

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-2856**
(22) Přihlášeno: **17.02.1999**
(30) Právo přednosti: **18.02.1998 SI 1998/9800046**
(40) Zveřejněno: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)
(47) Uděleno: **21.07.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **13.09.2006**
(Věstník č. 9/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/IB1999/000808**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/042601**

(11) Číslo dokumentu:

297 093

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12P 17/06 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 9720834 A; WO 9706128 A; US 4 319 039 A; US 4 965 200 A; US 4 294 846 A; EP 0 251 625 A.

(73) Majitel patentu:

LEK PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL
COMPANY D. D., Ljubljana, SI

(72) Původce:

Pflaum Zlatko, Ljubljana, SI
Milivojevič Dušan, Ljubljana, SI
Senica David, Ljubljana, SI

(74) Zástupce:

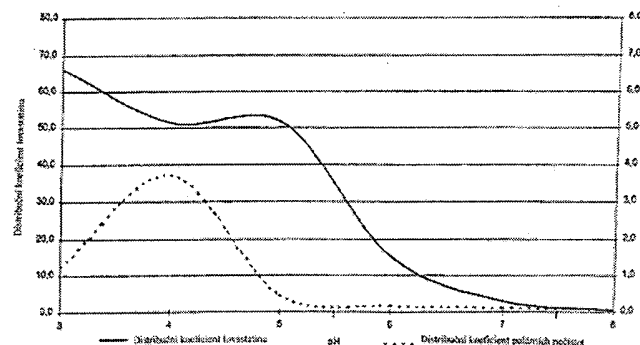
TRAPLOVÁ HAKR KUBÁT Advokátní a patentová
kancelář, Ing. Jan Kubát, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Způsob izolace a čištění inhibitorů HMG-CoA
reduktasy**

(57) Anotace:

Je popsán způsob izolace a čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy, který obsahuje: vyčištění myceliového kultivačního média a koncentrování vyčiřené média na menší objem; okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5 až 7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG-CoA reduktasy ethylacetátem; krystalizaci inhibitoru HMG-CoA reduktasy z organického rozpouštědla rozpustného ve vodě nebo mísitelného s vodou; a krystalizaci inhibitoru HMG-CoA reduktasy z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost nebo mísitelnost s vodou. Stupně krystalizace se mohou provádět také v opačném pořadí. Postup využívající kombinování specifických stupňů krystalizace může být také použit pro přečištění surových inhibitorů HMG-CoA reduktasy.



CZ 297093 B6

Způsob izolace a čištění inhibitorů HMG–CoA reduktasy

Oblast techniky

5

Vynález popisuje způsob izolace a čištění inhibitorů HMG–CoA reduktasy z myceliové biomasy.

Dosavadní stav techniky

10

Lovastatin, pravastatin, mevastatin, simvastatin, jejich deriváty a analogy jsou známé jako inhibitory HMG–CoA reduktasy a jsou používány jako antihypercholesterolemická činidla. Jsou vyráběny fermentací za použití mikroorganismů různých druhů, jako jsou druhy náležící do rodu *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* nebo *Penicillium*.

15

Čistota aktivní složky je významným faktorem při výrobě bezpečných a účinných farmaceutických činidel. Nejvyšší možná čistota výrobku je zejména významná v případech, kdy má být lék užíván dlouhodobě, jak je tomu v případě léčby nebo prevence vysokých plasmatických koncentrací cholesterolu. Akumulace nečistot z farmaceutických prostředků nízké čistoty může způsobit mnoho vedlejších účinků během léčby.

20

Způsoby izolace a přečištění antihypercholesterolemických činidel popsány ve dřívějších patentových přihláškách obsahují různé kombinace metod extrakce, chromatografie, laktonizace a krystalizace. Čistota konečného materiálu získaného těmito postupy je nižší než 99,6 %. Získání materiálů vyšší čistoty je za použití těchto metod možné, ale výtěžek požadovaného produktu je potom nepříjemně nízký pro použití těchto metod v průmyslové výrobě.

25

Postup izolace popsáný v patentové přihlášce WO 92/16276 umožňuje získání roztoku pro přípravu inhibitorů HMG–CoA reduktasy v čistotě vyšší než 99,5 %, ale tento postup vyžaduje použití značně složitě vybavení pro průmyslovou vysoce-výkonnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Podle WO 92/16276 je surový inhibitor HMG–CoA reduktasy o čistotě přibližně 85 % nebo vyšší, rozpuštěn v organickém rozpouštědlu nebo v roztoku organického rozpouštědla a vody. Směs se potom pufruje na pH 2 až 9 a vnese se do HPLC kolony. Po odběru vybraného píku představujícího inhibitor HMG–CoA reduktasy se část rozpouštědla odstraní a přidá se voda, nebo se – alternativně – odstraní 2/3 směsi rozpouštědel za krystalizace inhibitoru HMG–CoA reduktasy. Na konci procesu je čistota získaného materiálu skutečně alespoň 99,5 %, za výtěžku přibližně 90 %.

30

35

40

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká nového průmyslového způsobu izolace a čištění inhibitorů HMG–CoA reduktasy čistoty vyšší než 99,6 %, výhodně vyšší než 99,7 %, z fermentačního média. Pro dosažení tohoto cíle bylo provedeno intenzivní studium chemických sloučenin produkovaných během fermentace za použití mikroorganismů různých druhů, jako jsou druhy náležící do rodu *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* nebo *Penicillium*, jejich chemických vlastností a jejich chování v různých rozpouštědlech při různém pH. Tak byl výše uvedený předmět vyřešen způsobem podle předkládaného vynálezu, který obsahuje následující stupně:

45

50

- vyčištění myceliového kultivačního média a koncentrování vyčištěného média na menší objem;
- okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5–7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG–CoA reduktasy ethylacetatem;

55

- volitelně provedení laktonizace;
- provedení krystalizace inhibitoru HMG–CoA reduktasy z organického rozpouštědla rozpustného ve vodě nebo mísitelného s vodou; a
- provedení krystalizace inhibitoru HMG–CoA reduktasy z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost nebo mísitelnost s vodou.

