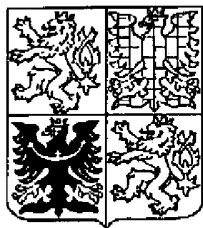


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 24.05.93
(32) 25.05.92
(31) 92HU/9201728
(33) HU
(40) 16.02.94

(21) 985-93

(13) A3

5(51)

C 07 K 7/64

C 07 K 1/14

(71) BIOGAL GYÓGYSZERGYÁR RT., Debrecen, HU;

(72) Szánya Tibor, Veszprém, HU;
Hanák László, Boldogkőújfalu, HU;
Strbka Gyöngyi, Veszprém, HU;
Nagy Edit, Debrecen, HU;
Melczer István, Debrecen, HU;
Deák György, Debrecen, HU;
Makó Berta, Debrecen, HU;
Karczub Anita, Hajdunánás, HU;
Márton Gyula, Veszprém, HU;
Dencs Judit, Veszprém, HU;
Keclemen János, Veszprém, HU;
Bálint János, Debrecen, HU;
Radnai Ferenc, Debrecen, HU;
Karácsony Ernő, Debrecen, HU;
Hajdufi Csaba, Debrecen, HU;
Kéri Vilmos, Debrecen, HU;

(54) Způsob čištění cyklosporinu A

(57) Čištění cyklosporinu A chromatografií ze směsí obsahujících zejména cyklosporiny A, B a C a ostatní cyklosporinové složky polárnější nebo apolárnější než cyklosporin A nebo jim podobné nečistoty spočívá v tom, že se uvedená směs nebo zbytek po jejím odpaření zahřeje pod chromatografií na teplotu 80 až 115 °C, taví se a tavenina se potom chromatografuje o sobě známým způsobem. Výhodně se chromatografie provádí za postupného použití eluční soustavy tvořené směsí chloroformu, dichlormethanu a ethanolu v objemovém poměru 48:50:2 a eluční soustavy tvořené směsí chloroformu, ethylacetátu a ethanolu v objemovém poměru 48:50:2.

Způsob čistění cyklosporinu A

Oblast techniky

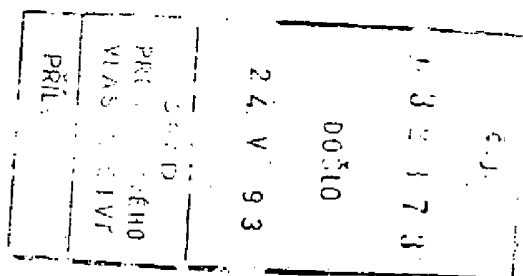
Vynález se týká způsobu čistění cyklosporinu A jeho izolací ze směsí obsahujících zejména cyklosporiny A, B a C a ostatní cyklosporinové složky, které jsou polárnější nebo apolárnější než cyklosporin A, jakož i nečistoty podobné těmto složkám. Uvedený způsob zahrnuje chromatografii provedenou po předcházejícím tepelném zpracování.

Dosavadní stav techniky

Cyklosporinová antibiotika se připravují fermentací. Byli to výzkumní pracovníci firmy Sandoz Ltd., kteří jako první popsali izolaci cyklosporinů A a B, získaných kultivací fungálního kmene *Cylindrocarpon lucidum* Booth 5760 (švýcarský patentový spis 589,716). Od té doby až dosud bylo izolováno 25 cyklosporinů, které se označují písmeny od A do Z /Helv.Chim.Acta 70, 13 (1987)/.

Jednotlivé cyklosporinové složky, které si jsou velmi podobné, pokud jde o jejich chemické a fyzikální vlastnosti, se z fermentačního prostředí izolují extrakcí, načež se potom z takto získané surové cyklosporinové směsi jednotlivé složky dělí několikastupňovou preparativní chromatografií. I když cyklosporin A, mající selektivní imunosupresivní účinnost, je vzhledem k této účinnosti nejcenější složkou cyklosporinového komplexu, izolují se a čistí i ostatní cyklosporinové složky.

