PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 2674

(22) Přihlášeno: 01.11.1994

(30) Právo přednosti:
05.11.1993 US 1993/148096

(40) Zveřejněno: 17.05.1995
(Věstník č. 5/1995)

(47) Uděleno: 10.04.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 18.06.2003
(Věstník č. 6/2003)

(11) Číslo dokumentu:

291 865

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:

C 12 P 17/18
C 07 D 498/18

(73) Majitel patentu:
WYETH, Madison, NJ, US;

(72) Původce vynálezu:
Gletsos Constantine, Plattsburgh, NY, US;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr, Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

Způsob separace neutrálního tricyklického makrolidu

(57) Anotace:

Způsob separace neutrálního tricyklického makrolidu, od kyselých, bazických a nepolárních neutrálních nečistot, přítomných v koncentrátu kvasných živných extraktů nebo matečných výluhů, obsahujících uvedený makrolid, zahrnuje v jakémkoli pořadí jeden či více z následujících kroků: a) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické báze k odstranění v podstatě všech kyselých nečistot; b) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické kyseliny k odstranění v podstatě všech bazických nečistot; c) roztok uvedeného koncentrátu se podrobí reakci s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem k odstranění nepolárních neutrálních nečistot.

CZ 291865 B6

Způsob separace neutrálního tricyklického makrolidu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu separace přirozeně se vyskytujícího neutrálního makrolidu, zejména tricyklického makrolidu jako je rapamycin, 32–desmethylrapamycin, 15–deoxorapamycin nebo FK–506, od jiných, přirozeně se vyskytujících složek, vzniklých kvasným procesem. Konkrétněji se tento vynález týká způsobu získání tricyklického makrolidu rapamycinu z koncentrátu kvasného živného extraktu a z koncentrátu matečného výluhu.

Dosavadní stav techniky

Tricyklické makrolidy, představované rapamycinem a FK–506, vykazují imunosupresivní aktivitu, stejně jako antibiotické a další farmakologické aktivity. Lze je použít k léčbě odvržení štěpu či transplantátu, k léčbě zánětlivých a autoimunitních onemocnění, jako je lupus, revmatoidní arthritida, diabetes mellitus (cukrovka) a roztroušená skleróza.

Tricyklické makrolidy rapamycin, 32–desmethylrapamycin, 15–deoxorapamycin a FK–506 vznikají kvašením různých kmenů *Streptomyces* za vhodných podmínek a jsou neutrální povahy, neboť nemají žádnou bazickou aminoskupinu, ani fenolickou skupinu nebo skupinu karboxylové kyseliny. Rapamycin je získáván kultivací *S. hygroscopicus* NRRL 5491 ve vodném médiu. Micely, obsahující tricyklický makrolid, jsou izolovány z růstového média a extrahovány organickým rozpouštědlem jako je methanol, čímž vzniká směs, složená z požadovaného tricyklického makrolidu, z příbuzných sloučenin, kyselých sloučenin jako jsou mastné kyseliny, bazických sloučenin jako jsou alkaloidy a peptidy a z neutrálních lipofilních sloučenin jako jsou tuky. Kvasný živný extrakt je obvykle zahuštěn k usnadnění přenosu a/nebo skladování do doby, než bude makrolid izolován. Izolace a čistění tricyklických makrolidů z kvasného živného extraktu představovaly v době před tímto vynálezem pracný a nákladný postup, vyžadující k získání vyčištěného materiálu použití různých chemických a chromatografických technik. [US 5 091 389; US 3 993 749; WO 93/11130; Sehgal, J. of Antibiotics 28 (10), 727, 1975]. Koncentrát kvasného živného extraktu rapamycinu obsahuje pouze 5 až 15 % rapamycinu a například nejvýše asi 50 % kyselých složek, přičemž je nutné rapamycin od ostatních složek oddělit. Způsob oddělení tricyklických makrolidů z kvasných živných extraktů obvykle zahrnuje adsorpci a desorpci z aktivovaného uhlíku, postupy, využívající selektivní rozpustnosti a jeden či více časově i finančně náročných chromatografických postupů chromatografie na sloupcích a/nebo vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Až dosud bylo vyloučeno používání kyselých nebo bazických podmínek, neboť tricyklické makrolidy jako rapamycin byly považovány za nestabilní v takových podmínkách. Rapamycin podléhá v roztoku, který je mísitelný s vodou, tj. v methanolu nebo tetrahydrofuranu, degradaci anorganickými bázemi jako je vodný hydroxid sodný, organickými bázemi, jako je 4–dimethylaminopyridin (DMAP) či 1,8–diazabicyklo[5,4,0]undek–7–en (DBU), nebo vodnými roztoky minerálních kyselin, jako kyselinou chlorovodíkovou a Lewisovými kyselinami, jako je chlorid zinečnatý [Steffan se spoluautory, Tetrahedron Letters (v tisku), D. Yohanes a S. J. Danishefsky, Tetrahedron Letters 33(49), 7469 až 7472, 1992; Luengo se spoluautory, Tetrahedron Letters 34(6), 991 až 994, 1993 a D. Yohannes se spoluautory, Tetrahedron Letters 34(13), 2075 až 2078, 1993].