10 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje závislost distribučního koeficientu inhibitoru HMG–CoA reduktasy (lovastatinu) a nečistot (v příslušném pořadí) na pH, ve stupni extrakce ethylacetátem; a

- 15 Obr. 2, 3 a 4 ukazují HPLC diagramy vzorků inhibitorů HMG–CoA reduktasy po extrakci ethylacetátem ve formě surových sloučenin, po krystalizaci z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného ve vodě, a po další krystalizaci z organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, v příslušném pořadí.

20

Podrobný popis vynálezu

Protože inhibitory HMG–CoA reduktasy jsou obvykle jak intra–, tak extracelulární produkty, je výhodné, ale nikoliv nezbytné, jejich rozpuštění z mycelia do fermentační kapaliny. Způsob použití pro rozpuštění popsany v patentové přihlášce WO 97/20834 obsahuje zpracování fermentační kapaliny, s alkalickou bází pro dosažení pH 11,5 a mísení po dobu 3 hodin. WO 97/06128 popisuje, že rozpouštění může být provedeno alkalizací fermentační kapaliny na pH 10 až 13. Také se použije teploty mezi 60 až 95 °C. Inhibitory HMG–CoA reduktasy mohou být velmi účinně rozpouštěny z mycelia při pH vyšším než 9, ale dlouhodobá expozice takovýmto rigorózním podmínkám způsobuje degradaci esterové vazby mezi hydroxylovou skupinou na naftalenovém skeletu a karboxylovou kyselinou. Rovnováha mezi inhibitory HMG–CoA reduktasy a deacylovanými inhibitory HMG–CoA reduktasy se za přísnějších podmínek posouvá směrem k deacylovaným produktům. Neočekávaně jsme zjistili, že účinnost rozpouštění provedeného při teplotě v rozmezí od 10 do 40 °C, výhodně v rozmezí od 18 do 25 °C, jako je například teplota okolí, po dobu méně než jedné hodiny, lépe méně než půl hodiny, například přibližně 10 minut, při pH mezi 9,5 a 13, nejlépe mezi 9,5 a 11,5, je stejná jako účinnost dosažená za použití méně ekonomických a časově náročnějších metod provedených při vyšších teplotách popsanych v předchozích patentových přihláškách. Rozpouštění může být také provedeno při pH nižším než 9,5 a zejména nižším než 6, ale v tomto případě je nutné použití ohromného množství organických rozpouštědel.

Pokud je prováděno toto výhodné rozpouštění inhibitoru HMG–CoA reduktasy, tak je fermentační kapalina potom zpracována acidifikačním činidlem, obvykle anorganickou kyselinou, pro úpravu hodnoty pH nebo 7,5 než 8,5. Vhodnými anorganickými kyselinami jsou kyselina fosforečná, sírová a chlorovodíková. Inhibitory HMG–CoA reduktasy jsou stabilní v tomto rozmezí pH a fermentační kapalina může být po tomto stupni také po určitou dobu skladována, pokud je to vhodné nebo žádoucí.

Mycelium je odstraněno z fermentační kapaliny za použití vhodných separačních kroků, jako je filtrace a/nebo centrifugace. Filtrace je výhodnější a může být použita filtrační technika vybraná vedle klasické filtrace, také mikro–, ultra– a diafiltrace se může vhodně použít. Vyčiřená kapalina se potom koncentruje na menší objem, nejlépe pět až deset–krát, za použití reversní osmosy nebo jiné techniky pro zmenšení objemu.

Stupně acidifikace extrakce ethylacetátem popsané dále jsou významnými stupni procesu přečištění.

Uvedený koncentrát je okyselen acidifikačním činidlem, výhodně anorganickou kyselinou, na pH v rozmezí od 4,5 do 7,5. Mohou být použity organické kyseliny, které již byly uvedeny výše. Potom je inhibitor HMG-CoA reduktasy extrahován z uvedeného koncentráту s upraveným pH za použití ethylacetátu. Extrakce je výhodně provedena za použití extrakční kolony s protiproudým tokem. Poměr mezi distribučními koeficienty inhibitorů HMG-CoA reduktasy a nečistot rozpustných v ethylacetátu je nejvyšší při pH v rozmezí od 5,5 do 7,5 a zejména při pH v rozmezí od 6,0 do 7,0 a část polárních nečistot je odstraněna již v tomto stupni. Extrakce provedená při pH nižším než 5,0, zejména nižším než 4,0, je účinnější, z důvodu vyššího distribučního koeficientu inhibitorů HMG-CoA reduktasy, ale vede k vyšší koncentraci polárních nečistot. Distribuční koeficienty nečistot rozpustných v ethylacetátu jsou také vyšší při této hodnotě pH, jak je uveden na obr. 1. Extrakce do ethylacetátu provedená při pH v rozmezí od 4,5 do 7,5, zejména při pH vyšším než 5,0, ještě lépe vyšším než 5,5, vede k dosažení nižší úrovně polárních nečistot, z důvodu jejich nižších distribučních koeficientů. Horší distribuce inhibitorů HMG-CoA reduktasy z koncentráту do ethylacetátu při této hodnotě pH může být vyvážena delší extrakční kolonou s protiproudým tokem.

Pokud je to žádoucí, tak je získaný ethylacetátový extrakt potom koncentrován a inhibitor HMG-CoA reduktasy je popřípadě v tomto stupni laktonizován. Při pH mezi 5,5 a 7,5 je většina inhibitorů HMG-CoA reduktasy ve formě volné kyseliny. Proto může být koncentrování a laktonizace vynecháno, pokud není inhibitor HMG-CoA reduktasy použit ve farmaceutickém prostředku ve formě laktonu. Laktonizace je výhodně provedena kontaktováním inhibitoru HMG-CoA reduktasy s katalytickým množstvím anorganické nebo organické kyseliny, nejlépe s kyselinou trifluoroctovou (TFA). Inhibitor HMG-CoA reduktasy, který je volitelně laktonizován, může být přímo krystalizován z ethylacetátu, jak bude popsáno dále. Alternativně může být ethylacetát odstraněn, výhodně odpařením, a tak se získá surový inhibitor HMG-CoA reduktasy, který je popřípadě laktonizován.

