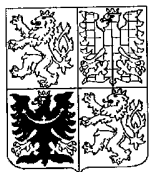


PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 17.02.1999

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 18.02.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/9800046

(33) Země priority: SI

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 15.11.2000
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: PCT/IB99/00808

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/42601

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2856

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7:

C 12 P 17/06

C 12 P 7/42

C 12 P 7/62

C 07 D 309/30

/(C 12 P 17/06, C 12 R 1:00)

(71) Přihlašovatel:

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:

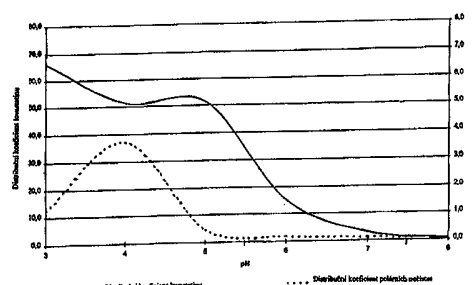
Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob získání inhibitorů HMG-CoA reduktasy
vysoké čistoty**

(57) Anotace:

Způsob izolace a čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy, který obsahuje: vyčištění myceliového kultivačního média a koncentrování vyčištěného média na menší objem; okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5 až 7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG-CoA reduktasy ethylenacetátem; 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 použit pro přечиštění surových inhibitorů HMG-CoA reduktasy.



Způsob získání inhibitorů HMG-CoA reduktasy vysoké čistoty

Oblast techniky

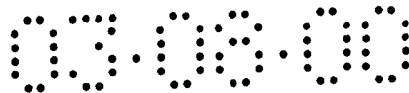
Vynález popisuje způsob izolace a čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy.

Dosavadní stav techniky

Lovastatin, pravastatin, mevastatin, simvastatin, jejich deriváty a analogy jsou známy 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*.

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.

Způsoby izolace a přečištění antihypercholesterolemických činidel popsané 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.



Postup izolace popsaný 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 složitého 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%.

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 media. 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:

- vyčiření myceliového kultivačního media a koncentrování vyčiřeného media na menší objem;

- okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5-7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG-CoA reductasy ethylacetátem;
- volitelně provedení laktonizace;
- provedení krystalizace inhibitoru HMG-CoA reductasy z organického rozpouštědla rozpustného ve vodě nebo mísitelného s vodou; a
- provedení krystalizace inhibitoru HMG-CoA reductasy z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost nebo mísitelnost s vodou.

Přehled obrázků na výkresech

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

Obr. 2, 3 a 4 ukazují HPLC diagramy vzorků inhibitoru HMG-CoA reductasy 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.

Podrobný popis vynálezu

Protože inhibitory HMG-CoA reductasy jsou obvykle jak intra-, tak extracelulární produkty, je výhodné, ale nikoliv nezbytné, jejich rozpuštění z mycelia do fermentační kapaliny. Způsob použitý pro rozpuštění popsáný 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 takovýmito 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 popsaných v předešlých 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 na 7,5 až 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 a 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 anorganické kyseliny, které již byly uvedeny výše. Potom je inhibitor HMG-CoA reduktasy extrahován z uvedeného koncentrátu 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 uvedeno 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 důvodů 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 inhibitoru 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 chromatografii 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 chromatografii. Kolona obsahuje stacionární fáze založené na oktylsilanu, dimethylsilanu, oktadecylsilanu, kyan-silanu, polystyrendivinybenzen-kopolymeru 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 nahrazena 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 neomezenou, 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 methylacetat, ethylacetat, n-propyl (a isopropyl) acetat, n-butyl (a iso-butyl nebo sekundární butyl) acetát a amylacetát, ethery jako je diethylether a diisopropylether, chlorované uhlovodíky, jako 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 rekrystalizace 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

je ethylacetát, po které následují další rekrystalizace ze stejného rozpouštědla, odstraní pouze většinu nepolárních nečistot. Poslední skutečnost je zřejmá z HPLC 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 rekrystalizací 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 ve vodě. Krystalizovaný inhibitor HMG-CoA reduktasy se potom filtruje a suší se za zisku produktu o čistotě alespoň 99,6%.