Tento vynález poskytuje relativně rychlý a účinný způsob získání makrolidu, zejména tricyklického makrolidu, konkrétněji pak rapamycinu, z koncentrátů kvasných živných extraktů a matečných výluhů nebo koncentrátů, získaných z rekrystalizačních rozpouštědel, rozmělňováním a promýváním produktu a vyhýbá se časově a finančně náročnému chromatografickému dělení, popsanému v US 5 091 389, US 3 993 749, WO 93/11130 a Sehgalem v J. of Antibiotics 28(10), 727, 1975. Způsob zahrnuje separování kyselých a/nebo bazických složek od neutrálních složek rozpuštěním koncentrátu, obsahujícího makrolid, ve vhodném rozpouštědle, které je mísitelné

s vodou a extrahování kyselých a/nebo bazických složek do vodné báze nebo kyseliny, a dále používá postupy, založené na principu selektivní rozpustnosti nebo extrakční postupy k oddělení neutrálního polárního tricyklického makrolidu od nepolárních neutrálních látek, přítomných v koncentrátu. Zatímco zde popsaným způsob se týká koncentrátů kvasných živných extraktů nebo roztoků matečných výluhů, roztok celkového extraktu nebo roztoky matečného výluhu mohou být v postupu, předkládaného tímto vynálezem, využity za předpokladu, že rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, použité k extrakci kvasné živné půdy nebo k rekrystalizaci, rozmělňování či k promývání, jsou pro tento způsob použitelné a nejedná se o nevhodný objem rozpouštědla. Objem rozpouštědla může být redukován jeho částečným zahuštěním. Kterýkoli z roztoků, na něž lze aplikovat způsob podle tohoto vynálezu, může být označen jako koncentrát, obsahující makrolid.

Produkt, získaný uvedeným způsobem, může být čištěn až do vyhovující úrovně čistoty obvyklými metodami, používanými v oboru.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob separace neutrálního tricyklického makrolidu, od kyselých, bazických a nepolárních neutrálních nečistot, přítomných v koncentrátu kvasných živných extraktů nebo matečných výluhů, obsahujících uvedený makrolid, postup zahrnuje v jakémkoli pořadí jeden či více z následujících kroků:

a) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické báze k odstranění v podstatě všech kyselých nečistot;

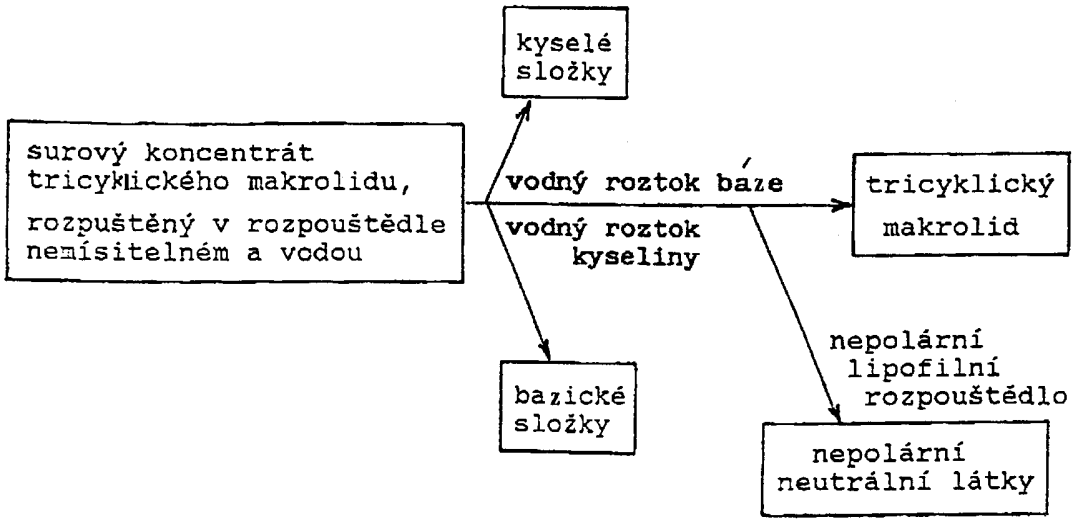
b) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické kyseliny k odstranění v podstatě všech bazických nečistot;

c) roztok uvedeného koncentrátu se podrobí reakci s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem k odstranění nepolárních neutrálních nečistot.