Takto získaný surový inhibitor HMG-CoA reduktasy může být potom popřípadě zpracován adsorpční chromatografií, výhodně chromatografií s reversní fází. Jako mobilní fáze pro adsorpční chromatografií může být použit acetonitril nebo nižší alkohol, jako je methanol, ethanol nebo propanol. Výhodně je surový inhibitor HMG-CoA reduktasy rozpuštěn v čistém acetonitrilu nebo ve směsi acetonitrilu/vody s alespoň 30 % (obj./obj.) acetonitrilu, a získaný roztok se vnese do kolony pro adsorpční chromatografií. Kolona obsahuje stacionární fáze založené na oktylsilanu, dimethylsilanu, oktadecylsilanu, kyan-silanu, polystyrendivinybenzenkopolymeru nebo akrylovém kopolymeru. Mohou být použity také další obvyklé materiály pro stacionární fázi, jako je například oxid křemičitý, alumina a podobně. Adsorbované sloučeniny jsou eluovány vhodnou mobilní fází, jako je například gradient acetonitril/voda. Vybraný pík inhibitoru HMG-CoA reduktasy je odebrán a rozpouštědlo mobilní fáze je odstraněno za krystalizace inhibitoru HMG-CoA reduktasy. Čistota krystalizovaných surových inhibitorů HMG-CoA reduktasy je mezi 80 % a 92 % a závisí na profilu nečistot ve fermentační kapalině. Volitelně může být adsorpční chromatografie nahrazeny normální chromatografií, rychlou chromatografií, průmyslovou HPLC nebo metodami extrakce nebo krystalizace.

Kombinovaná krystalizace, která je typická pro předkládaný vynález, bude podrobněji popsána dále. Přesněji, tato krystalizace obsahuje krystalizaci inhibitoru HMG-CoA reduktasy z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného ve vodě, a krystalizaci inhibitoru HMG-CoA reduktasy z organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě. Pořadí obou kroků krystalizace může být opačné. Vlastnosti organického rozpouštědla, které je buď mísitelné s vodou, nebo rozpustné ve vodě, nebo které má omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, jsou známy v oboru a jsou popsány například v „Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry“, svazek A24, 5. vydání (1993), str. 437-505, která je zde uvedena jako odkaz. V předkládaném vynálezu označuje termín „mísitelný

s vodou nebo rozpustný ve vodě“ organická rozpouštědla, která mají v podstatě neomezeno, výhodně 100% mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, a termín „mající omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě“ zahrnuje také organická rozpouštědla nemísitelná s vodou a nerozpustná ve vodě. Dále, technika krystalizace podle předkládaného vynálezu také zahrnuje srážení.

Příklady organických rozpouštědel v podstatě mísitelných s vodou nebo rozpustných ve vodě zahrnují nižší alkylalkoholy, jako je methanol, ethanol, propanol a isopropylalkohol; nižší alkylketony, jako je aceton a methylethylketon; nižší alkylglykolethery, jako je methylglykol, ethylglykol, propylglykol a ethyldiglykol; a dipolární aprotická rozpouštědla, jako je N,N-dimethylformamid (DMF), N,N-dimethylacetamid (DMA) a dimethylsulfoxid (DMSO), včetně směsí takových rozpouštědel. Jako zejména vhodné příklady organických rozpouštědel mísitelných s vodou jsou uvedeny aceton a nižší alkylalkoholy. Příklady organických rozpouštědel majících omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě zahrnují: vyšší alkylalkoholy jako je butanol, isobutanol amylalkohol, hexanol, 2-ethylhexanol, benzylalkohol a cyklohexanol, vyšší alkylketony jako je methylbutylketon, methylisobutylketon a cyklohexanon, estery jako je methylacetát, ethylacetát, n-propyl (a isopropyl) acetát, n-butyl (a iso-butyl nebo sekundární butyl) acetát a amylacetát, ethery jako je diethylether a diisopropylether, chlorované uhlovodíky, jak je methylenchlorid a chloroform, acetonitril a podobně, včetně směsí takových rozpouštědel. Zejména výhodným rozpouštědlem majícím omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě je ethylacetát.

Neočekávaně jsme zjistili, že krystalizace inhibitoru HMG-CoA reduktasy z organického rozpouštědla mísitelného s vodou jako je aceton nebo nižší alkylalkohol, po které následuje další rekrytalizace ze stejného rozpouštědla, může odstranit pouze malou část nepolárních a větší část polárních nečistot, a že krystalizace z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost ve vodě nebo mísitelnost s vodou, jako v ethylacetát, po které následuje další rekrytalizace ze stejného rozpouštědla, odstraní pouze většinu nepolárních nečistot. Poslední skutečnost je zřejmá z PLC diagramů surového inhibitoru HMG-CoA reduktasy (obr. 2), inhibitoru HMG-CoA reduktasy po krystalizaci z acetonu (obr. 3) a inhibitoru HMG-CoA reduktasy získaného krystalizací z acetonu a další rekrytalizací z ethylacetátu (obr. 4). Podle tohoto neočekávaného zjištění tedy poslední stupeň podle předkládaného vynálezu, obsahující kombinovanou krystalizaci z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného ve vodě a z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost ve vodě nebo mísitelnost s vodou, nemůže být vynechán ve způsobu získání inhibitoru HMG-CoA reduktasy o vysoké čistotě.

