100 litrů) se přidavkem kyseliny sírové okyselí na pH asi 2,5 až asi 5,0. Okyselená fermentační půda se extrahuje isobutylacetátem (3 x 50 litrů). Výtěžek extrakce isobutylacetátem je podle HPLC analýzy kalibrované k vnitřnímu standardu v půdě 95 %. Spojené isobutylacetátové fáze se extrahují vodou (35 litrů) při pH od asi 7,5 do asi 11,0 upraveným přidavkem koncentrovaného hydroxidu amonného. Získaný vodný roztok pravastatinu se znovu okyselí na pH asi 2,0 až asi 4,0 přidavkem 5M kyseliny sírové a zpětně extrahuje isobutylacetátem (8 litrů). Výsledný roztok pravastatinu v isobutylacetátu se částečně vysuší Perlitem a síranem sodným. Roztok pravastatinu se dekantuje, filtrací zbaví sušicího činidla a odbarví aktivním uhlím (1,7 g). Roztok se přefiltruje, aby se zbavil aktivního uhlí a umístí se do nádoby opatřené přívodem plynu.

Do horního prostoru nad roztokem se za rychlého míchání zavede plynný amoniak. Vysrážené krystaly amonné soli pravastatin karboxylátu se shromáždí filtrací a promyje isobutylacetátem a poté acetonem, čímž se získá amonná sůl pravastatinu o asi 94% čistotě, stanoveno HPLC spojenou s UV absorbancí měřenou při $\lambda = 238$ nm.

Amonná sůl pravastatinu se dále přečistí krystalizací z nasyceného roztoku chloridu amonného následujícím postupem: Sůl pravastatinu obsahující 162 g aktivní látky se rozpustí ve vodě (960 ml). Vzniklý roztok se při asi 35 až 40°C zředí

acetotem (96 ml) a isobutylacetátem (96 ml). Výsledný roztok se ochladí na asi 30 až 32°C a přidavkem pevného chloridu amonného se indukuje krystalizace amonné soli pravastatinu. Chlorid amonný se přidává až do doby, kdy další přidavek nevede k žádnému zjevnému dalšímu růstu krystalů. Po přidání chloridu amonného se roztok ochladí na 0 až 26°C. Krystaly amonné soli pravastatinu se shromáždí filtrací, promyjí isobutylacetátem a acetonem jako předtím a vysuší při asi 40°C. Získají se krystaly amonné soli pravastatinu (155,5 g) o asi 98% čistotě podle stanovení HPLC za výše uvedených podmínek.

Amonná sůl pravastatinu se přečistí dalším překrystalováním následujícím postupem. Amonná sůl pravastatinu (155,5 g aktivní látky) se rozpustí ve vodě (900 ml). Ke vzniklému roztoku se přidá isobutanol (2 ml). Hodnota pH výsledné směsi se přidavkem koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného zvýší na asi 10 až asi 13,7. Získaný roztok se 30 minut míchá při teplotě okolí a přidavkem kyseliny sírové zneutralizuje na pH asi 7. Krystalizace amonné soli pravastatinu se indukuje přidavkem pevného chloridu amonného. Krystaly (150 g) se shromáždí filtrací a promyjí acetonem. Pomocí HPLC za výše uvedených podmínek se zjistí, že byla získána amonná sůl pravastatinu o čistotě asi 99,3 %.

Amonná sůl pravastatinu se převede na sodnou sůl následujícím způsobem. Krystaly amonné soli pravastatinu se rozpustí ve vodě (1800 ml). K vodnému roztoku se přidá isobutylacetát (10,5 litru). Výsledný roztok se přidavkem kyseliny sírové okyselí na pH asi 2 až asi 4, čímž se pravastatin převede zpět na volnou kyselinu. Isobutylacetátová fáze obsahující pravastatin se promyje vodou (5 x 10 ml). Pravastatin se poté převede na sodnou sůl a zpětně extrahuje do jiné vodné fáze tak, že se isobutylacetátový roztok vířivým pohybem promíchá s vodou (900 až 2700 ml), přičemž se

přerušovaně přidává 8M hydroxid sodný, dokud se pH nezvýší na asi 7,4 až asi 13.

