

DR. ASBÓTH · DR. BICZI & TÁRSA
ÜGYVÉDI ÉS SZABADALMI IRODA

Dr. Asbóth Domokos
Dr. Biczki Éva
Dr. Krajnyák András
Krenner Andrea
Schiller Erika

1013 Budapest, Váralja utca 3.
☒ H-1535 Budapest, Pf.: 901.
Tel. & fax: (+ 36 1) 201-80-42; 201-83-30; 214-82-26
E-mail: asbothd@abklaw-patent.hu
Internet: www.abklaw-patent.hu

ELJÁRÁS LOVASZTATIN IZOLÁLÁSÁRA

Bejelentő: Ranbaxy Laboratories Limited, New Delhi, India

A nemzetközi bejelentés napja: 2001.06.20.

Elsőbbsége: 2000.06.30.(630/DEL/992000) India

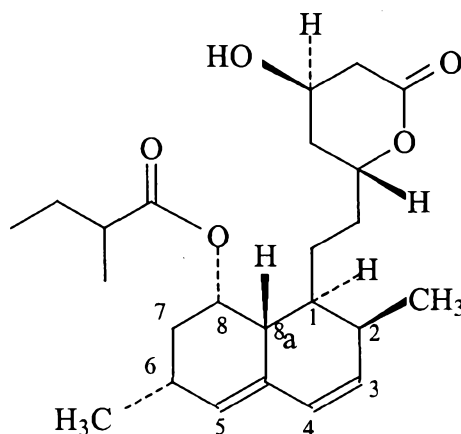
A nemzetközi bejelentés száma: PCT/IB/01/01087

A nemzetközi közzététel száma: WO 02/00615

Képviselő: **DR. ASBÓTH · DR. BICZI & TÁRSA** ÜGYVÉDI ÉS
SZABADALMI IRODA

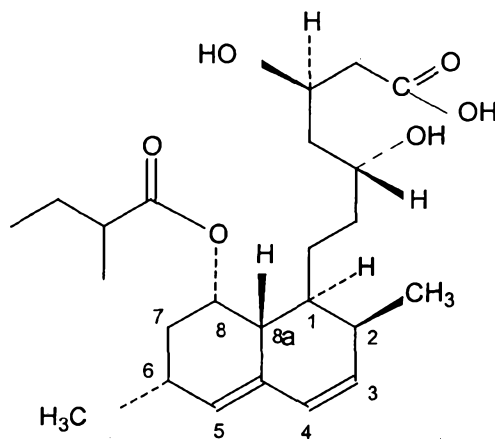
KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) képletű



(I)

lovasztatin nagytisztaságban történő előállítására a II képletű



(II)

mevinolsav laktonizációja útján, úgy, hogy a laktonizációt vizes közegben végzik és a kívánt terméket izolálják.

ülke az I és II képlet
pontosan

DR. ASBÓTH · DR. BICZI & TÁRSA
ÜGYVÉDI ÉS SZABADALMI IRODA

Dr. Asbóth Domokos
Dr. Biczki Éva
Dr. Krajnyák András
Krenner Andrea
Schiller Erika

1013 Budapest, Váralja utca 3.

☒ H-1535 Budapest, Pf.: 901.

Tel. & fax: (+ 36 1) 201-80-42; 201-83-30; 214-82-26

E-mail: asbothd@abklaw-patent.hu

Internet: www.abklaw-patent.hu

ELJÁRÁS LOVASZTATIN IZOLÁLÁSÁRA

Bejelentő: Ranbaxy Laboratories Limited, New Delhi, India

Feltalálók: KUMAR, Parveen, Haryana, India

RAMAN, S., Haryana, India

NARULA, Pardeep, Delhi, India

A nemzetközi bejelentés napja: 2001.06.20.

Elsőbbsége: 2000.06.30.(630/DEL/992000) India

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/IB/01/01087

A nemzetközi közzététel száma: WO 02/00615

Képviselő: **DR. ASBÓTH · DR. BICZI & TÁRSA** ÜGYVÉDI ÉS
SZABADALMI IRODA

[illegible]

5

10

15

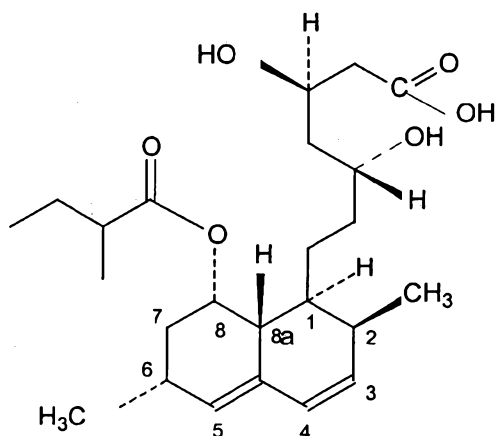
Ezeknek a hatóanyagoknak a többségét fermentációs úton állítják elő, elsősorban az *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amocolatopsis*, *Mucor* vagy *Penicillium* nemzetséghez (génuszhoz) tartozó mikroorganizmusokat alkalmazva. Más esetekben a fermentációs úton kapott termékeket még
5 kémiai szintézisekkel modifikálják vagy a terméket teljes mértékben kémiai úton; ún. totál-szintézissel állítják elő.

A lovasztatin a fent említett termék-csoport, az ún. sztatinek családjából az első, amelyet széleskörűen alkalmaznak a gyakorlatban. A lovasztatint
10 fermentációs módszerrel mikroorganizmus segítségével állítják elő. Mikroorganizmusként *Aspergillus terreus* törzset használnak (lásd: 4 231 938 számú USA-beli szabadalmi leírást), melyet az American Type Culture Collection (rövid nemzetközi nevén: ATCC) mikroorganizmus-
gyűjteményben a 20 541 és a 20 542 deponálási számon találhatunk. Ismert
15 a lovasztatin mikrobiológiai úton történő előállítására a *Monascus ruber* nevű mikroorganizmus alkalmazása is (lásd: a 3 006 216 számú német szabadalmi leírást, ill. a 4822 számon deponált fenti nevű mikroorganizmust, mely a japán Nemzetközi Kereskedelmi Minisztérium Fermentációs Kutatási Intézetének törzsgyűjteményében található.)

20

A lovasztatin kémiai neve: 1,2,6,7,8,8a-hexahidro- β , δ -dihidroxi-2,6-dimetil-8-(2-metil-1-oxo-butoxi)-1-naftalen-heptánsav- δ -lakton, amelynek szerkezeti képletét az I képleten mutatjuk be.

25 A lovasztatin aktív formája egy sav, amely kémiailag 1,2,6,7,8,8a-hexahidro- β , δ -dihidroxi-2,6-dimetil-8-(2-metil-1-oxo-butoxi)-1-naftalen-heptánsav és szerkezetét az alábbi II képlettel jellemezhetjük:



(II)

- 5 A kémiai úton előállított HMG-CoA-reduktáz-inhibitorok kereskedelmi bevezetése megalapozta azt az igényt, hogy a fermentációs technológiával gyártott sztatinkok egyre jobb kitermeléssel legyenek előállíthatók. A technológia fejlesztése magával hozta a magasabb hozamú mikroorganizmusok térnyerését, az eljárások nagyításának hatékonyságát, a
- 10 fermentlé feldolgozásának javítását, valamint az izolálási technikák javulását.

A fermentációs eljárás során a lovasztatin a fermentlében leginkább hidroxisav, azaz mevinolsav formában van jelen. A lovasztatin fermentléből való izolálását a szakirodalom szerint kétféle úton lehet megvalósítani. Az egyik

15 ismert módszer (lásd: 4 319 039 számú USA-beli szabadalmi leírást) abban áll, hogy a mevinolsavat oldószerrel kiextrahálják, majd a mevinolsav ammónium-sóját izolálják és ezt követően laktonizálással lovasztatinná alakítják.

A másik megoldás szerint a mevinolsavat oldószerrel kiextrahálják, ebben az oldat-fázisban laktonizálnak, majd a lovasztatint izolálják (lásd: WO 97/20834 számú PCT-szabadalmi bejelentést). A 33 536 számú EP-szabadalmi leírás szerint a lovasztatin fermentléből való izolálását etilacetáttal végzik. Az extraktumot vákuumban bepárolják, majd a laktonizálást toluolban 106 C⁰-on 2 órai időtartamban végzik el. Miután a laktonizálás teljessé vált, az oldatot egészen kis térfogatra koncentrálnak és oszlopkromatográfiás tisztításnak vetik alá. Oldószerként etilacetátot vagy n-hexánt alkalmaznak. Az összegyűjtött frakciókat ismét vákuumban betöményítik és ebből a tiszta lovasztatin lakton-formában kikristályosodik.

Összefoglalva, tehát, mindkét ismert módszer egy végső tisztítási lépést igényel a lovasztatin gyógyszerkönyvi tisztaságának elérése érdekében.

- 15 A fentiek alapján megállapítható, hogy az anti-hiperkoleszterol szerek izolálására és tisztítására vonatkozó ismert, korábbi szabadalmi eljárások lényeges hátrányokat tartalmaznak, miután több technológiai lépést, többszöri extrakciót, nehézkes kromatográfiás tisztítást, laktonizációt és kristályosítási metodikákat foglalnak magukba. Így, bár a végtermék tisztasága eléri a
- 20 gyógyszerkönyvek által megkövetelt szintet, a hatóanyag rendkívül alacsony hozammal állítható elő. Ráadásul, ezek az ismert eljárások igen jelentős mennyiségű szerves oldószerek használatát igénylik, és ehhez ipari termelés esetén nagy méretű, drágán üzemelő berendezések szükségesek.
- 25 A második módszerként említett magas hőmérsékleten végzett laktonizálás gyakran nem kívánatos melléktermékek megjelenését is okozza, így további tisztítási lépések beiktatására is szükség van.

A TALÁL MÁNY LÉNYE GE

A találmány célja, tehát, olyan eljárás kidolgozása, amellyel a technika
5 állásából ismert eljárások hátrányai kiküszöbölhető és egyszerű, hatékony
módszert ad a lovasztatin ipari szintű, gazdaságos előállítására.

Célunk volt az is, hogy a termék nagy tisztasággal legyen előállítható,
valamint rövid technológiai időkel, kevesebb oldószer felhasználásával
kapjuk meg a kívánt terméket.

10

Felismerésünk abban áll, hogy a mevinolsav laktonizálását vizes közegben a
szobahőmérsékletnél alig magasabb hőmérsékleten meg lehet valósítani.

15

A találmány, tehát, eljárás a II képletű mevinolsav laktonizációjának
megvalósítására és az I képletű lovasztatin izolálására, olyan módon, hogy a
laktonizációt teljesen vizes közegben, magában a fermentlében végezzük el.
Az így kapott lovasztatin igen magas tisztaságú, annak kromatográfiás
tisztasága meghaladja a 95 %-ot.

20

A találmány szerinti eljárásban a vizes közeg pH-ját savas tartományra
állítjuk, majd az inkubálást 40-60 C°-on, 20-60 órán keresztül végezzük. Az
eljárásban vizes közegként fermentlevet alkalmazunk. Fermentléként,
célszerűen a lovasztatint termelő mikroorganizmus fermentációs közegét
alkalmazzuk.

25

A találmány szerinti eljárásban a fermentlé előállítására
mikroorganizmusként Aspergillus nemzetséghez tartozó mikroorganizmus

törzset használunk. Egy előnyös eljárás-változatban az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmusok köréből *Aspergillus terreus* törzset használhatjuk, célszerűen az ATCC 20 542 deponálási számú *Aspergillus terreus* törzset alkalmazhatjuk.

5

A találmány szerinti laktonizációt savas pH-tartományban végezzük, célszerűen a pH=2,0-3,0 értékű tartományt választhatjuk. A pH beállítását savval, előnyösen ásványi savval végezzük. Ásványi savként kénsavat, salétromsavat, sósavat vagy foszforsavat alkalmazunk.

10

A találmány szerinti eljárásban a laktonizáció hőmérsékletét 50-60 C° közötti értékben választjuk.

15

Találmány szerinti eljárásunk értelmében a lovasztatin izolálását a vizes rendszer oldószeres extrakciójával, ezt követő oldószer-bepárlással, kristályosítással és szárítással végezzük. Az oldószeres extrakcióra észter-típusú oldószert, előnyösen etilacetátot, butilacetátot vagy aromás szénhidrogént, előnyösen toluolt használhatunk.

20

A találmány értelmében, tehát, úgy járunk el, hogy a lovasztatint fermentációs úton mikroorganizmus felhasználásával állítjuk elő. Mikroorganizmusként *Aspergillus* nemzetségbe tartozó törzset, előnyösen *Aspergillus terreus* (ATCC 20.542) vagy ennek valamely jól termelő variánsát használjuk.

25

A fermentációs eljárás során a lovasztatint tartalmazó fermentlé pH-ját savas tartományban kell tartani, így a mevinolsav-képződés legkedvezőbb pH-ja=2-3 közötti érték. Az inkubációt 20-60 óra időtartamban, 40-60 C°-os

tartományban célszerű végezni, ekkor a mevinolsav laktonizációja lejátszódik és az oldatból a lovasztatin kinyerhető. A savas pH beállítására az ismert savakat, előnyösen ásványi savakat, mint például sósavat, kénsavat, salétromsavat, foszforsavat és másokat használhatunk.

5

A találmány szerinti eljárás egy előnyös változatában a fermentlé inkubálását 24 órán keresztül végezzük. A találmány szerinti eljárásban kedvező eredményeket kapunk 40-60 C°-on végzett, illetve 50-60 C°-on végzett inkubáció esetén.

10

A találmány szerinti eljárásban a lovasztatin izolálását önmagában ismert, konvencionális módszerekkel végezhetjük. Célszerűen úgy járhatunk el, hogy az oldatból a lovasztatint kiextraháljuk, majd az oldószer bepárlással eltávolítjuk, a terméket kikristályosítjuk és szárítjuk. Extraháló oldószerként

15 észter-típusú oldószereket, így etilacetátot, butilacetátot vagy aromás szénhidrogéneket, így például toluolt használhatunk.

20

A találmány szerinti eljárásban önmagában ismert módszerekkel is javíthatjuk az eljárás hatékonyságát. Így, például a kapott lovasztatint további tisztítás alá

20 vethetjük. Ezt a tisztítást oldószerből történő átkristályosítással végezhetjük.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákban mutatjuk be részletesen, anélkül, hogy az oltalmi kört ezekre korlátoznánk:

25

1. példa

6,2 liter fermentléhez 0,8 liter 2n híg kénsavat adunk, így annak pH-ját 2,1-re állítjuk. A savanyított fermentlevet 50 C°-ra melegítjük és további 24 órán keresztül 50-60 C°-on keverjük. Ezen idő alatt a savas forma 90%-a lakton-formává alakul, melyet magasnyomású folyadékkromatográfiás módszerrel, nemzetközi szakmai rövidítéssel: HPLC-módszerrel követhetünk.

Az így kezelt fermentlevet szűrjük, a micéliumot 7,5 liter toluollal extraháljuk. A toluolos-szerves fázist 1,3 liter 5 tömeg/térfogat%-os nátrium-bikarbonát-oldattal és 0,65 liter demineralizált vízzel mossuk. A mosott toluolos-szerves fázist vákuumban 60 C°-on 160-200 ml térfogatra bepároljuk. Az így kapott koncentrátumot 5-7 C°-ra hűtjük és további 1 órán keresztül keverjük. A szuszpenziót szűrjük, a szűrőn maradt kristályokat 50 ml 5-10 C°-ra hűtött toluollal mossuk. A kapott nedves terméket 40 C°-on 16 órán keresztül vákuumban szárítjuk.

A kapott termék: 25,6 g lovasztatin (kromatográfiás tisztasága: 95 % felett).

2. példa

12 liter fermentléhez 1,4 liter 10 tömeg%-os híg salétromsavat adunk, így annak pH-ját 2,1-re állítjuk. A savanyított fermentlevet 50 C°-ra melegítjük és további 48 órán keresztül ezen a hőmérsékleten keverjük. Ezen idő alatt a savas forma 90%-a lakton-formává alakul, melyet HPLC-módszerrel követhetünk.

Az így kezelt fermentlevet szűrjük, a micéliumot 12 liter toluollal extraháljuk. A toluolos-szerves fázist 1,5 liter 5 tömeg/térfogat%-os nátrium-bikarbonát-oldattal és 1,5 liter demineralizált vízzel mossuk. A mosott toluolos-szerves fázist vákuumban 50 C°-on 300-350 ml térfogatra bepároljuk. Az így kapott koncentrátumot 5-7 C°-ra hűtjük és további 3 órán keresztül keverjük. A szuszpenziót szűrjük, a szűrőn maradt kristályokat 100 ml 5-10 C°-ra hűtött toluollal mossuk. A kapott nedves terméket 40 C°-on 16 órán keresztül vákuumban szárítjuk.

10 A kapott termék: 46,2 g lovasztatin (kromatográfiás tisztasága: 95 % felett).

3. példa

8500 liter fermentléhez 540 liter 2n híg kénsavat adunk, így annak pH-ját 2,0-re állítjuk. A savanyított fermentlevet 50-55 C°-ra melegítjük és további 22 órán keresztül ezen a hőmérsékleten keverjük. Ezen idő alatt a savas forma 90%-a lakton-formává alakul, melyet HPLC-módszerrel követhetünk.

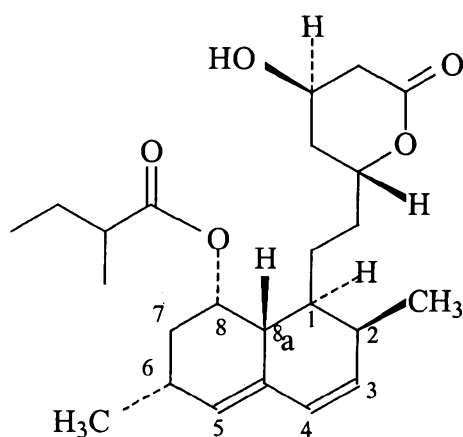
Az így kezelt fermentlevet szűrjük, a micéliumot 7600 liter toluollal extraháljuk. A toluolos-szerves fázist 1340 liter 5 tömeg/térfogat%-os nátrium-bikarbonát-oldattal és 670 liter demineralizált vízzel mossuk. A mosott toluolos-szerves fázist vákuumban 40-60 C°-on 200 liter térfogatra bepároljuk. Az így kapott koncentrátumot 5-8 C°-ra hűtjük és további 2 órán keresztül keverjük. A szuszpenziót szűrjük, a szűrőn maradt kristályokat 130 liter 5-10 C°-ra hűtött toluollal mossuk. A kapott nedves terméket 40 C°-on 16 órán keresztül vákuumban szárítjuk.

A kapott termék: 45,3 kg lovasztatin (kromatográfiás tisztasága: 95 % felett).

Megjegyezzük, hogy a fenti példákat még egyéb önmagában ismert módszerekkel továbbfejleszthetjük, ezek a megoldások is jelen találmány
5 oltalmi körébe tartoznak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

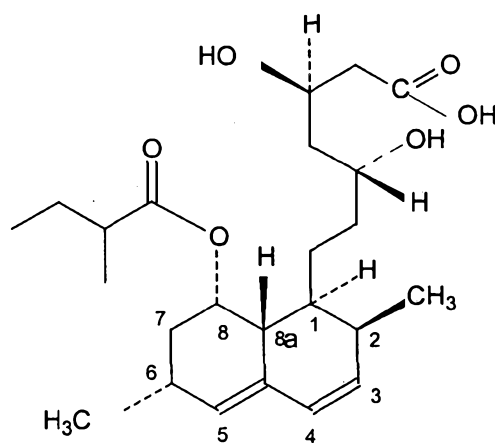
1. Eljárás az (I) képletű



5

(I)

lovasztatin nagytisztaságban történő előállítására a II képletű



(II)

mevinolsav laktonizációja útján, azzal jellemezve, hogy a laktonizációt

10 vizes közegben végezzük és a kívánt terméket izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vizes közeg pH-ját savas tartományra állítjuk, majd az inkubálást 40-60 C°-on, 20-60 órán keresztül végezzük.

5 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy vizes közegként fermentlevet alkalmazunk.

10 4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fermentléként a lovasztatint termelő mikroorganizmus fermentációs közegét alkalmazzuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként Aspergillus nemzetséghez tartozó mikroorganizmus törzset használunk.

15 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként az Aspergillus nemzetséghez tartozó mikroorganizmusok köréből Aspergillus terreus törzset használunk.

20 7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként az ATCC 20 542 deponálási számú Aspergillus terreus törzset használjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a laktonizációt savas pH-tartományban végezzük.

25

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a laktonizációt pH=2,0-3,0 értékű tartományban végezzük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH beállítását savval végezzük.
11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH
5 beállítását ásványi savval végezzük.
12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ásványi savként kénsavat, salétromsavat, sósavat vagy foszforsavat alkalmazunk.
- 10 13. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a laktonizáció hőmérsékletét 50-60 C° közötti értékben választjuk.
14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kívánt termék; a lovasztatin izolálását a vizes rendszer oldószeres
15 extrakciójával, ezt követő oldószer-bepárlással, kristályosítással és szárítással végezzük.
15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldószeres extrakcióra észter-típusú oldószert, előnyösen etilacetátot,
20 butilacetátot vagy aromás szénhidrogént, előnyösen toluolt használunk.

A bejelentő helyett a meghatalmazott:

DR. ASBÓTH · DR. BICZI & TÁRSA
ÜGYVÉDI ÉS SZABADALMI IRODA
1535 Budapest, Pf.: 901.

(Dr. ASBÓTH Domokos)

14 oldal
Bevezető