Při způsobu popsaném v patentovém spisu US 4,117,118 se cyklosporinová směs zavede na sloupec Sephadexu LH20 a eluuje methanolem, načež se zavede na sloupec aluminy a eluuje eluční soustavou tvořenou směsí toluenu a ethylacetátu (15%) a nakonec se zavede na sloupek silikagelu a eluuje směsí chloroformu a methanolu (2%). Vzdor této opakované chromatografii není získaný produkt čistý a je tvořen směsí cyklosporinů A a B.



Při způsobu podle patentového spisu US 4,215,199 se směs cyklosporinů A a B, získaná z fermentačního prostředí obsahujícího převážně uvedené složky opakovanou extrakcí provedenou za použití methylenchloridu po předcházejícím mechanickém zpracování v methanolu, nejdříve zbaví tuků chromatografií na sloupci silikagelu za použití eluční soustavy tvořené směsí chloroformu a methanolu, přičemž se eluát odpaří k suchu a získaný zbytek se rozpustí v methanolu a chromatografuje na sloupci Sephadexu LH20 za použití elučního činidla tvořeného methanolem. Eluáty se frakcionují, znovu odpaří k suchu, zbytek se rozpustí ve směsi chloroformu a methanolu v objemovém poměru 98:2 a znovu chromatografuje na sloupci silikagelu. První opouští v eluátu sloupec cyklosporin A, který je následován cyklosporinem B. Čisté cyklosporinové složky se získají odpařením eluátů.

V Helv. Chim. Acta 59(4), str.1075-92 je popsán způsob separace směsi obsahující cyklosporiny A a B. Při tomto způsobu se fermentační prostředí obsahující cyklosporiny A a C smísí s n-butyloacetátem a získaná směs se mechanicky zpracuje v separátoru typu Westfalia. Po tomto zpracování se organická fáze odpaří a surová cyklosporinová směs se zbaví tuků v methanolu a per-troletheru. Po odpaření se zbytek rozpustí v chloroformu a chromatografuje při elučním gradientu, přičemž se jako eluční soustava použijí směsi chloroformu a methanolu v objemových poměrech 98,5:1,5 a 97:3. V prvním eluátu je cyklosporin A, zatímco ve druhém eluátu lze nalézt cyklosporin B. Čistý krystalický produkt se získá v dalších chromatografických stupních. Frakce A se rozpustí v methanolu a chromatografuje na sloupci Sephadexu LH-20 za použití elučního činidla tvořeného methanolem. Píkové frakce (frakce s obsahem produktu) se odpaří, rozpustí v toluenu a chromatografují na sloupci aluminy za použití elučního činidla tvořeného toluenem v přítomnosti rostoucí koncentrace ethyl-acetátu. Frakce se potom odpaří a zpracují v alkoholovém roztoku aktivním uhlím, přičemž se získá krystalický produkt. Surová frakce C se rozpustí v methanolu a chromatografuje na sloupci Sephadexu-LH 20 za použití elučního činidla tvořeného methanolem. Píkové frakce se rozpustí v diethyletheru a cyklosporin C se

separuje přidáním n-hexanu. Tento produkt se potom chromatografuje na silikagelu za použití eluční soustavy tvořené směsí chloroformu a ethanolu.

Výše uvedené chromatografické způsoby separace cyklosporinových směsí jsou poněkud zdlouhavé a nákladné. Opakovaná kapalinová extrakce, odpařovací stupně a následné chromatografické operace činí tento způsob neekonomickým a nevhodným pro použití v průmyslovém měřítku.

Vzhledem k tomu je cílem vynálezu nalézt způsob čištění, který by umožňoval jak separaci cyklosporinových směsí, tak i čištění cyklosporinu A, a který by byl ekonomický a vhodný pro použití v průmyslovém měřítku a který by byl méně zdlouhavý a snáze proveditelný.

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v tom, že se směs obsahující různé cyklosporinové složky nebo zbytek po odpaření vystaví před chromatografickou separací tepelnému zpracování. Toto tepelné zpracování zahrnuje zahřátí na teplotu 80 až 115 °C a roztažení. Při chromatografické separaci, která následuje po tomto tepelném zpracování, se jednotlivé složky dělí příznivěji a v důsledku toho může být cyklosporin A izolován s vyšší čistotou.