Jak bylo uvedeno výše, pořadí krystalizací může být opačné, tj. nejprve může být provedena krystalizace z organického rozpouštědla majícího omezenou rozpustnost ve vodě nebo mísitelnost 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 mísitelnost 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%.

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

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

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

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

Následující příklady ilustrují způsob podle předkládaného vynálezu, ale nijak neomezují předkládaný vynález, jak je definován v připojených patentových nárocích.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

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 okyselí 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 koncentrátu). Laktonizační procedura trvá 2 hodiny při 40 °C. Koncentrát se po laktonizaci promyje dvakrát 14 l 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu amoného. 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 absorpce se zahájí

eluze 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% (hmot./hmot.). 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% (hmot./hmot.). HPLC čistota je 98,8%. Krystalizace z acetonu se opakuje za stejných podmínek a získá se 11,3 g krystalů s 97 % (hmot./hmot.) 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% (hmot./hmot.). 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% (hmot./hmot.). 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% (hmot./hmot.). HPLC čistota je 99,8%.

Příklad 3

Fermentační kapalina (30 l 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 okyselí 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 ethylacetátovém extraktu je 70,3%.

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

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, promyjí 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%.

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%.

- vyčištění myceliového kultivačního media a koncentrování vyčištěného media na menší objem;
- okyselení koncentráту na pH v rozmezí 4,5 až 7,5, po kterém následuje extrakce inhibitoru HMG-CoA reduktasy ethylacetátem;
- popřípadě provedení laktonizace;
- 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.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje, před stupněm vyčištění myceliového kultivačního media, stupně rozpouštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy z myceliové biomasy při pH v rozmezí od 9,5 do 13 do fermentační kapaliny, a upravení pH kultivačního media na pH 7.5 až 8,5.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stupeň rozpouštění se provádí při teplotě v rozmezí od 10 do 40 °C po dobu méně než 1 hodiny.

4. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že vyčiření myceliového
media se provádí odstraněním mycelií z media pomocí filtrace.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stupeň krystalizace obsahuje rozpuštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy v acetonu a potom přidání vody do této směsi.

13. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stupeň krystalizace z organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě obsahuje rozpuštění inhibitoru HMG-CoA reduktasy v uvedeném rozpouštědle v koncentraci 10 až 35 g/l a odstranění jedné třetiny až tří čtvrtin uvedeného organického rozpouštědla.

14. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že organickým rozpouštědlem majícím omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě, použitým ve stupni krystalizace, je ethylacetát.

15. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se získají inhibitory HMG-CoA reduktasy mající čistotu vyšší než 99,6%.

16. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inhibitorem HMG-CoA reduktasy je lovastatin.

17. Způsob čištění inhibitorů HMG-CoA reduktasy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inhibitor HMG-CoA reduktasy se zpracuje ve stupních kombinované krystalizace, které obsahují 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, kde toto zpracování je

konečným přečištěním vedoucím k získání inhibitorů HMG-CoA reductasy majícím čistotu vyšší než 99,6%.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že získané inhibitory HMG-CoA reductasy mají čistotu vyšší než 99,7%.

19. Způsob podle nároku 1 nebo 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako organické rozpouštědlo mísitelné s vodou nebo rozpustné ve vodě se použije aceton nebo nižší alkylalkohol.