Kombinovaná krystalizace podle předkládaného vynálezu může být provedena následujícím způsobem. Nejprve se krystaly surového inhibitoru HMG-CoA reduktasy rozpustí ve výše uvedeném organickém rozpouštědle v podstatě (nejlépe 100%) mísitelném s vodou nebo rozpustném ve vodě, konkrétně v acetonu nebo nižším alkoholu, a potom se přidá voda pro zahájení krystalizace nebo srážení inhibitoru HMG-CoA reduktasy. Alternativně se surový inhibitor HMG-CoA reduktasy rozpuštěný v organickém rozpouštědle v podstatě mísitelném s vodou nebo rozpustném ve vodě přidá do vody pro zahájení krystalizace nebo srážení. Tyto postupy mohou být opakovány se stejným nebo s jiným organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou nebo rozpustným ve vodě, pokud je to nutné, například jednou až čtyřikrát, podle čistoty výchozího surového materiálu.

Krystaly takto získané se potom rozpustí ve výše uvedeném rozpouštědle majícím omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, jako je ethylacetát, ve vhodné koncentraci, která výhodně leží v rozmezí od 10 do 35 g/l, lépe v rozmezí od 15 do 25 g/l. Po odstranění jedné třetiny až tří čtvrtin rozpouštědla inhibitor HMG-CoA reduktasy krystalizuje. Krystalizace ze stejného nebo jiného organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost ve vodě nebo mísitelnost s vodou může být opakována, pokud je to nutné, například jednou až třikrát, podle čistoty materiálu získaného krystalizací z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného

ho ve vodě. Krystalizovaný inhibitor HMG-CoA reduktasy se potom filtruje a suší se za zisku produktu o čistotě alespoň 99,6 %.

- 5 Jak bylo uvedeno výše, pořadí krystalizace může být opačné, tj. nejprve může být provedena krystalizace z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost ve vodě nebo mísitel-
nost s vodou a potom může být provedena krystalizace z organického rozpouštědla mísitelného
s vodou nebo rozpustného ve vodě. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu se nejprve
provede krystalizace z ethylacetátu jako organického rozpouštědla majícího omezenou mísitel-
10 nost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, výhodně hned po stupni extrakce ethylacetátem, nebo
volitelně, po stupni laktonizace popsaném výše.

Při použití způsobu podle předkládaného vynálezu je možno získat materiály o čistotě alespoň 99,6 %, dokonce i o čistotě 99,7 %.

- 15 V dalším alternativním provedení mohou být různé typy krystalizace provedeny opakovaně střídavě.

- V jiném aspektu předkládaného vynálezu jsou popsány způsoby kombinované krystalizace
20 z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného ve vodě a z organického roz-
pouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, použity jako koneč-
ný přečišťovací stupeň jakéhokoli postupu pro izolaci a/nebo čištění inhibitorů HMG-CoA
reduktasy. Takový konečný přečišťovací krok může být také aplikován na surové materiály inhi-
bitoru HMG-CoA reduktasy, které byly získány běžnými způsoby. Takto je možno získat inhibi-
tory HMG-CoA reduktasy o čistotě alespoň 99,6 %, dokonce i o čistotě 99,7 %.

- 25 Způsob podle předkládaného vynálezu je zejména výhodný tehdy, je-li jako inhibitor HMG-CoA
reduktasy vybrán lovastatin. V dalším aspektu vynálezu je způsob popsaný výše použit pro izola-
ci a/nebo přečištění lovastatinu.

- 30 V podstatě čisté inhibitory HMG-CoA reduktasy získané způsobem podle předkládaného vynále-
zu, jako je lovastatin, mevastatin, prevastatin a simvastatin, stejně jako jejich deriváty a analogy,
mohou být výhodně použity pro přípravu farmaceutických činidel pro prevenci a/nebo léčbu
onemocnění. Získání inhibitory a farmaceutické prostředky jsou zejména vhodné jako léky nebo
35 činidla vhodná pro prevenci mrtvice, ischemických kardiálních obtíží, aterosklerosy a infarktu
myokardu.

Následující příklady ilustrují způsob podle předkládaného vynálezu, ale nijak neomezuji předklá-
daný vynález, jak je definován v připojených patentových nárocích.

40

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

45

- Fermentační kapalina (160 l) s koncentrací lovastatinu 1 g/l získaná fermentací s *Aspergillus*
terreus ATCC 20542 se umístí do nádoby (400 l) a pH se upraví na pH 10 pomocí 1 M vodného
roztoku hydroxidu sodného. Po 10 minutách intenzivního mísení při teplotě okolí se pH kapaliny
upraví na pH 9 pomocí 1 M roztoku kyseliny sírové a biomasa se odfiltruje. Filtrát se potom
50 okyslí 1 M roztokem kyseliny sírové na pH 6,5. K filtrátu se přidá 160 l ethylacetátu a získaná
směs se mísí po dobu 20 minut. Vodná a ethylacetátová fáze se separují extrakčním odstředěním.
Ethylacetátový extrakt se koncentruje na rotační odparce na objem 14 l. Koncentrace lovastatinu
ve formě volné kyseliny v ethylacetátovém koncentrátu dosahuje 10 g/l.

Ethylacetátový koncentrát (14 l) se potom umístí do reakční nádoby (40 l) a laktonizuje se. Laktonizace se iniciuje katalytickým množstvím TFA (0,5 ml TFA/1 l koncentráty). Laktonizační procedura trvá 2 hodiny při 40 °C. Koncentrát se po laktonizaci promyje dvakrát 14 l 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu amonného. Vodná fáze se odstraní a organická fáze se dále koncentruje do sucha na rotační odparce. Získá se olejový materiál (1,5 l) obsahující 133 g lovastatinu.