Cyklosporinová směs získaná z fermentačního prostředí obsahuje cyklosporinové složky, které jsou z chromatografického hlediska odlišné, zejména cyklosporiny A, B a C a nečistoty, které jsou apolárnější nebo polárnější než cyklosporin A. Hlavní část uvedených nečistot je tvořena ostatními cyklosporinovými složkami nebo nečistotami, které jim jsou podobné.

Vzhledem ke skutečnosti, že jak cenné cyklosporinové složky, tak i uvedené nečistoty jsou si chromatograficky velmi podobné a to při použití libovolných elučních směsí, nemůže být dosaženo požadovaného rozdělení cyklosporinové směsi

v jediném chromatografickém stupni, neboť chromatografické píky, odpovídající jednotlivým složkám cyklosporinové směsi, se překrývají. Za účelem izolace některých cyklosporinových složek v čistém stavu je třeba provést další chromatografické čistící stupně.

Vynález je založen na poznatku spočívajícím v tom, že jestliže se směs obsahující různé cyklosporinové složky vystaví před chromatografickou separací tepelnému zpracování, potom může být dosaženo příznivého rozdělení jednotlivých složek cyklosporinové směsi a cyklosporin A může být potom získán ve vysoké čistotě. Čistění a jednostupňové chromatografické zpracování může být provedeno snadno a ekonomicky.

Uvedené tepelné zpracování předcházející chromatografickou separací zahrnuje zahřátí směsi na teplotu dostatečnou k roztavení a udržení směsi v roztaveném stavu po určitou dobu. K roztavení cyklosporinové směsi dochází při teplotě 80 až 115 °C a to v závislosti na čistotě surového produktu. Tavenina se potom udržuje v roztaveném stavu při téže teplotě po dobu půl hodiny až jedné hodiny, načež se pomalu ochladí (během asi 5 hodin) na teplotu 20 až 25 °C. Takto tepelně zpracovaný produkt se potom chromatografuje.

Podle získaných zkušeností může být tepelnému zpracování za účelem dosažení lepší chromatografické separace podrobeny nejen pevné směsi, nýbrž stejného výsledku může být dosaženo tepelným zpracováním zbytku pevné směsi, získaného z roztoku výše specifikovaným způsobem (3. (kontrola) a příklad 5).

Chromatografie se provádí změnou následujících elučnic soustav: chloroform/methylenchlorid/ethanol (48:50:2) a chloroform/ethylacetát/ethanol (48:50:2) v příkladech 1 a 3 a aceton/methylenchlorid (18:20) a aceton/methylenchlorid (20:80) v příkladech 3 a 4.

Tepelné zpracování předcházející chromatografickou separací má za následek příznivější separaci cyklosporinové směsi v případě, kdy se použije jakákoliv z výše uvedených eluč-

ní směsí. Cyklosporin A se získá v obzvláště vysoké čistotě v případě, kdy se použije trojsložková eluční směs.

Byly provedeny pokusy zahrnující chromatografickou separaci tepelně zpracovaných a nezpracovaných cyklosporinových směsí majících stejné složení za použití výše uvedených elučních soustav. Získané výsledky jsou ilustrovány na připojených obr.1 a obr.2. Čistota produktu získaného z některých frakcí (% hmotn.) je v grafech na uvedených obrázcích vynesena proti objemu eluentu. Z těchto obrázků je zřejmé, že v případě tepelně zpracovaných vzorků se dosáhne příznivější separace složek a odpovídající produkty mohou být takto získány ve vyšší čistotě.

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky výše uvedených pokusů zahrnujících čistění tepelně zpracovaných a nezpracovaných cyklosporinových směsí, vyjádřené jako hmotnost získaného produktu s čistotou vyšší než 90 % hmotn. a výtěžek v %.