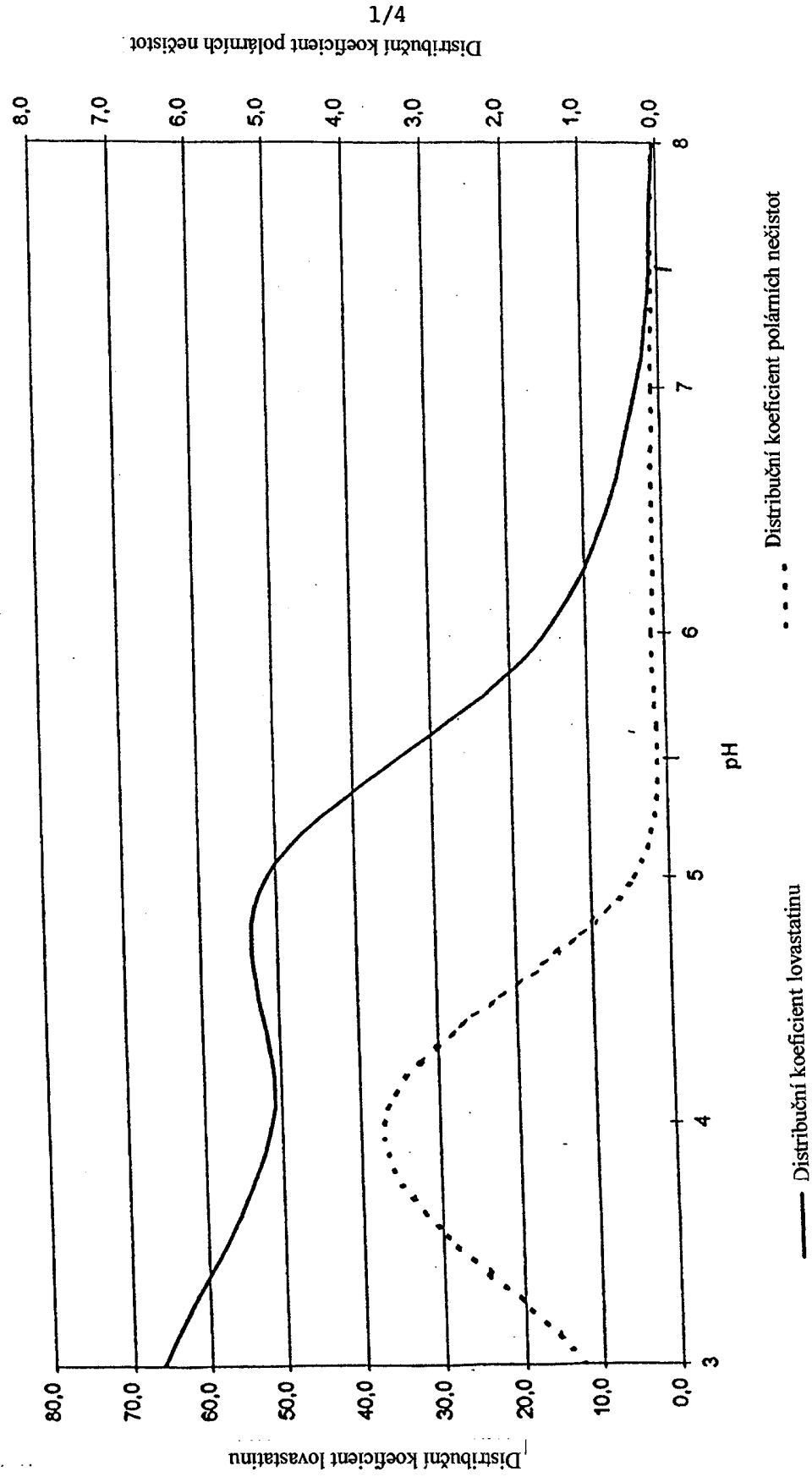
20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že stupeň krystalizace obsahuje rozpuštění inhibitoru HMG-CoA reductasy v acetonu a potom přidání vody do této směsi.

21. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 17 až 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená krystalizace z uvedeného organického rozpouštědla majícího omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě obsahuje rozpuštění inhibitoru HMG-CoA reductasy v uvedeném organickém rozpouštědle v koncentraci 10 až 35 g/l a odstranění jedné třetiny až tří čtvrtin uvedeného organického rozpouštědla.

22. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 17 až 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije ethylacetát jako organické rozpouštědlo mající omezenou mísitelnost s vodou nebo rozpustnost ve vodě.