Způsob podle vynálezu je znázorněn dále na Schématu 1. V následujícím popisu způsobu podle vynálezu je nepolárním rozpouštědlem nearomatické uhlovodíkové rozpouštědlo jako cyklohexan, cyklohexan, hexan, heptan, pentan a podobně. Rozpouštědla, nemísitelná s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem jsou rovněž zahrnuta, ale nejsou omezena jen na acetonitril a dimethylformamid. Výraz extrakce se vztahuje k postupu důkladného promíchání jednoho roztoku s jiným, vzájemně nemísitelným roztokem, který umožňuje v případě nemísitelných roztoků oddělení jednoho od druhého a fyzické odstranění jedné vrstvy nebo fáze. Výraz promytí, vztahující se k pevné látce a k roztoku, který souvisí s extrakčním postupem, označuje vypláchnutí pevné látky rozpouštědlem, ve kterém je pevná látka v podstatě nerozpustná. Výraz matečný výluh se vztahuje k roztokům organických rozpouštědel, získaným z krystalizačních filtrátů, promývacích roztoků a zpětných extrakcí vodných extraktů a z promývání a rozmělňování shromážděných pevných látek.

Rozpouštědlo makrolidu je rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, schopná rozpouštět makrolid a doprovodné nečistoty, jako jsou kyselé nebo bazické složky. Rozpouštědlo nerozpouštějící makrolid je takové rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), ve kterém je makrolid v podstatě nerozpustný, ale jediné, ve kterém jsou rozpustné neutrální složky jako jsou tuky. Krystalizační rozpouštědlo makrolidu je rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), z něhož může být makrolid rekrystalizován anebo krystalizován z amorfního stavu při rozmělňování. Pokud postup vyžaduje zahuštění roztoku, dává se přednost dostatečně těkavému rozpouštědlu nebo směsi rozpouštědel, aby bylo možno rozpouštědlo oddestilovat za nedegradujících podmínek týkajících se teploty a tlaku.

Schéma 1:



Podle způsobu, popsaného vynálezem, je koncentrát obsahující makrolid, ať už získaný z koncentrátu kvasného živného extraktu, nebo z rekrystalizačních koncentrátů a/nebo z promývacích rozpouštědel, rozpuštěn v rozpouštědle (nebo směsi rozpouštědel) nemísitelném s vodou, zvoleném pro schopnost rozpouštět koncentrát a snadnou oddělitelnost, kterým může být, ne však výhradně, dichlormethan, t–butylmethylether, ethylacetát, toluen, 1–butanol, směs ethylacetátu a toluenu, směs heptanu a ethylacetátu nebo směs hexanu a methylenchloridu. K extrahování kyselých složek jsou zvláště vhodné vodné roztoky bází, včetně hydrogenuhličitanu sodného, hydroxidu amonného, hydroxidu sodného, který je nejvýhodnější v koncentraci 0,1 až 5 M, s výhodou 0,1 až 1,0 M a zvláště 0,1 až 0,5 M nebo je možno použít uhličitan sodný v poloviční molární koncentraci. Organické báze jako je triethylamin nejsou ve srovnání se silnějšími vodnými anorganickými bázemi při odstraňování kyselých složek tak účinné. K extrakci bazických složek jsou zvláště vhodné roztoky anorganických kyselin, například kyseliny chlorovodíkové, která je nejvýhodnější, v rozmezí koncentrací 0,1 až 5 M, s výhodou 0,1 až 1,0 M a zvláště 0,1 až 0,5 M nebo je možno použít například fosforečnan draselný nebo síran sodný s odpovídajícím způsobem nižší molární koncentrací. Organické kyseliny, jako je kyselina trifluoroctová, nejsou ve srovnání s minerálními kyselinami tak účinné v odstraňování bazických složek. Extrakce kyselých nebo bazických složek z roztoků, obsahujících makrolid, se obvykle provádějí při teplotě v rozmezí od –5 °C do 45 °C, s výhodou v rozmezí od –5 °C do 30 °C a nejlépe v rozmezí od –5 °C do 10 °C. Aby se zamezilo případné degradaci makrolidu kyselinou nebo bází, měl by být extrakční proces dokončen bez prodlení. V závislosti na množství přítomných kyselých nebo bazických složek nemusí být extrakce obou těchto složek nezbytná a extrakce samotné kyselé nebo samotné bazické složky může dostačovat k odstranění dostatečného množství nečistoty z roztoku, obsahujícího makrolid, takže je možné tricyklický makrolid izolovat.