Roztok sodné soli pravastatinu se poté smísí s ionexovou pryskyřicí, aby se zachytil nadbytek sodných kationtů. Po oddělení se vodná fáze 30 minut při teplotě okolí míchá s ionexovou pryskyřicí IRC 50 v H^+ formě. V míchání se pokračuje, dokud se nedosáhne pH asi 7,4 až asi 7,8.

Roztok se poté přefiltruje, aby se odstranila pryskyřice a za sníženého tlaku částečně zkoncentruje na hmotnost 508 g. K částečně zkoncentrovanému roztoku se přidá acetonitril (480 ml) a výsledný roztok se míchá s aktivním uhlím (5 g), aby se odbarvil. Sodná sůl pravastatinu se získá ve formě krystalů (90% výtěžek) tak, že se ke směsi přidá další aceton a acetonitril za vzniku směsi vody, acetonu a acetonitrilu v poměru 1 : 3 : 12 (5,9 litru) za chlazení na asi -10 až asi 0°C. Sodná sůl pravastatinu se získá v celkovém výtěžku 65 % a čistotě asi 99,8 %, vztaženo na výchozí fermentovanou aktivní látku a měřeno pomocí HPLC za výše popsanych podmínek.

P ř í k l a d 2

Postupuje se způsobem popsaným v příkladu 1, ale vypustí se překrystalování ze směsi vody, acetonu a acetonitrilu. Lyofilizací koncentrovaného roztoku sodné soli pravastatinu ve vodě se získá sodná sůl pravastatinu o asi 99% čistotě v asi 72% výtěžku.

P ř í k l a d 3

Postupuje se podle příkladu 1, ale provede se další přečištění amonné soli pravastatinu tak, že se jednou zopakuje krystalizace amonné soli pravastatinu. Získá se sodná sůl pravastatinu o asi 99,8% čistotě a v asi 68,4% výtěžku.

P ř í k l a d 4

Postupuje se podle příkladu 1, ale provede se další přečištění amonné soli pravastatinu tak, že se dvakrát zopakuje krystalizace amonné soli pravastatinu. Získá se sodná sůl pravastatinu o asi 99,6% čistotě a v asi 53% výtěžku.

P ř í k l a d 5

Způsobem popsaným v příkladu 1 se fermentační půda (100 litrů) okyselí přídatkem kyseliny sírové na pH od asi 2,5 do asi 5,0. Okyselená fermentační půda se extrahuje isobutylacetátem (3 x 50 litrů). Spojené isobutylacetátové fáze se poté extrahují vodou (35 litrů) při pH asi 7,5 až asi 11,0 upraveným přídatkem koncentrovaného hydroxidu amonného.

Namísto opětovného okyselení vodného extraktu a jeho extrakce isobutylacetátem za vzniku dále obohaceného organického roztoku, které se provádějí při postupu podle příkladu 1, se vodný extrakt za sníženého tlaku zkoncentruje na koncentraci 140 g/litr. Vzniklý koncentrovaný roztok se poté přídatkem 1M kyseliny chlorovodíkové okyselí na pH asi 4,0 až asi 7,5.

Ke zkoncentrovanému roztoku se poté přidají krystaly chloridu amonného (405 g) a amonná sůl pravastatinu se nechá vykrystalovat při teplotě okolí. Krystaly se izolují filtrací, promyjí nasyceným roztokem chloridu amonného a při 40°C přidají k vodě (1 liter). Po rozpuštění se teplota sníží na 30°C a k roztoku se přidá chlorid amonný (330 g). Roztok se poté míchá 15 hodin při teplotě okolí. Krystaly amonné soli pravastatinu se izolují filtrací, promyjí isobutylacetátem a poté acetonem a vysuší. Získané krystaly se dále přečistí

překrystalováním, převedou na sodnou sůl, která se izoluje, což se provádí způsobem popsáním v příkladu 1. Získá se sodná sůl pravastatinu o čistotě asi 99,9 % ve výtěžku 67,7 %.

P ř í k l a d 6

Postupuje se podle příkladu 1, ale sodná sůl pravastatinu se překrystaluje ze směsi vody a acetonu v poměru 1 : 15. Získá se produkt v celkovém výtěžku, vztaženo na fermentovanou aktivní látku, 64 % o 99,8% čistotě podle HPLC.