23. Použití způsobu podle nároku 1 nebo způsobu podle nároku 17 pro izolaci a/nebo čištění lovastatinu.

Obr. 1



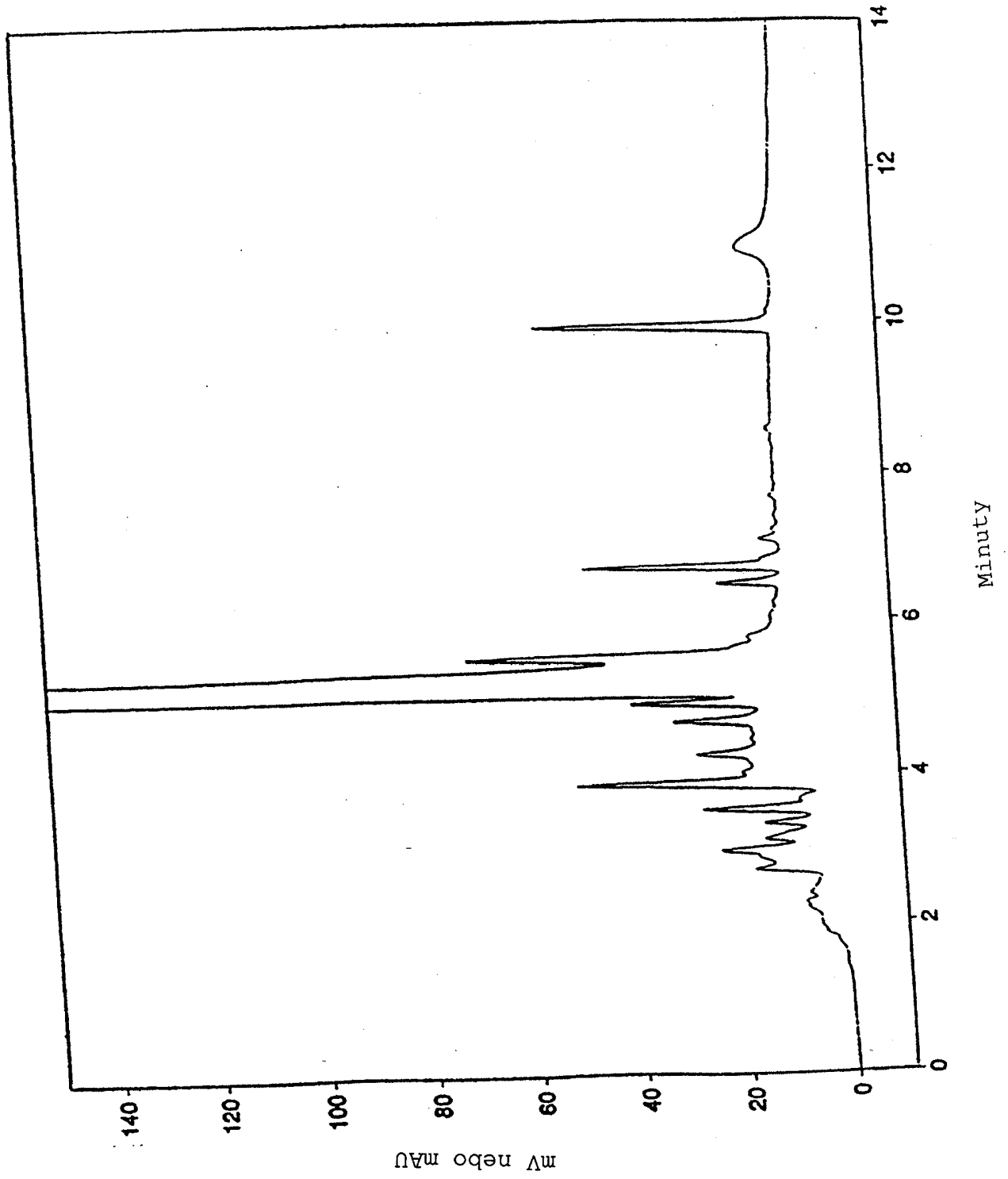
Distribuční koeficient polárních nečistot