Kyselé (nebo bazické) složky je výhodné odstranit z roztoku koncentrátu, obsahujícího makrolid, v jednom extrakčním kroku, šetřícím čas. Množství vodné báze (nebo kyseliny), potřebné k tomu, aby byl v extrakčním procesu dostupný přebytek báze (nebo kyseliny), lze stanovit extrakcí alikvotní části, odebrané z roztoku koncentrátu, obsahujícího makrolid s vodnou bází (nebo kyselinou), a stanovením objemu vodné báze (nebo kyseliny), který je potřebný k získání extraktu alikvotní části o takovém pH, že stechiometrický přebytek báze (nebo kyseliny) je dostupný za použití pHmetru nebo jiného prostředku k měření hodnoty pH. Objem vodné fáze (nebo kyseliny), potřebný k extrakci roztoku, z něhož byla odebrána alikvotní část, je tedy úměrný poměru objemů roztoku k extrahování a z něho odebrané alikvotní části. Extrakce kyselých (nebo bazických) složek tedy může být uskutečněna jednou operací spíše než prováděPage_footer_3

ním několikanásobných extrakcí vodnou bází (nebo kyselinou). Pokud mají být z roztoku koncentrátu, obsahujícího makrolid, odstraněny jak složky kyselé, tak i bazické, samozřejmě budou muset být provedeny oddělené extrakce vodnou bází a vodnou kyselinou. V případě roztoků koncentrátu, obsahujícího rapamycin, postačuje k odstranění v zásadě všech kyselých složek jedna extrakce vodným roztokem hydroxidu sodného, který zajišťuje vytvoření výsledného pH = 12.

Makrolid, získaný z roztoku za pomoci výše uvedených postupů, může být vyčištěn na požadovaný stupeň čistoty běžnými purifikačními metodami, používanými v oboru. Filtráty a promývací roztoky mohou být, pokud je to žádoucí, znovu zpracovány k izolaci dalšího makrolidu.

Po provedení extrakčních pochodů, sloužících k odstranění kyselých a/nebo bazických složek z roztoku s vodou nemísitelného rozpouštědla obsahujícího makrolid, je možné makrolid oddělit od nepolárních neutrálních složek jednou z následujících metod:

1) Rozpouštědlo nerozpouštějící makrolid (nebo směs rozpouštědel), mísitelné s uvedeným s vodou nemísitelným roztokem rozpouštědla s obsahem makrolidu, ze kterého byly extrahovány kyselé a/nebo bazické složky, se přidá k roztoku, obsahujícímu makrolid v dostatečném množství k tomu, aby makrolid a případně i makrolidu podobné produkty učinilo nerozpustnými ve výsledném roztoku a vytvořilo oddělenou fázi, buď oleje, nebo pevné látky, kterou pak lze oddělit běžnými separačními postupy, používanými v oboru.

2) S vodou nemísitelný roztok rozpouštědla s obsahem makrolidu, z něhož byly extrahovány kyselé a/nebo polární složky, se zahustí a zbylý materiál, obsahující makrolid, se rozpustí v rozpouštědle makrolidu jako je acetonitril nebo dimethylformamid a extrahuje nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem, jako je cyklohexan, hexan, heptan nebo cyklohexen. Vrstva rozpouštědla, rozpouštějícího makrolid, je oddělena a zahuštěna. Zbytek s obsahem makrolidu je pak rozmělněn s krystalizačním rozpouštědlem k získání makrolidu, pokud je tento pevnou látkou, anebo je čištěn postupy, známými odborníkům v oboru jako je chromatografie, pokud se jedná o olej. Eventuálně může být rozpouštědlo, rozpouštějící makrolid, po extrakci nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem uvedeno do styku s mísitelným rozpouštědlem, které nerozpouští makrolid, jako v předchozím postupu 1).

3) S vodou nemísitelný roztok rozpouštědla, které obsahuje makrolid a ze něhož byly extrahovány kyselé a/nebo krystalizačním rozpouštědlem makrolidu jako je diethylether, diizopropylether nebo t–butylmethylether.