	Nezpracovaná směs Tepelně zpracovaná směs			
	Příklad 1	Příklad 3	Příklad 2	Příklad 4
Hmotnost cyklosporinu A	20,26 g	0,0 g	111,80 g	11,94 g
Výtěžek	14,08 %	0,0 %	77,75 %	38,89 %
Cyklosporin A (čistota vyšší než 97,5 % hmotn.)	0,0 g	0,0 g	21,03 g	0,0 g
Výtěžek	0,0 %	0,0 %	14,62 %	0,0 %

Z výše uvedené tabulky je zřejmé, že v případě tepelně zpracovaných produktů se v důsledku lepší separace může izolovat značně vyšší množství látky s čistotou přesahující 90 %

hmotn.. Rovněž je třeba uvést, že v případě, kdy se vychází z tepelně zpracovaných produktů a kdy se použije následujících elučních směsí: chloroform/methylenchlorid/ethanol (48:50:2) a chloroform/ethylacetát/ethanol (48:50:2), je možné získat cyklosporin A v jediném stupni s čistotou 97,5 hmotn., požadovanou lékopisem USA. Výtěžek produktu získaného v kvalitě požadované lékopisem USA je prakticky identický s výtěžkem všech produktů získaných v čistotě přesahující 90 % hmotn. v případě, kdy se chromatografuje předběžně nezpracovaný produkt.

V následující části popisu je vynález blíže objasněn příklady jeho konkrétního provedení, které mají pouze ilustrační charakter a které nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen formulací patentových nároků. V těchto příkladech jsou čistěny surové cyklosporinové směsi zbavené tuku, které jsou získané kultivací mikroorganismu *Tolypocladium varium* (depoziční číslo: NCAIM(P)F001005) a uzolací z fermentačního prostředí. Obsah účinné látky byl stanoven vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií popsanou v lékopisu USA (Pharmacopoeia XXII).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Zařízení: axiálně tlakovaná preparativní kolona pro kapalinovou chromatografii o objemu 4 dm³, plněná silikagelem s velikostí částic od 63 do 200 μm.

Pracovní podmínky: axiální hydraulický tlak: 1 MPa

průtok: 60 cm³/min

eluční soustava 1: chloroform/methylen chlorid/ethanol v objemovém poměru = 48:50:2

eluční soustava 2: chloroform/ethylacetát/ethanol v objemovém poměru = 48:50:2

množství čistěného produktu: 280 g

složení čistěného produktu:

CA (= cyklosporin A): 51,36 % hmotn.

CB (= cyklosporin B): 7,92 % hmotn.

CC (= cyklosporin C): 7,92 % hmotn..

Uvedená směs se rozpustí v 1 dm³ eluční soustavy 1 a zavede na chromatografický sloupec. Eluce se započne eluční soustavou 1 a po spotřebování 20 dm³ této eluční soustavy se v eluci pokračuje za použití eluční soustavy 2. Průběh eluce je graficky zobrazen na připojeném obr.1 (vynesené hodnoty jsou označené prázdnými kroužky).

Eluční soustava (dm^3)	Odpařená látka (g)	CA (% hm.)	CB (% hm.)	Ztráta sušením (% hm.)	m_{CA} (g)	CA* (% hm.)
9	10,0	-	-	-	-	-
10	19,48	72,26	-	2,39	14,61	74,04
11	21,47	74,95	-	4,72	17,32	78,67
2	12,94	80,59	-	2,34	10,73	82,56
13	10,26	88,29	-	1,75	9,23	89,42
14	9,30	86,64	-	1,65	8,21	88,15
15	8,95	89,13	-	1,45	8,10	90,44
16	7,25	90,99	-	1,65	6,71	92,52
17	5,85	92,11	-	1,18	5,45	93,22
18	4,99	84,74	-	1,57	4,30	86,12
19	4,06	82,55	-	2,46	3,45	84,65
20	3,55	84,31	-	1,87	3,05	86,00
21**	2,52	84,37	-	2,22	2,18	86,42
22	2,48	82,59	-	3,25	2,12	85,37
23	1,98	82,86	-	3,93	1,71	86,22
24	18,67	88,34	-	1,48	16,77	89,68
25	9,44	85,52	-	1,48	8,21	86,60
26	7,03	79,10	-	1,32	5,65	80,24
27	6,57	67,96	15,88	1,53	4,75	69,11
28	7,21	35,66	45,73	1,47	2,67	36,21
29	4,95	10,84	62,37	1,25	0,59	10,99
30	2,30	3,52	64,57	0,61	0,09	3,55
31	0,40	3,09	68,82	0,49	0,01	3,16
32	1,00	3,22	69,05	0,52	0,03	3,23
33	0,85	-	75,99	0,33	-	-
34	1,83	-	76,05	0,46	-	-
35	2,20	-	-	-	-	-

CA* množství cyklosporinu A vztažené na sušinu

** změna eluční soustavy

Výtěžek: 20,26 g 14,08 %

Čistota: vyšší než 90 % hmotn.