1/4

TV 2000-2000
03.08.00

2/4

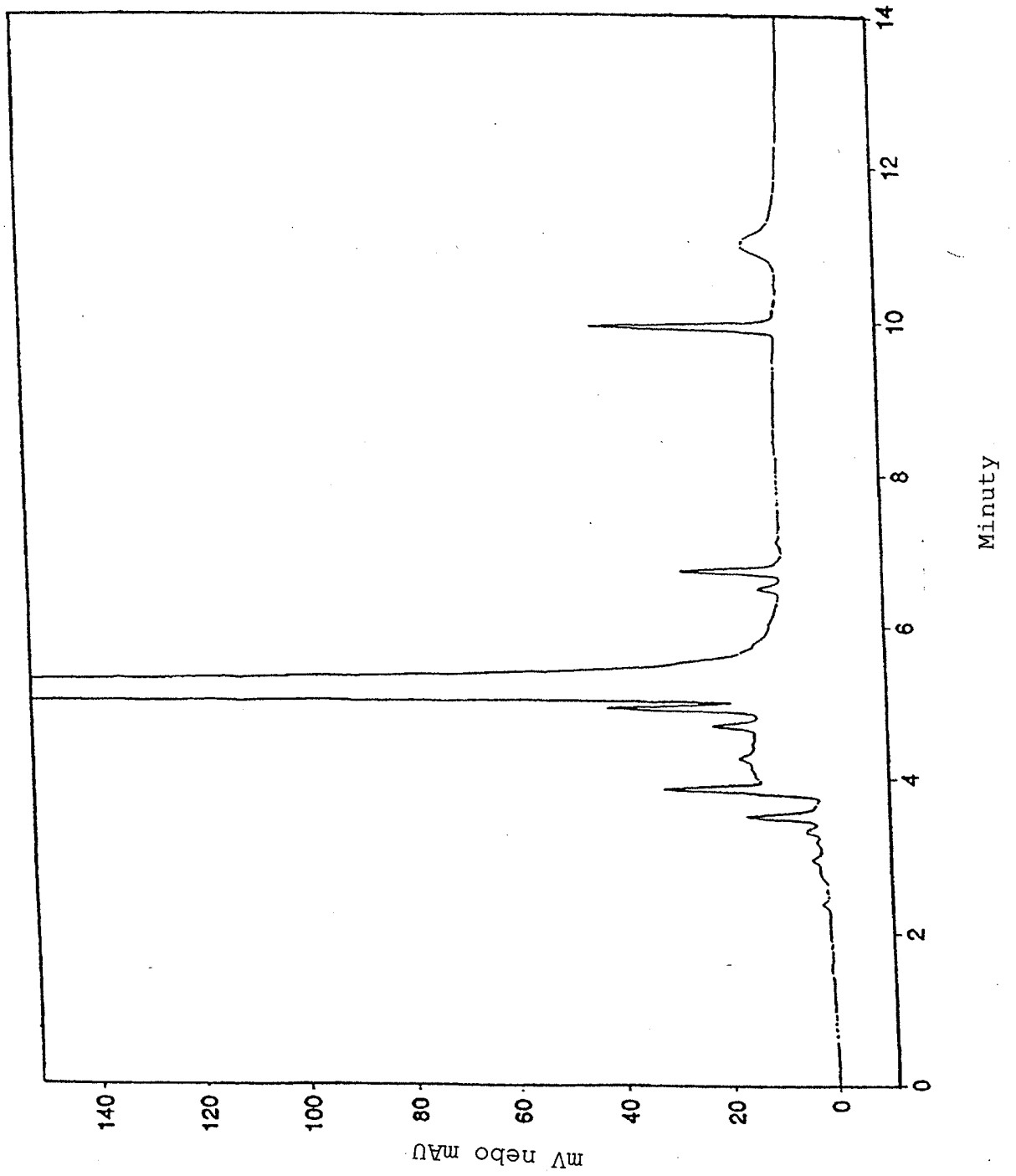
Obr. 2



PV 2000 - 2856
03.08.00

3/4

Obr. 3



03.08.00

4/4

Obr. 4