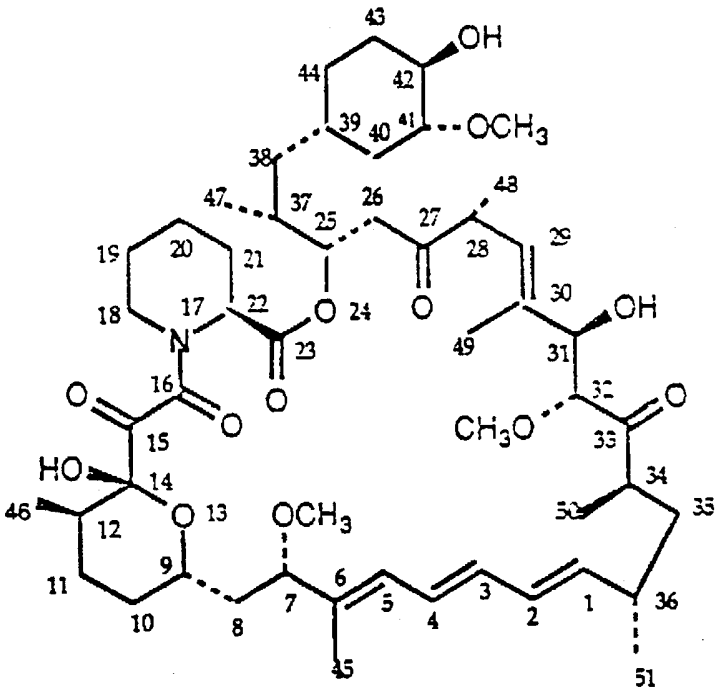
Makrolid obsahující koncentrát může být případně nejprve extrahován podle jedné z výše uvedených metod 1 až 3 k odstranění nepolárních složek a poté může být zbytek obsahující makrolid rozpuštěn v rozpouštědle nemísitelném s vodou (pokud v něm už není rozpuštěn) a extrahován vodnou bází a/nebo kyselinou k odstranění kyselých a/nebo bazických složek.

Výše uvedený postup zvýhodňuje neočekávané zjištění, že se makrolidy jako je rapamycin nerozkládají, jsou-li extrahovány vodnou kyselinou nebo bází z roztoků, tvořených rozpouštědly nemísitelnými s vodou a koncentráty, obsahujícími makrolid. Dříve se degradace předpokládala na základě pozorované degradace rapamycinu, nastávající po přídavku kyseliny nebo báze do roztoku.

Tento extrakční postup velmi zkracuje čas, nezbytný k získání makrolidu z uvedených koncentrátů a vyhýbá se časově i finančně náročným chromatografickým metodám.

Tricyklický makrolid rapamycin je krystalická pevná látka, rozpustná v methanolu, acetonu a dimethylformamidu, slabě rozpustná v diethyletheru, omezeně rozpustná v hexanu nebo

petroletheru a nerozpustná ve vodě. Rapamycin má níže uvedenou strukturu. Systém číslování atomů odpovídá způsobu, užívanému v Chemical Abstracts.



Následující příklady jsou pouze dokreslením způsobu podle vynálezu k izolaci rapamycinu z koncentrátů kvasné živné půdy a matečných výluhů a nemají žádným způsobem rozsah tohoto vynálezu omezovat. V následujících příkladech byla totožnost izolovaného produktu jako rapamycinu potvrzena srovnáním fyzikálních, spektrálních a chromatografických vlastností s týmiž vlastnostmi autentického rapamycinu. Čistota produktu (nikoli rekrystalovaného) byla stanovena analýzou pomocí HPLC (vysoce účinné kapalinové chromatografie).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Roztok koncentrovaného kvasného živného extraktu (157,0 g, obsah rapamycinu 10,4 %) v methylenchloridu (600 ml) byl promyt 3 x 150 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C, poté byl promýván vodou až do dosažení neutrálního pH vymývacího roztoku a následně byl promyt solným roztokem. Roztok v methylenchloridu byl zahuštěn a zbytek (70,5 g) byl rozmělněn s diethyletherem (140 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diethyletherem a vysušena za zisku rapamycinu (6,3 g, 91,7% čistota, 35,4% výtěžek). Zahuštění diethyletherových filtrátů poskytlo 63,5 g oleje, obsahujícího 13,1 % rapamycinu.