Příklad 2

Zařízení: axiálně tlakovaná preparativní kolona pro kapalinovou chromatografii o objemu 4 dm³, plněná silikagelem Merck s velikostí částic 63 až 200 μm.

Pracovní podmínky: axiální hydraulický tlak: 1 MPa

průtok: 60 cm³/min

eluční soustava 1: chloroform/methylenchlorid/ethanol v objemovém poměru 48:50:2

eluční soustava 2: chloroform/ethylacetát/ethanol v objemovém poměru 48:50:2

množství čistěného produktu: 280 g

složení čistěného produktu:

CA (=cyklosporin A): 51,35 % hmotn.

CB (=cyklosporin B): 7,92 % hmotn.

CC (=cyklosporin C): 7,92 % hmotn..

Uvedená směs se vystaví tepelnému zpracování při teplotě 110 °C na vzduchu po dobu jedné hodiny, načež se v průběhu 5 hodin ochladí na teplotu 20 °C stále pod atmosférou vzduchu. Tavenina se potom rozpustí v 1 dm³ eluční soustavy 1 a zavede na chromatografický sloupec. Eluce se zahájí eluční soustavou 1 a po spotřebování 27 dm³ této soustavy se v eluci pokračuje za použití eluční soustavy 2. Průběh eluce je graficky zobrazen na obr.1 (vynesené hodnoty jsou označené plynými kroužky).

Eluční soustava (dm ³)	Odpařená látka (g)	CA (% hm.)	CB (% hm.)	Ztráta sušením (% hm.)	^m CA (g)	CA* (% hm.)
31	15,59	93,54	-	1,68	14,84	95,18
32	21,55	94,76	-	2,87	21,03	97,56
33	8,93	91,68	-	2,01	8,36	93,56
34	4,33	89,15	0,38	1,42	3,92	90,59
35	2,79	86,12	0,84	1,42	2,44	87,37
36	6,72	72,30	14,98	1,05	4,92	73,17
37	6,92	13,39	46,49	1,76	1,04	13,64
38	2,82	9,05	72,50	1,41	0,29	9,18
39	1,02	7,43	69,24	0,89	0,08	7,50
40	1,07	5,0	67,09	1,42	0,06	5,60
41	1,10	6,79	69,63	3,52	0,11	7,04
42	0,89	4,06	68,15	4,29	0,07	4,25
43	1,20	4,24	77,21	4,78	0,10	4,46
44	1,13	2,83	90,51	0,10	0,03	2,83
45	1,34	1,72	85,29	-	0,02	-
46	1,44	1,63	80,80	0,92	0,03	-

CA* množství cyklosporinu A vztažené na sušinu

** změna eluční soustavy

Celkový výtěžek: 118,8 g (77,75 %)

Čistota: vyšší než 90 % hmotn.

Čistota 21,03 g produktu (14,62 %) byla vyšší než 97,5 % hmotn.).

Příklad 3

Zařízení: kolona pro preparativní chromatografii o objemu 700 cm³, plněná silikagelem Merck s velikostí částic 63 až 200 μm.

Pracovní podmínky: průtok: 3 cm³/min

eluční soustava 1: aceton/methylenchlorid v.
objemovém poměru 18:82

eluční soustava 2: aceton/methylenchlorid v
objemovém poměru 20:80

množství čistěné směsi: 50 g rozpuštěno v
350 ml methylenchloridu

složení čistěné směsi:

CA (=cyklosporin A): 61,48 % hmotn.

CB (=cyklosporin B): 9,41 % hmotn.

CC (=cyklosporin C): 7,47 % hmotn..

Průběh eluce je graficky zobrazen na obr.2 (vynesené hodnoty jsou označené prázdnými kroužky).