P ř í k l a d 7

Postupuje se podle prvních dvou odstavců příkladu 5. Získá se zkoncentrovaný vodný extrakt (140 g/litr). Tento extrakt se rozdělí na stejné části.

P ř í k l a d 8

Postupuje se podle příkladu 1, amonná sůl pravastatinu se izoluje z fermentační pudy, ale aktivní látka se rozpustí a nechá vykristalovat po vysrážení plyným amoniakem.

Obohacený isobutylacetátový roztok pravastatinu (6500 litrů) se odbarví aktivním uhlím (6,5 kg) a poté přefiltruje, aby se odstranilo aktivní uhlí a převede do nádoby vybavené přívodem plynu.

Roztok obsahuje 183,2 kg aktivní látky.

Amonná sůl pravastatinu se vysráží plyným amoniakem způsobem popsáním v příkladu 1.

Vysrážená amonná sůl pravastatinu se rozpustí tak, že se do nádoby za přítomnosti isobutylacetátového matečného louhu přidá voda (1099 litrů).

Amonná sůl pravastatinu se nechá vykrystalovat tak, že se do nádoby přidá chlorid amonný (412 kg). Chlorid amonný se přidá v 31 částech během 5 hodin při 30 až 32°C. Výsledná suspenze se 1 hodinu míchá při 24 až 26°C. Krystaly se odfiltrují, suspendují v isobutylacetátu, odfiltrují a suspendují ve směsi isobutylacetátu a acetonu v poměru 2 : 1, odfiltrují, suspendují v acetonu a odfiltrují, promyjí acetonem a vysuší za sníženého tlaku.

Tímto způsobem se získá amonná sůl pravastatinu o asi 93% čistotě, stanoveno pomocí HPLC s UV detekci při $\lambda = 238$ nm. Vykrytalovaná aktivní látka má hmotnost 168,7 kg.

P ř í k l a d 9

Postupuje se podle příkladu 1, amonná sůl pravastatinu se izoluje z fermentační pudy, ale namísto vysrážení plynným amoniakem se použije krystalizace.

Obohacený isobutylacetátový roztok pravastatinu (4150 ml) se odbarví aktivním uhlím (4,15 g) a poté přefiltruje, aby se odstranilo aktivní uhlí a převede do nádoby.

K isobutylacetátovému roztoku se přidá voda (300 ml). Hodnota pH se koncentrovaným roztokem amoniaku (27 ml) upraví na 9,36.

Amonná sůl pravastatinu se nechá vykrystalovat tak, že se do nádoby přidá chlorid amonný (121,5 g). Chlorid amonný se přidá ve více částech během 5 hodin při 30 až 32°C. Výsledná

suspenze se 15 hodin míchá při 24 až 26°C. Krystaly se odfiltrují, několikrát suspendují, promyjí a vysuší.

Tímto způsobem se získá amonná sůl pravastatinu o asi 95% čistotě, stanoveno pomocí HPLC. Vykrytalovaná aktivní látka má hmotnost 42,7 g.

P ř í k l a d 1 0

Způsobem popsaným v příkladu 8 se získá amonná sůl pravastatinu o asi 93% čistotě.

Aktivní látka (10 g) se při 35 až 40°C rozpustí ve směsi vody (60 ml), acetonu (6 ml) a isobutylacetátu (6 ml). Výsledný roztok se ochladí na 30 až 32°C. K roztoku se po více částech během 5 hodin přidá chlorid amonný (22 g).

Výsledná suspenze se ochladí na 24 až 26°C a hodinu míchá. Amonná sůl pravastatinu se poté odfiltruje a promyje isobutylacetátem a poté acetonem.

Amonná sůl pravastatinu se suší při 40°C. Získá se produkt ve výtěžku 96 % a o čistotě 97 %.

P ř í k l a d 1 1

Způsobem popsaným v příkladu 8 se získá amonná sůl pravastatinu o asi 93% čistotě.

Aktivní látka (10 g) se při 35 až 40°C rozpustí ve směsi vody (60 ml), acetonu (6 ml) a isobutylacetátu (6 ml). Výsledný roztok se ochladí na 30 až 32°C. K roztoku se po více částech během 3 hodin přidá chlorid amonný (11,4 g).

Amonná sůl pravastatinu se odfiltruje a promyje isobutylacetátem a poté acetonem a suší při 40°C.

Získá se produkt ve výtěžku 77 % a o čistotě 97 %.

P ř í k l a d 1 2

Způsobem popsaným v příkladu 8 se získá amonná sůl pravastatinu o asi 93% čistotě.

Aktivní látka (10 g) se při 35 až 40°C rozpustí ve směsi vody (60 ml), acetonu (6 ml) a isobutylacetátu (6 ml). Výsledný roztok se ochladí na 30 až 32°C. Pro vysolovací krystalizaci se použije chloridu lithného (9,3 g).

Lithná sůl pravastatinu se promyje isobutylacetátem a vysuší.

Získá se lithná sůl pravastatinu ve výtěžku 96 % a o čistotě 89 %.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu.
2. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,5 % pravastatin laktonu.
3. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,2 % epiprava.
4. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,5 % pravastatin laktonu a méně než 0,2 % epiprava.
5. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,2 % pravastatin laktonu.
6. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,1 % epiprava.
7. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 1, která obsahuje méně než 0,2 % pravastatin laktonu a méně než 0,1 % epiprava.
8. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu připravená způsobem, který zahrnuje
 - a) stupeň, v němž se připraví organický roztok pravastatinu;
 - b) stupeň, v němž se získá pevný pravastatin ve formě soli pravastatinu;
 - c) stupeň, v němž se sůl pravastatinu přečistí překrystallováním;

d) stupeň, v němž se převede kation soli pravastatinu za vzniku sodné soli pravastatinu; a

e) stupeň, v němž se izoluje sodná sůl pravastatinu, která v podstatě neobsahuje pravastatin lakton a epiprava.

9. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde organickým roztokem je obohacený organický roztok pravastatinu.

10. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde kationem soli pravastatinu je amoniový ion nebo alkylamoniový ion aminu.

11. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 10, kde amin je zvolen ze souboru sestávajícího z amonia, primárního aminu, sekundárního aminu a terciárního aminu.

12. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde kationem soli pravastatinu je kation alkalického kovu.

13. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 12, kde kation alkalického kovu je zvolen ze souboru sestávajícího z kationů lithia, sodíku a draslíku.

14. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde pevný pravastatin je ve formě krystalu.

15. Sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde pevný pravastatin je ve formě amorfni sraženiny.

16. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde se organický roztok pravastatinu připraví tak, že se vodná fermentační půda extrahuje prvním organickým rozpouštědlem, pravastatin se zpětně extrahuje vodným roztokem při pH

od asi 8,0 do asi 9,5, bázeický vodný roztok se okyselí na pH asi 2,0 až asi 3,7 a okyselený vodný roztok se extrahuje druhým organickým rozpouštědlem za vzniku organického roztoku pravastatinu.

17. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 16, kde prvním a druhým organickým rozpouštědlem je isobutylacetát.

18. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde se amonná sůl přečistí alespoň jednou krystalizací ze směsi vody a antirozpouštědla.

19. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 18, kde antirozpouštědlo je zvoleno ze souboru sestávajícího z isobutylacetátu a acetonu.

20. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 18, kde se ke směsi vody a antirozpouštědla za účelem indukce krystalizace amonné soli přidá chlorid amonný.

21. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde se amonná sůl převede za použití kyselé nebo chelatační ionexové pryskyřice.

22. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde se sodná sůl pravastatinu izoluje překrystalováním.

23. V podstatě čistá sodná sůl pravastatinu podle nároku 8, kde se sodná sůl pravastatinu izoluje lyofilizací.

24. Formulace, **vyznačující se tím**, že obsahuje sodnou sůl pravastatinu a méně než asi 0,5 % pravastatinu laktonu.

25. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje v podstatě čistou sodnou sůl pravastatinu podle nároku 1.

26. Farmaceutická dávkovací forma, **vyznačující se tím**, že obsahuje farmaceutickou kompozici podle nároku 25.

27. Farmaceutická dávkovací forma, **vyznačující se tím**, že obsahuje v podstatě čistou sodnou sůl pravastatinu podle nároku 1.

01-577-03-Če