Příklad 2

Roztok koncentrovaného kvasného živného extraktu (206,0 g, o obsahu rapamycinu 11,8 %) v t–butylmethyletheru (800 ml) byl promyt 3 x 400 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C a poté byl promýván vodou až do dosažení neutrálního pH promývacího roztoku. Roztok t–butylmethyletheru byl zahuštěn a zbytek (75,0 g) byl rozmělněn s diethyletherem (150 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diethyletherem a vysušena za zisku rapamycinu

(11,4 g, 92,2% čistota, 43,3% výtěžek). Zahuštění diethyletherových filtrátů poskytlo 58,7 g oleje, obsahujícího 11,3 % rapamycinu.

Příklad 3

Roztok koncentrované kvasného živného extraktu (10,58 g, obsah rapamycinu 10,4 %) v acetonitrilu (23 ml) byl promyt 2 x 23 ml cyklohexanu a poté byl zahuštěn. Zbytek byl rozpuštěn v dichlormethanu a promyt postupně 3 x 23 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C, 2 x 23 ml 0,5 M HCl při teplotě 0 až 5 °C a poté byl promýván vodou až do dosažení neutrálního pH vymývacího roztoku. Roztok dichlormethanu byl zahuštěn a zbytek (4,07 g) byl rozmělněn s diethyletherem. Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diethyletherem a vysušena za zisku rapamycinu (0,64 g, 89,5% čistota, 58,2% výtěžek). Zahuštění diethyletherových filtrátů poskytlo 3,36 g oleje, obsahujícího 9,8 % rapamycinu.

Příklad 4

Roztok koncentrovaného kvasného živného extraktu (100,0 g, obsah rapamycinu 11,8 %) v ethylacetátu (400 ml) byl promyt 1 x 200 ml a 2 x 100 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C, poté byl promyt 2 x 200 ml roztoku 0,5 M kyseliny chlorovodíkové při teplotě 0 až 5 °C a nakonec byl promýván vodou až do dosažení neutrálního pH promývacího roztoku. Vodné promývací roztoky byly zpětně extrahovány ethylacetátem (100 ml) a poté byly ethylacetátové roztoky spojeny. Roztok v ethylacetátu byl zahuštěn a zbytek (43,2 g) byl rozmělněn s diizopropyletherem (45 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diizopropyletherem a vysušena za zisku rapamycinu (9,5 g, 85,3% čistota, 68,7% výtěžek). Zahuštění diizopropyletherových filtrátů poskytlo 31,6 g oleje, obsahujícího 6,6 % rapamycinu.

Příklad 5

Roztok koncentrovaného kvasného živného extraktu (25,2 g, obsah rapamycinu 10,4 %) ve směsi toluenu (120 ml) a ethylacetátu (25 ml) byl postupně promyt 3 x 50 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C, 2 x 50 ml 0,5 M roztoku kyseliny chlorovodíkové při teplotě 0 až 5 °C a nakonec byl promýván vodou až do dosažení neutrálního pH promývacího roztoku. Roztok v toluenu a ethylacetátu (128 ml) byl rozdělen na dvě stejné části pro zpracování následujícími metodami:

Metoda A. Roztok v toluenu a ethylacetátu (64 ml) byl zahuštěn a zbytek (5,7 g) byl rozmělněn s diethyletherem (11 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta dalším diethyletherem a vysušena za zisku 0,84 g rapamycinu (92,7% čistota, 64,1% výtěžek). Zahuštěním diethyletherových filtrátů se získalo 4,3 g oleje, obsahujícího 6,8 % rapamycinu.

Metoda B. Roztok v toluenu a ethylacetátu (64 ml) byl zahuštěn a zbytek (9,0 g) byl rozpuštěn v acetonitrilu (50 ml). Roztok acetonitrilu byl promyt 2 x 25 ml cyklohexanu, poté byl zahuštěn a zbytek (4,3 g) byl rozmělněn s diethyletherem (11 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diethyletherem a vysušena za zisku 0,81 g rapamycinu (94,6% čistota, 61,8% výtěžek). Zahuštěním diethyletherových filtrátů se získalo 3,0 g oleje, obsahujícího 5,9 % rapamycinu.

Příklad 6

Koncentrát matečného výluhu (996,0 g, obsah rapamycinu 21,6 %) byl rozmělněn s t–butylmethyletherem (4000 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta t–butylmethyletherem (500 ml) a vysušena za zisku 36,2 g rapamycinu (95,1% čistoty, 13,8% výtěžku). Filtráty byly

promyty 1 x 2000 ml a 2 x 1000 ml 0,5 M roztoku hydroxidu sodného při teplotě 0 až 5 °C. Spojené bazické extrakty byly promyty 1 x 500 ml t–butylmethyletheru. Poté byly t–butylmethyletherový filtrát s extraktem spojen a promýván vodou tak dlouho, dokud nebyl promývací roztok neutrální. Vodné extrakty byly spojeny a extrahovány t–butylmethyletherem (500 ml). Roztoky v t–butylmethyletheru byly spojeny, zahuštěny a zbytek (377,1 g) byl rozmělněn s diizopropyletherem (350 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diizopropyletherem a vysušena za zisku 126,7 g rapamycinu (82,4% čistota, 58,9% výtěžek). Celkový výtěžek rapamycinu z koncentrátu matečného výluhu byl tedy 162,9 g (72,7%). Zahuštěním diizopropyletherových filtrátů se získalo 157,9 g oleje, obsahujícího 20,9 % rapamycinu.

Příklad 7

Koncentrát matečného výluhu (562,1 g, obsah rapamycinu 21,6 %) v dichlormethanu (2000 ml) byl promyt 3 x 500 ml 0,5 M roztoku NaOH, při teplotě 0 až 5 °C a spojené vodné bazické extrakty byly extrahovány 1 x 200 ml dichlormethanu. Organické roztoky byly spojeny a promyty 2 x 500 ml 0,5 M roztoku HCl při teplotě 0 až 5 °C. Spojené vodné kyselé extrakty byly extrahovány 1 x 200 ml dichlormethanu. Spojené organické extrakty byly promývány vodou tak dlouho, dokud nebyla promývací voda neutrální. Organický roztok byl zahuštěn a zbytek (255,0 g) byl rozmělněn s diizopropyletherem (250 ml). Krystalická pevná látka byla odebrána, promyta diethyletherem a vysušena za zisku 108,6 g rapamycinu (86,6% čistota, 77,4% výtěžek). Zahuštěním diizopropyletherových filtrátů se získalo 100,2 g oleje, obsahujícího 23,1 % rapamycinu.

Příklad 8

Vodný 0,5 M hydroxid sodný (400 ml) byl při teplotě 0 až 5 °C přidán k energicky míchanému a chlazenému (0 až 5 °C) roztoku koncentrovaného kvasného živného extraktu (198,5 g, obsah rapamycinu 8,3 %) v t–butylmethyletheru (800 ml) tak rychle, aby mohla být teplota stále udržována v rozmezí 0 až 5 °C. Po silném míchání po dobu 5 minut byla odstraněna spodní vodná bazická vrstva a uschována při teplotě 0 až 5 °C. Organická vrstva byla znovu extrahována 2 x 200 ml 0,5 M roztoku NaOH při teplotě 0 až 5 °C. Vodné bazické extrakty byly spojeny a znovu extrahovány t–butylmethyletherem (200 ml). Roztoky v t–butylmethyletheru byly spojeny a promývány vodou tak dlouho, dokud promývací voda nebyla neutrální (pH = 7). Vodné promývací roztoky byly spojeny a extrahovány t–butylmethyletherem (100 ml). Roztoky t–butylmethyletheru byly spojeny, promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a vakuově zahuštěny při 40 °C. Zbytek byl při teplotě 20 až 25 °C nejméně 1 hodinu rozmělňován s diizopropyletherem (85 ml) a směs byla přes noc ochlazována na 0 až 5 °C. Krystalická pevná látka byla získána za pomoci Büchnerovy nálevky s fritou a při teplotě 20 až 25 °C byla promyta směsí diizopropylether/t–butylmethylether v poměru 4:1 (5 x 20 ml nebo až do odbarvení filtrátu). Krystalická pevná látka byla vysušena na konstantní hmotnost se ziskem 12,0 g rapamycinu (91,2% čistota, 66,4% výtěžek). Zahuštěním t–butylmethyletherových filtrátů a promývacích roztoků se získalo 63,9 g klovatiny, obsahující 3,63 % rapamycinu.

Příklad 9

Koncentrát matečného louhu (200 g, obsah rapamycinu 25 %) byl za míchání a při laboratorní teplotě rozpuštěn v t–butylmethyletheru (800 ml). Roztok byl za míchání ochlazen na 0 až 5 °C a bez prodlení extrahován 270 ml 0,65 M roztoku hydroxidu sodného, předem ochlazeného na 0 až 5 °C za udržování teploty směsi rovněž na teplotě 0 až 5 °C. (Množství vodného hydroxidu sodného, nezbytné k tomu, aby konečné pH extraktu mělo hodnotu 12, bylo stanoveno v alikvotní části koncentrovaného matečného výluhu).

Vrstva vodné fáze byla uchovávána při teplotě 0 až 5 °C, zatímco organická fáze byla za udržování teploty v rozmezí mezi 0 a 5 °C promyta 5% roztokem chloridu sodného. Bazický vodný extrakt byl zpětně extrahován t–butylmethyletherem (100 ml). Organické fáze byly spojeny a promyty 3 x 200 ml 5% roztoku chloridu sodného (pH konečného promývacího roztoku bylo 7,4). Organický roztok byl zahuštěn za sníženého tlaku (60 až 130 mm Hg) a teploty 25 až 40 °C. Ke zbytku byl v průběhu 30 minut, za míchání a při laboratorní teplotě pomalu přidán cyklohexen (80 ml) a míchání pokračovalo až do úplného dokončení krystalizace (3 hodiny). Směs byla při laboratorní teplotě míchána ještě další hodinu, pak byla ochlazena na 0 až 5 °C a míchána přes noc. Šedobílá krystalická pevná látka pak byla zfiltrována pomocí Büchnerovy nálevky s fritou. Pevná látka byla promyta 5 x 40 ml směsi t–butylmethyletheru a cyklohexenu (v poměru 2:3) a poté byla ve vakuové pícce při teplotě 35 až 40 °C vysušena do konstantní hmotnosti, čímž se získalo 22,7 g rapamycinu (90,6% čistota, 41,4% výtěžek). Zahuštěním filtrátů a promývacích roztoků (t–butylmethyletheru a cyklohexenu) se získalo 60,1 g oleje, obsahujícího 37,5 % rapamycinu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob separace neutrálního tricyklického makrolidu, od kyselých, bazických a nepolárních neutrálních nečistot, přítomných v koncentrátu kvasných živných extraktů nebo matečných výluhů, obsahujících uvedený makrolid, **vyznačující se tím**, že zahrnuje v jakémkoli pořadí jeden či více z následujících kroků:

a) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické báze k odstranění v podstatě všech kyselých nečistot;

b) roztok uvedeného koncentrátu v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou, se extrahuje vodným roztokem anorganické kyseliny k odstranění v podstatě všech bazických nečistot;

c) roztok uvedeného koncentrátu se podrobí reakci s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem k odstranění nepolárních neutrálních nečistot.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se nepolární neutrální složky koncentrátu kvasného živného extraktu nebo matečného výluhu odstraní tak, že se tento koncentrát rozpustí v prvním rozpouštědle, nemísitelném s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem, načež se nepolární neutrální nečistoty extrahují nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem, v němž je čištěný neutrální tricyklický makrolid nerozpustný.

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se s vodou nemísitelný roztok s obsahem makrolidu po extrakci kyselých a/nebo bazických složek zahustí a nechá se krystalizovat z krystalizačního rozpouštědla nebo ze směsi rozpouštědel.

4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se s vodou nemísitelný roztok s obsahem makrolidu po extrakci kyselých a/nebo bazických složek zahustí a zahuštěný roztok se rozpustí v prvním rozpouštědle, nemísitelném s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem, načež se nepolární neutrální nečistoty extrahují druhým nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem, v němž je čištěný neutrální tricyklický makrolid nerozpustný.

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se koncentrát kvasného živného extraktu nebo koncentrát matečného výluhu nejprve rozpustí v prvním rozpouštědle, které je nemísitelné s nearomatickým uhlovodíkovým rozpouštědlem a pak se neutrální nepolární nečistoty extrahují druhým rozpouštědlem, kterým je nearomatický uhlovodík, nemísitelný s prvním

rozpouštědlem, načež se roztok v prvním rozpouštědle zahustí, rozpustí se v rozpouštědle, nemísitelném s vodou a extrahuje vodným roztokem anorganické báze a/nebo anorganické kyseliny k odstranění kyselých nebo bazických nečistot.

6. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že tricyklickým makrolidem je rapamycin nebo jeho v přírodě se vyskytující homolog nebo analog nebo FK–506 nebo jeho v přírodě se vyskytující homolog nebo analog.

7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že tricyklickým makrolidem je rapamycin, 32–desmethylrapamycin nebo 15–deoxorapamycin.

8. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že tricyklickým makrolidem je rapamycin.

9. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že tricyklickým makrolidem je FK–506.

Konec dokumentu