Eluční soustava (dm ³)	Odpařená látka (g)	CA (% hm.)	CB (% hm.)	Ztráta sušením (% hm.)	mCA (g)	CA* (% hm.)
200	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-
600	-	-	-	-	-	-
800	8,38	66,38	-	0,44	5,56	66,67
1000	10,82	77,66	-	1,0	8,40	78,76
1200	4,26	77,71	-	0,99	3,31	78,46
1400	2,88	71,23	0,22	1,26	2,05	72,13
1600	1,99	71,64	0,50	1,83	1,42	72,97
1800	1,45	68,16	1,03	1,35	0,98	69,09
2000	1,12	72,41	1,42	0,35	0,81	72,66
2200	1,09	59,57	1,60	1,12	0,64	60,24
2400	0,89	63,17	2,22	0,64	0,56	63,73
2600	0,78	59,35	2,64	0,64	0,46	59,71
2800	0,85	-	-	-	-	-
3000	0,53	50,02	4,06	0,70	0,26	50,35
3200	0,74	-	-	-	-	-
3400	0,40	40,65	4,32	0,73	0,16	40,94
3600	0,40	30,78	4,17	0,51	0,12	30,15
3800	0,63	-	-	-	-	-
4000	0,48	-	-	-	-	-
4200	0,40	-	-	-	-	-
4400	0,40	-	-	-	-	-
4600	0,20	-	-	-	-	-
4800**	0,26	-	-	-	-	-
5000	0,50	-	-	-	-	-
5200	0,25	-	-	-	-	-
5400	0,07	-	-	-	-	-
5600	0,03	-	-	-	-	-
5800	0,06	-	-	-	-	-
6000	0,06	-	-	-	-	-
6200	0,04	-	-	-	-	-
6400	11,48	2,38	0	0,57	0,27	0,39
6600	0,25	-	-	-	-	-

CA* koncentrace cyklosporinu A vztažená na sušinu

** změna eluční soustavy

Nebyl izolován žádný produkt, jehož čistota by přesahovala 90 % hmotn..

Obsah cyklosporinu A ve frakci mající nejvyšší obsah účinné látky činí 78,7 %, což odpovídá 8,4 g čistého cyklosporinu A.

Příklad 4

Zařízení: kolona pro preparativní kapalinovou chromatografii o obsahu 700 cm³, naplněná silikagelem Merck s velikostí částic 63 až 200 μm.

Pracovní podmínky: průtok: 3 cm³/min

eluční soustava 1: aceton/methylenchlorid

v objemovém poměru 18:82

eluční soustava 2: aceton/methylenchlorid

v objemovém poměru 20:80

množství čistěné směsi: 50 g směsi tepelně zpracované po dobu jedné hodiny při teplotě 110 °C. Tavenina se ochladí, rozpustí v 350 cm³ methylenchloridu a převede na chromatografický sloupec

složení čistěné směsi:

CA (= cyklosporin A): 61,48 % hmotn.

CB (= cyklosporin B): 9,41 % hmotn.

CC (= cyklosporin C): 7,47 % hmotn..

Průběh eluce je graficky zobrazen na připojeném obr.2 (vynesené hodnoty jsou označené plnými kroužky).

Eluční soustava	Odpařená látka	CA	CB	Ztráta sušením	mCA	CA*
(dm ³)	(g)	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(g)	(% hm.)
600	-	-	-	-	-	-
800	0,29	-	-	-	-	-
1000	5,4	68,50	-	0,33	3,69	68,72
1200	13,26	90,09	-	1,37	11,94	91,34
1400	4,48	88,20	-	0,50	3,95	88,64
1600	2,84	84,41	0,39	0,34	2,39	84,69
1800	1,98	81,88	0,87	0,46	1,62	82,25
2000	1,38	78,16	1,30	0,44	1,07	78,50
2200	1,49	77,40	1,92	1,37	1,15	78,47
2400	0,95	70,80	2,26	1,14	0,67	71,61
2600	0,75	66,99	3,09	0,34	0,50	67,21
2800	0,60	64,78	4,07	0,66	0,38	65,21
3000	0,39	58,07	5,34	0,63	0,22	58,43
3200	0,45	53,11	5,22	0,31	0,23	53,27
3400	0,41	46,48	5,84	0,47	0,19	46,69
3600	0,37	-	-	-	-	-
3800	0,34	-	-	-	-	-
4000	0,23	-	-	-	-	-
4200	0,27	-	-	-	-	-
4400	0,19	-	-	-	-	-
4600	0,16	-	-	-	-	-
4800	0,10	-	-	-	-	-
5000**	0,20	-	-	-	-	-
5200	0,15	-	-	-	-	-
5400	0,18	-	-	-	-	-
5600	0,28	-	-	-	-	-
5800	0,10	-	-	-	-	-
6000	0,04	-	-	-	-	-
6200	5,23	2,52	43,28	0,48	0,13	2,49
6400	4,59	-	6,82	0,56	-	-
6600	0,62	-	0,87	0,34	-	-
6800	0,06	-	-	-	-	-