Získaný olejový materiál (161 ml) se rozpustí v 80 ml acetonitrilu a vnese se do chromatografické kolony (80 cm, 3,6 cm) naplněné XAD-16 (XAD-16 je komerční název společnosti Rohm and Hass, 20-50 mesh). Kolona se eluuje nejprve acetonitrilem: vodou 40:60 (pH 3, upravené kyselinou chlorovodíkovou), při rychlosti 75 ml/min. Eluce se monitoruje UV detektorem (236 nm) a po prvním poklesu adsorpce se zahájí eluce kolony acetonitrilem: vodou 55:45 (pH 3, upravené kyselinou chlorovodíkovou). Hlavní frakce se odebere a po poklesu absorpce se kolona promyje acetonitrilem: vodou 80:20 (pH 3, upravené kyselinou chlorovodíkovou). Acetonitril se odstraní z hlavní frakce pomocí rotační odparky (50 °C, 150 mbar) a vzniklé krystaly se odfiltrují. Hmotnost získaných krystalů je 24,5 g a obsah lovastatinu je 50 % (hmotn./hmotn.). HPLC čistota je 92,5 %.

Získané krystaly (24 g) se rozpustí ve 350 ml acetonu a za stálého mísení se přidá 700 ml vody. Směs se na 30 minut umístí do prostředí o teplotě 4 °C. Vzniklé krystaly se odfiltrují a suší se ve vakuu při teplotě okolí. Hmotnost získaných krystalů je 12,7 g a obsah lovastatinu je 90 % (hmotn./hmotn.). HPLC čistota je 98,8 %. Krystalizace z acetonu se opakuje za stejných podmínek a získá se 11,3 g krystalů s 97 % (hmotn./hmotn.) lovastatinu. HPLC čistota je 99,4 %.

Krystaly (11,3 g) získané po druhé krystalizaci z acetonu se rozpustí v 700 ml ethylacetátu a ethylacetát se odpaří ve vakuu za dosažení koncentrace lovastatinu 70 g/l. Koncentrát se na jednu hodinu umístí do prostředí s teplotou 8 °C. Vzniklé krystaly lovastatinu se odfiltrují a potom se suší ve vakuu. Hmotnost získaných krystalů je 9,4 g a obsah lovastatinu je 99,6 % (hmotn./hmotn.). HPLC čistota je 99,7 %.

Příklad 2

Krystaly lovastatinu (3 g), izolované po XAD-adsorpční chromatografii, jak je popsána v příkladu 1, se rozpustí ve 170 ml ethylacetátu. Ethylacetát se odpaří ve vakuu (200 mbar) při 50 °C na objem 35 ml). Koncentrát se umístí na dobu jedné hodiny do prostředí o teplotě 10 °C. Vzniklé krystaly lovastatinu se odfiltrují a potom se suší ve vakuu. Hmotnost získaných krystalů je 2,1 g a obsah lovastatinu je 96 % (hmotn./hmotn.). HPLC čistota je 99,0 %.

Získané krystaly (2,1 g) se rozpustí v 50 ml acetonu a přidá se 85 ml vody. Směs se umístí na dobu 30 minut do prostředí o teplotě 10 °C a krystaly se odfiltrují a ve vakuu při 40 °C. Hmotnost získaných krystalů je 1,9 g a obsah lovastatinu je 99 % (hmotn./hmotn.). HPLC čistota je 99,8 %.

Příklad 3

Fermentační kapalina (30 ml v 50 l fermentačním tanku) obsahující pravastatin (690 g na kg fermentační kapaliny, HPLC čistota pravastatinu 48,7 %) se přefiltruje a výsledné mycelium se promyje vodou. Filtrát (51 l) se okyslí na pH 5,0 pomocí 10% vodného roztoku kyseliny fosforečné. Aktivní substance (pravastatin) se potom extrahuje v extrakční koloně z filtrátu do 70 l ethylacetátu. Vodná fáze (50 l) obsahující méně než 2 g pravastatinu a hlavní část nečistot se vypustí. Ethylacetátová fáze se odpaří na 800 ml a použije se v dalším procesu izolace. HPLC čistota pravastatinu v methylacetátovém extraktu je 70,3 %.

Pro další izolaci se olejový materiál zpracuje adsorpční chromatografií a ve stupních kombinované krystalizace, jak byly popsány v příkladu 1.

5 Příklad 4

Surový simvastatin (2,3 g) ve formě laktonu se rozpustí v acetonu (7 ml) a přidá se 15 ml vody. Vznikne olejový materiál, který krystalizuje v dalších 10 minutách. Získané krystaly se odfiltrují, promyje se vodou a suší se při 40 °C po dobu 60 minut. Získané krystaly (2,2 g) s HPLC čistotou 99,51 % se potom rozpustí v ethylacetátu (8 ml). Získaný roztok se zahustí na 4 ml a simvastatin se nechá krystalizovat po dobu 60 minut při 8 °C. Vzniklý materiál se přefiltruje a promyje se vodou. Krystaly se potom suší při 40 °C po dobu 60 minut. Čistota získaného simvastatinu (1,7 g) je 99,73 %.

15

Příklad 5

Surový mevastatin (2,0 g) ve formě laktonu s HPLC čistotou 98,5 % se rozpustí v acetonu (7 ml) a přidá se 20 ml vody. Vznikne olejový materiál, který krystalizuje v dalších 10 minutách. Získané krystaly se odfiltrují, promyjí se vodou a suší se při 40 °C po dobu 60 minut. Získané krystaly (1,8 g) s HPLC čistotou 99,33 % se potom rozpustí v ethylacetátu (8 ml). Získaný roztok se zahustí na 4 ml a mevastatin se nechá krystalizovat po dobu 60 minut při 8 °C. Vzniklý materiál se přefiltruje a promyje se vodou. Krystaly se potom suší při 40 °C po dobu 60 minut. Čistota získaného mevastatinu (1,3 g) je 99,72 %.

25

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. Způsob čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy, **vyznačující se tím**, že inhibitor HMG-CoA reduktasy se zpracuje v krocích kombinované krystalizace, které zahrnují krystalizaci z organického rozpouštědla mísitelného s vodou nebo rozpustného ve vodě a krystalizaci z organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, jakožto konečné přečištění vedoucí k získání inhibitorů HMG-CoA reduktasy s čistotou vyšší než 99,6 %.

35

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že získané inhibitory HMG-CoA reduktasy mají čistotu vyšší než 99,7 %.

40

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že jako organické rozpouštědlo mísitelné s vodou nebo rozpustné ve vodě se použije aceton nebo nižší alkylalkohol.

45

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že krok krystalizace zahrnuje rozpouštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy v acetonu a potom přidání vody do této směsi.

50

5. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že krok krystalizace z organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě zahrnuje rozpouštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy v organickém rozpouštědle v koncentraci 10 až 35 g/l a odstranění jedné třetiny až tří čtvrtin organického rozpouštědla.

55

6. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že se jako organické rozpouštědlo mající omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě použije ethylacetát.

7. Způsob izolace a čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy, **v y z n a -**
č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky:

- 5 – vyčiření myceliového kultivačního média a koncentrování vyčiřeného média na menší objem;
- okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5 až 7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG-CoA reduktasy ethylacetátem;
- 10 – popřípadě provedení laktonizace; a
- čištění inhibitoru HMG-CoA reduktasy podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

15 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje, před krokem vyčiření mycelinového kultivačního média, kroky rozpouštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy při pH v rozmezí od 9,5 do 13 ve fermentační tekutině, a upravení pH kultivačního média na pH 7,5 až 8,5.

20 9. Způsob podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že krok rozpouštění se provádí při teplotě v rozmezí od 10 do 40 °C po dobu kratší než 1 hodina.

10. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vyčiření myceliového média se provádí odstraněním mycelií z média pomocí filtrace.

25 11. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vyčiření média se kontroluje pomocí reversní osmosy.

30 12. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že koncentrát se okyselí na pH v rozmezí od 5,5 do 7,5.

13. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že koncentrát se okyselí na pH v rozmezí od 6,0 do 7,0.

35 14. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že inhibitor HMG-CoA reduktasy, který se extrahuje z ethylacetátu a který se popřípadě laktonizuje, se přečišťuje adsorpční chromatografií.

40 15. Způsob podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako mobilní fáze pro adsorpční chromatografii je použita směs acetonitrilu a vody.

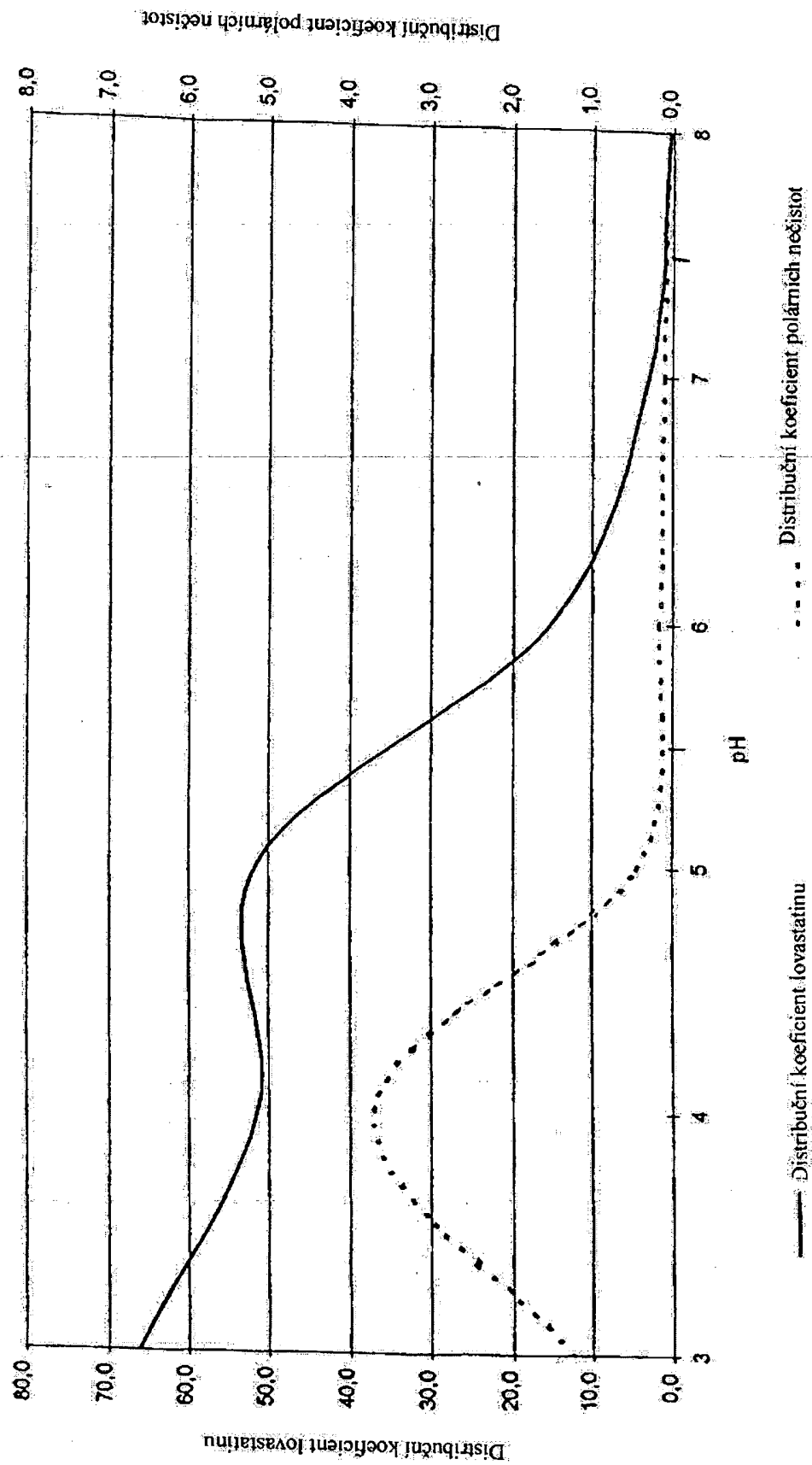
16. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pořadí kroků krystalizace je obrácené.

45 17. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 7 až 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že inhibitor HMG-CoA reduktasy je lovastatin.

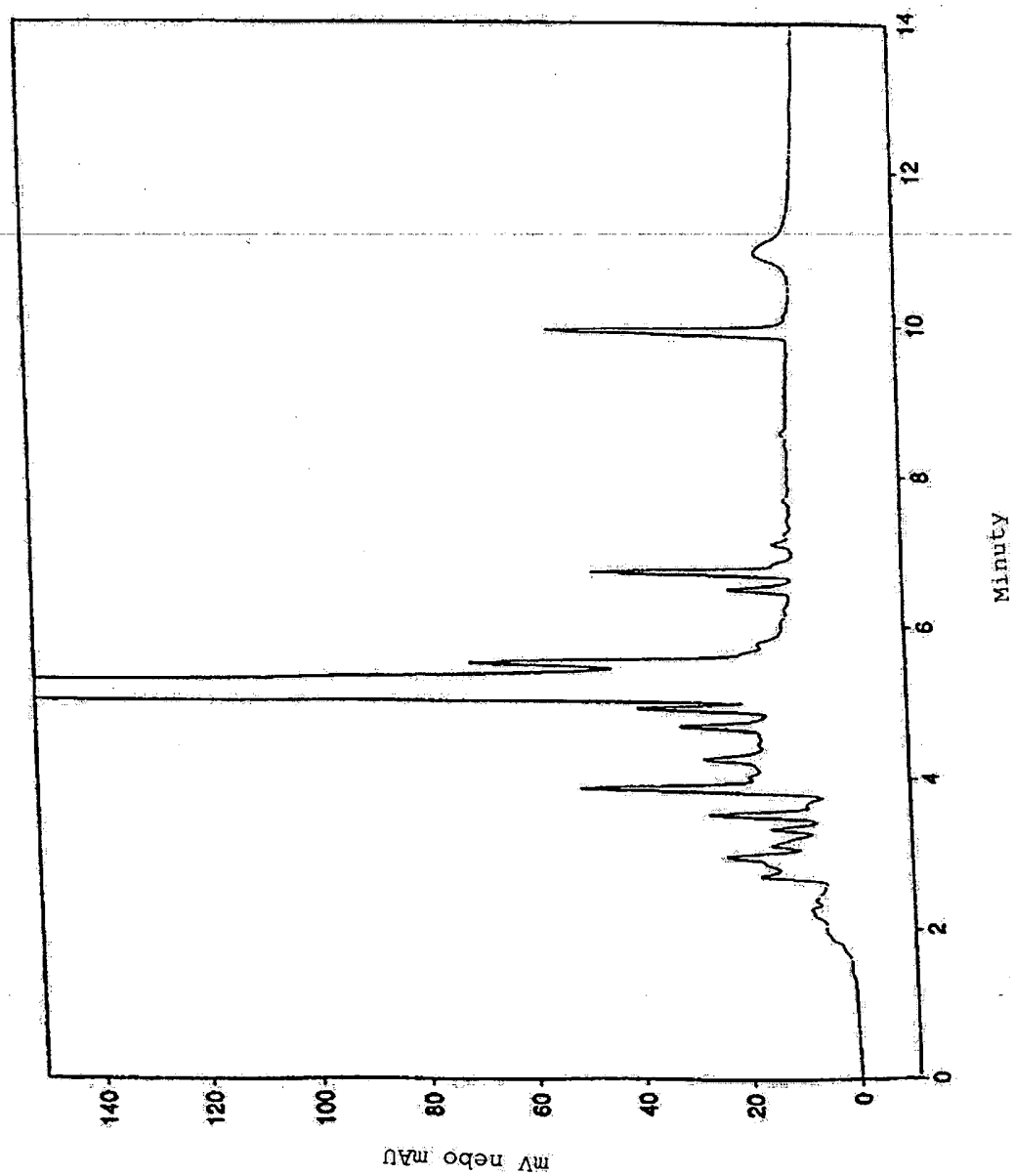
50

4 výkresy

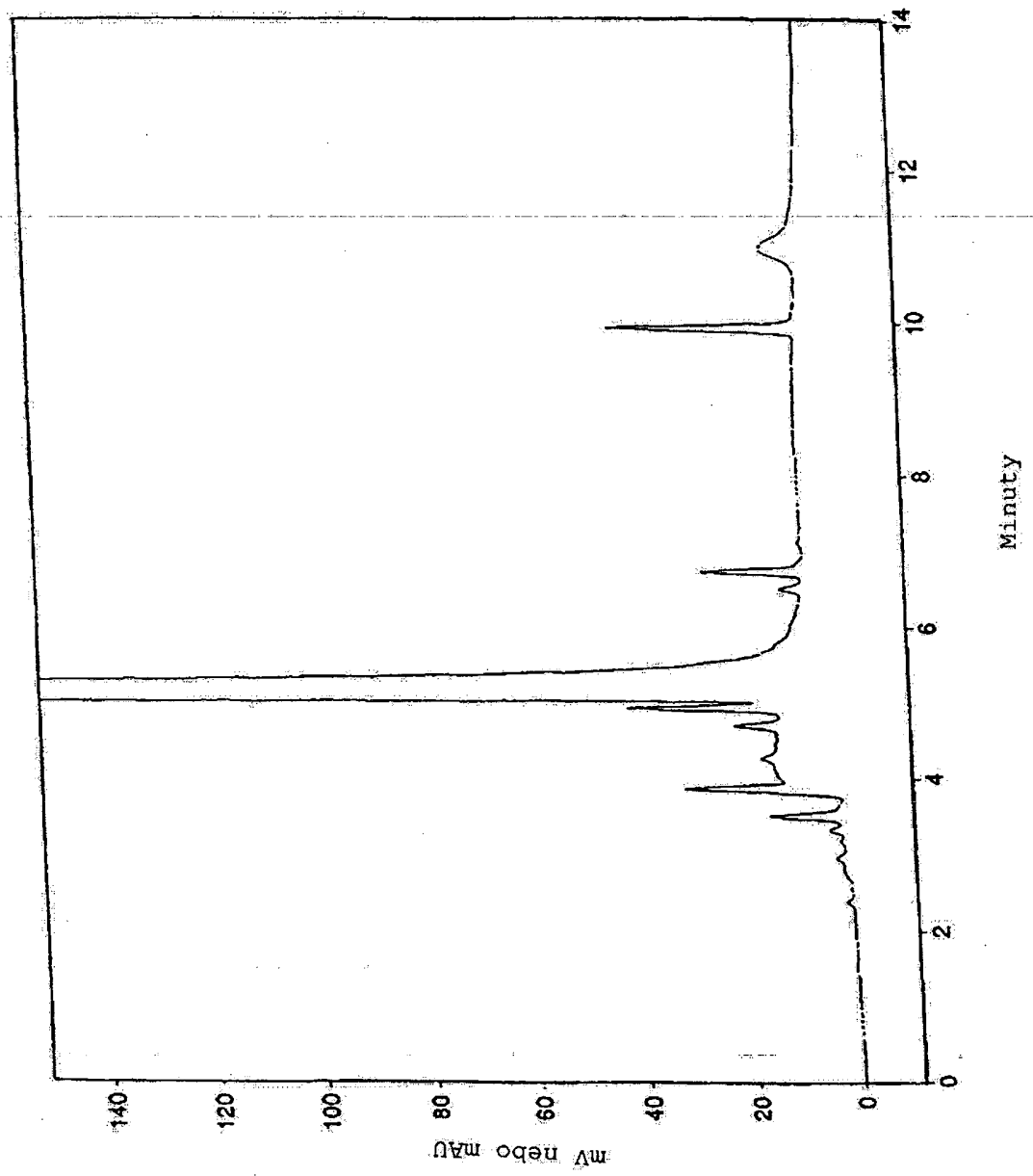
Obr. 1

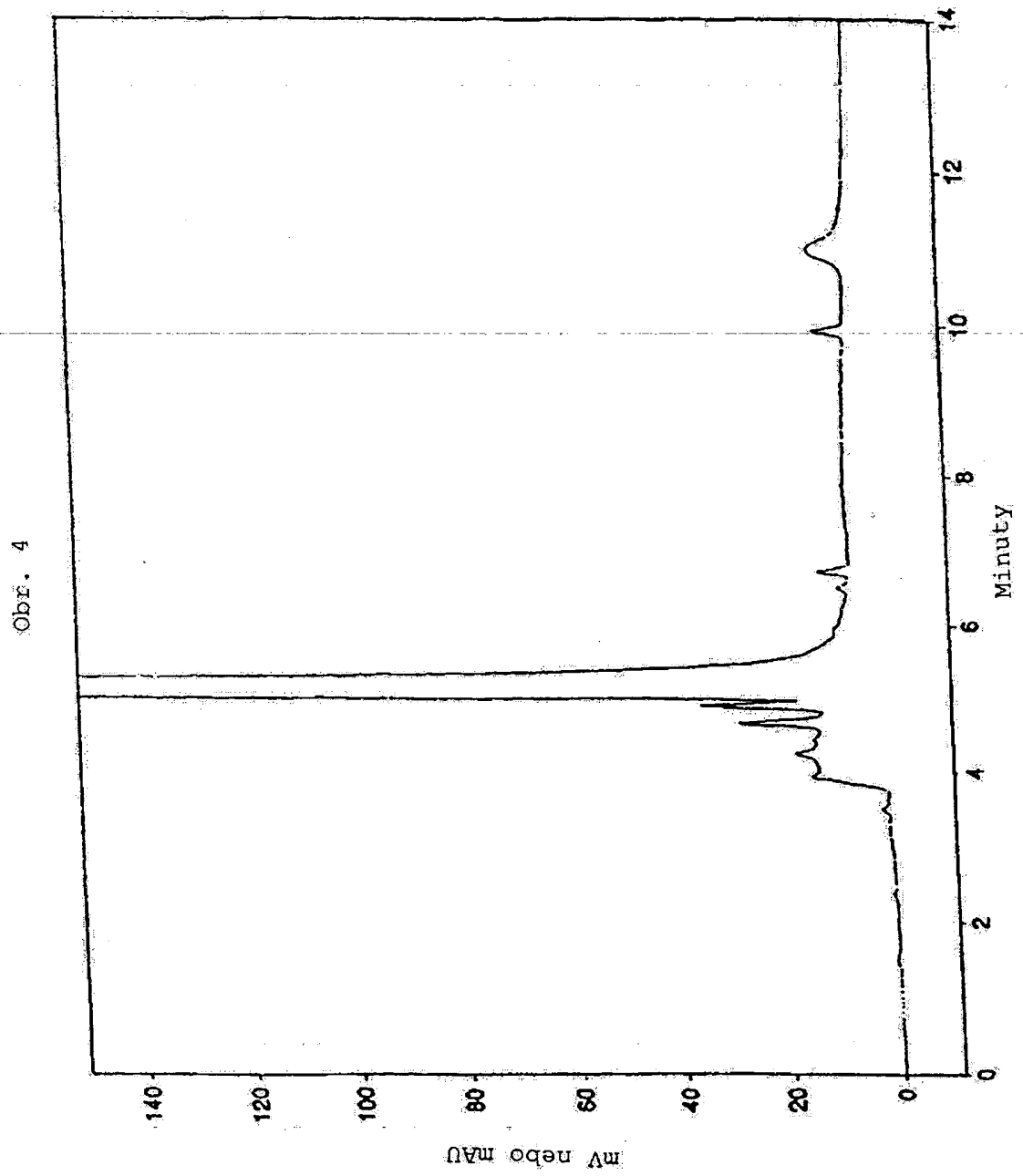


Obr. 2



Obr. 3





Konec dokumentu