CA* koncentrace cyklosporinu A vztažená na sušinu

** změna eluční soustavy

Výtěžek: 11,94 g 38,89 %

Čistota: vyšší než 90 % hmotn..

Příklad 5

Zařízení: kolona pro preparativní kapalinovou chromatografii o obsahu 700 cm³, naplněná silikagelem Merck majícím velikost částic 63 až 200 μm.

Pracovní podmínky: průtok: 3 cm³/min

eluční soustava 1: aceton/methylenchlorid v objemovém poměru 19:82

eluční soustava 2: aceton/methylenchlorid v objemovém poměru 20:80.

Roztok 50 g látky rozpuštěné v methylenchloridu se odpaří a takto získaný zbytek se tepelně zpracuje po dobu dvou hodin při teplotě 80 °C a zaveđe na chromatografický sloupec.

Složení čistěné směsi:

CA (= cyklosporin A): 30,74 % hmotn.

CB (= cyklosporin B): 4,7 % hmotn.

CC (= cyklosporin C): 3,7 % hmotn..

Eluční soustava (dm ³)	Odpařená látka (g)	CA (% hm.)	CB (% hm.)	Ztráta sušením (% hm.)	mCA (g)	CA* (% hm.)
800	-	-	-	-	-	-
1000	8,95	74,32	-	0,85	6,65	74,93
1200	8,56	85,33	-	1,45	7,30	86,53
1400	3,91	86,03	-	1,32	3,36	87,68
1600	2,72	84,20	0,42	0,58	2,29	84,68
1800	1,94	76,74	0,47	0,96	1,48	77,02
2000	1,54	84,71	1,13	0,38	1,30	84,73
2200	1,28	84,95	1,78	0,42	1,08	85,28
2400	1,04	85,38	2,36	0,36	0,88	85,68
2600	1,02	84,25	3,51	0,28	0,85	84,45
2800	0,76	82,36	4,27	0,38	0,62	82,55
3000	0,56	78,25	4,85	0,54	0,43	78,53
3200	0,48	76,38	4,25	0,64	0,35	76,74
3400	0,47	-	-	-	-	-
3600	0,42	-	-	-	-	-
3800	0,62	-	-	-	-	-
4000	0,32	-	-	-	-	-
4200	0,54	-	-	-	-	-
4400	0,56	-	-	-	-	-
4600	0,54	-	-	-	-	-
4800	0,54	-	-	-	-	-
5000**	0,61	-	-	-	-	-
5200	0,78	-	-	-	-	-
5400	0,92	-	-	-	-	-
5600	0,62	-	-	-	-	-

CA* koncentrace cyklosporinu A vztažená na sušinu

** změna eluční soustavy

Nebyla izolována žádná frakce s obsahem účinné látky přesahujícím 90 %. Obsah cyklosporinu A ve frakci mající nejvyšší obsah účinné látky činí 87,08 %, což odpovídá 3,36 g čistého cyklosporinu A.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob čišťení cyklosporinu A chromatografií ze směsí obsahujících zejména cyklosporiny A, B a C a ostatní cyklosporinové složky polárnější nebo apolárnější než cyklosporin A nebo jim podobné nečistoty, v y z n a č e n ý t í m , že se směs nebo zbytek po jejím odpaření zahřeje před chromatografií na teplotu 80 až 115 °C, taví se a tavenina se potom chromatografuje o sobě známým způsobem.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že se chromatografie provádí za postupného použití eluční soustavy tvořené směsí chloroformu, dichlormethanu a ethanolu v objemovém poměru 48:50:2 a eluční soustavy tvořené směsí chloroformu, ethylacetátu a ethanolu v objemovém poměru 48:50:2.

Zastupuje :

032373
00810
24. V 93
URAD PROSTOROVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL