

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

014192

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2010.10.29**

(51) Int. Cl. *C12P 17/02* (2006.01)

(21) Номер заявки: **200802175**

(22) Дата подачи: **2007.05.22**

(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПСТАТИНА

(31) **06010470.0**

(56) EP-A-0803576

(32) **2006.05.22**

WO-A-03048335

(33) EP

(43) **2009.04.28**

(86) PCT/EP2007/004529

(87) WO 2007/134836 2007.11.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КРКА (SI)

(72) Изобретатель:

Гаспариц Алес, Сладиц Гордан (SI), Бе-
нички Свадель Неда (HR), Пелко Митя,
Распор Петер, Петковиц Грвойе, Фуйс
Стефан (SI)

(74) Представитель:

Кузнецова Ю.В., Пантелеев А.С., Ильмер
Е.Г. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к получению вторичных метаболитов и, в частности, к получению липстатина. Про липстатин, мощный ингибитор липазы поджелудочной железы, имеются сведения, что он является полезным при лечении и/или профилактике ожирения и ассоциированных с ним заболеваний. Настоящее изобретение описывает способ, позволяющий получать указанный ингибитор фермента с высоким выходом и высокой чистотой.

B1

014192

014192

B1

Настоящее изобретение относится к получению вторичных метаболитов, в частности к получению липстатина. В настоящем изобретении описан способ, позволяющий получать указанный ингибитор фермента с высоким выходом и высокой чистотой.

Ожирение представляет собой состояние, от которого страдают более 30% взрослого населения промышленного мира, и является важной проблемой общественного здравоохранения, поскольку увеличение массы тела может быть опасным и приводить к различным проблемам со здоровьем. Примеры болезней, связанных с ожирением, включают диабет типа II, гипертонию, гиперлипидемию, ишемическую болезнь сердца, удар, рак груди и толстой кишки, апноэ во сне, заболевание желчного пузыря, гастроэзофагальную рефлюксную болезнь, жировую инфильтрацию печени, подагра, тромбоз. Ожирение является одним из основных секторов сердечно-сосудистых заболеваний. Уровни холестерина, кровяного давления, кровяного сахара и мочевой кислоты у людей, страдающих ожирением, обычно выше, чем у людей с нормальным весом. Смертность от ишемической болезни сердца среди людей с избыточным весом, как правило, также повышена.

Решающими факторами ожирения являются социальные факторы, физиологические факторы, генетические факторы, факторы, обусловленные развитием, и сниженная физическая активность. Компоненты комплексной программы по снижению веса включают медицинскую оценку, модификации питания и диеты, диетологическое воспитание, когнитивное переструктурирование, увеличение физической активности и долгосрочное врачебное наблюдение.

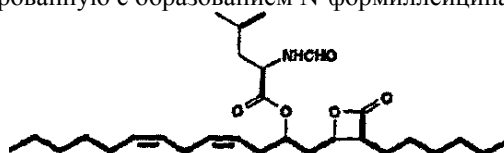
Современные лекарственные препараты, направленные на потерю веса, можно разделить на две группы в зависимости от механизма действия: препараты, влияющие на центральную нервную систему, и препараты, не влияющие на центральную нервную систему.

Первый тип может вызывать уменьшение веса, влияя на определенные нейротрансмиттеры и снижая, таким образом, аппетит, но имеет побочные эффекты, заключающиеся в изменении кровяного давления и частоты ударов сердца, даже если эти препараты принимают в течение короткого времени.

Второй тип представляет собой средства, снижающие активность липаз, которые подавляют темп абсорбции жира путем ингибирования липаз. Эти ферменты способны гидролизовать триглицериды с образованием глицерина и свободных жирных кислот в ходе процесса, который называется липолиз. Образовавшиеся молекулы (в частности, свободные жирные кислоты) выступают как переносимые с кровью носители энергии, которые могут использоваться печенью, скелетной мускулатурой и другими органами для аэробного дыхания.

Примеры второго типа лечения ожирения с помощью ингибиторов липаз включают применение таких соединений, как липстатин и производные липстатина.

Липстатин представляет собой мощный ингибитор липазы поджелудочной железы и является предшественником орлистата, известного из EP 0129748. Липстатин содержит бета-лактоновое кольцо, возможно, отвечающее за необратимое ингибирование липаз, которое несет два алифатических остатка с длиной цепи 6 и 13 атомов углерода. Одна из боковых цепей содержит две изолированные двойные связи и гидроксигруппу, этерифицированную с образованием N-формиллейцина

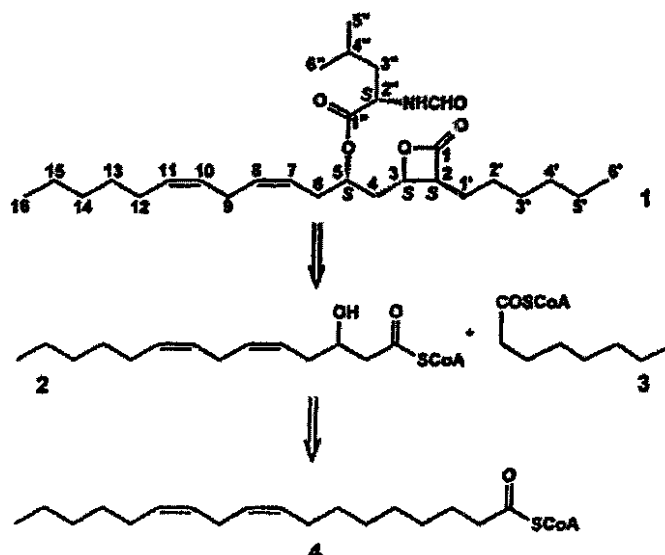


Было высказано предположение, что липстатин можно синтезировать путем конденсации Клайзена октаноила-СoА с 3-гидрокситетрадеcanoилом-СoА, образованным из линолевой кислоты. Тетрагидропроизводное липстатина, тетрагидролипстатин (Орлистат®, Ксеникал), применяют для лечения тяжелого ожирения, причем он образует ковалентный аддукт с сериновой группировкой липазы поджелудочной железы человека в результате трансэтерификации. Липстатин и его производные действуют путем индукции повышения экскреции жиров с калом (стеаторея), что приводит к снижению биодоступности проглатываемого жира.

Химический синтез производного липстатина тетрагидролипстатина описан, например, в Hanessian, S. et al., J. Org. Chem., 58 (1993), p. 7768-81, и включает несколько стадий синтеза с общим выходом 38%.

Однако сложные вторичные метаболиты, такие как липстатин, предпочтительно получают биохимическими способами с использованием подходящих штаммов. Примером такого штамма, способного к продукции липстатина, является *Streptomyces toxytricini* (Weibel E. et al., J. Antibiot. (1987), p. 1081).

Лежащий в основе биосинтетический путь можно проиллюстрировать следующей ретробиосинтетической схемой (1: липстатин; 2: 3-гидрокси-Δ5,8-тетрадекадиеноил-СoА; 3: октаноил-СoА и 4: линоил-СoА).



Получение липстатина биохимическими способами, такими как способ ферментации, раскрыто, например, в EP 0129748. Недостатком способа ферментации, раскрытого в указанной ссылке, является то, что липстатин содержится в малых количествах - несколько миллиграмм на 1 л, что делает последующее выделение и очистку трудными и сложными.

В EP 0803576 (Roche) раскрыт способ, при котором некоторые предшественники липстатина, а именно линолевая кислота, каприловая кислота и N-формил-L-лейцин или предпочтительно L-лейцин, инокулировали в ферментацию. Выход ферментации был малым вследствие токсичности жирных кислот и количества питательного раствора были очень маленькими. Подачу линолевой кислоты и каприловой кислоты и/или их солей предпочтительно выполняли так, чтобы их концентрация в сыворотке оставалась ниже чем 1000 мг/л. В данном способе ферментации применяется среда, по существу, не содержащая жиров и масел, поскольку они приводят к неконтролируемому высвобождению жирных кислот при ферментации и большому количеству остатка в конце ферментации.

В WO 03/048335 (Teva) раскрыт способ получения липстатина, основанный на ферментационной среде, содержащей масло и усвояемый источник углерода, где массовое соотношение масла и усвояемого источника углерода подобрано таким образом, чтобы регулировать биосинтез липстатина микроорганизмом, причем для регулирования вязкости ферментационного бульона вводят эмульгатор.

Предпочтительное количество масла, загружаемого в ферментационный бульон, составляет не более 5 мас.%. Применение предложенного количества масла приводит к увеличению количества масляных остатков в конце процесса, что может быть неблагоприятным для последующей обработки. Помимо этого, в описанном способе среди основных параметров культивирования ключевым фактором была скорость перемешивания и предпочтительно при культивировании ее повышали для того, чтобы компенсировать сниженный уровень кислорода.

Задача настоящего изобретения, таким образом, состоит в создании улучшенного способа получения липстатина с выходом, позволяющим приемлемое выделение. Другая задача состоит в обеспечении высокого выхода липстатина.

В ходе обширных исследований, которые привели к созданию настоящего изобретения, авторы настоящего изобретения провели эксперименты с химическим синтезом и способами ферментации, что позволило им в результате обнаружить способ ферментации, который позволяет решить вышеописанную задачу. Указанный способ включает стадии способа получения липстатина, включая стадии создания среды, содержащей не менее 0,3 мас.% линолевой кислоты, или ее эфиров, или солей и более 1 мас.% масла, инокуляции среды затравочной культурой, содержащей микроорганизм, продуцирующий липстатин, с последующим культивированием, и, возможно, выделения липстатина. В данном способе согласно настоящему изобретению стадию основного культивирования, т.е. подходящую стадию ферментации, направленную на получение липстатина, выполняют в среде, включающей линолевую кислоту, или ее эфиры, или соли и масло в определенном количестве.

Про линолевую кислоту, как и про некоторые другие ненасыщенные жирные кислоты, известно, что она проявляет высокую токсичность по отношению к штамму-продуценту. Этот эффект обуславливается вызываемым штаммом-продуцентом эпоксилированием двойной связи линолевой кислоты ферментами, такими как монокигеназа P450, которые превращают двойную связь в высокотоксичный эпоксид. Сообщается, что токсичные уровни линолевой кислоты для обычно применяемого штамма-продуцента *Streptomyces toxytricini* составляют от 0,23 до 0,3 мас.%.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что, несмотря на этот известный эффект, можно получить более высокий выход липстатина путем создания среды для стадии основного культивирования, включающей количества линолевой кислоты, находящиеся в диапазоне, который предположительно является токсичным для штаммов-продуцентов *Streptomyces toxytricini* или *Streptomyces virginiae*, т.е. более 0,3 мас.% линолевой кислоты и по меньшей мере 1 мас.% масла, которое даже может содержать дополнительные количества линолевой кислоты.

В данном способе согласно изобретению стадию основного культивирования, т.е. соответствующую стадию культивирования, направленную на получение липстатина, могут выполнять в условиях ограниченной поставки кислорода, т.е. в микроаэрофильных условиях, без необходимости увеличивать скорость перемешивания для поддержания уровня растворенного кислорода более 10%.

Не ограничиваясь конкретной теорией, в настоящее время полагают, что одновременное применение масла и линолевой кислоты дает комбинированный эффект, который в результате приводит к снижению токсичности линолевой кислоты в отношении штамма, применяющегося для получения липстатина. Это позволяет проводить основную стадию культивирования в присутствии таких количеств линолевой кислоты, которые иначе были бы токсичными. Предшественник липстатина - линолевая кислота, в свою очередь, по крайней мере, частично метаболизируется штаммом-продуцентом с образованием липстатина, что приводит к более высокому выходу данного ингибитора липаз.

Согласно воплощению настоящего изобретения предложен способ получения липстатина. Данный способ включает стадии (i) создания среды, содержащей не менее 0,3 мас.% линолевой кислоты, или ее эфира(ов), или соли(ей) и более 1 мас.% масла; (ii) добавления затравочной культуры, включающей микроорганизм, продуцирующий липстатин; (iii) культивирования и (iv) возможно, выделения липстатина.

Важно понимать, что способ согласно настоящему изобретению можно выполнять в любом типе сосуда для ферментации, например в колбе или ферментере.

Среда может представлять собой любую среду, подходящую для стимулирования роста микроорганизмов. Среда может представлять собой синтетическую среду, т.е. содержащую только определенные химические вещества, или комплексную среду, т.е. среду, содержащую по меньшей мере один ингредиент неопределенного химического состава, такой как дрожжевой экстракт или пептон. При использовании здесь выражение "химически определенная среда" обозначает среду, которая, по существу, не содержит неидентифицируемых источников азота или углерода, таких как животный или растительный белок или композиции гидролизата белков, или комплексных источников углерода, таких как, например, меласса или жидкий кукурузный экстракт, но в которой источники азота представляют собой строго определенные неорганические или органические соединения, такие как аммиак или аминокислоты, а источник углерода представляет собой строго определенный сахар, такой как глюкоза. Помимо этого, такая синтетическая среда содержит минеральные компоненты, такие как соли, например сульфаты, ацетаты, фосфаты, и хлориды щелочных щелочно-земельных металлов, витамины и питательные микроэлементы. Здесь приведены примеры химически определенной среды для целей настоящего изобретения. Важно понимать, что эти среды являются лишь примерами. Специалист в области техники будет способен создать другие среды, позволяющие культивировать рекомбинантные молочнокислые бактерии в вышеописанных условиях культивирования.

Среда включает подходящий источник углерода и подходящий источник азота, снабжающий микроорганизм соединениями, содержащими углерод и азот, таким образом, что микроорганизм может использовать/конвертировать эти соединения для роста/развития/размножения и продукции вторичных метаболитов, представляющих собой метаболические соединения, не важные для нормального роста, развития и размножения указанного микроорганизма.

В качестве источников азота могут выступать сахара или углеводы любого типа, такие как, например, глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтоза, меласса, крахмал и целлюлоза. Альтернативой источника углерода являются масла и жиры, такие как, например, масло соевых бобов, подсолнечное масло, масло земляного ореха и кокосовое масло, или жирные кислоты, такие как, например, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и линолевая кислота, или спирты, такие как, например, глицерин или этиловый спирт, и/или органические кислоты, такие как, например, уксусная кислота. Эти вещества можно использовать по отдельности или в виде смеси.

В качестве источника азота рассматривают любое(ые) органическое(ие) азотсодержащее(ие) вещество(а), такое как пептоны, дрожжевой экстракт, мясной экстракт, экстракт солода, жидкий кукурузный экстракт, мука из соевых бобов и мочевины, или неорганические соединения, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония. Источники азота можно использовать индивидуально или в виде смеси. Источники азота также можно добавлять в форме, которая делает их подходящими для контроля pH в реакционном сосуде.

Концентрации источников углерода и источников азота зависят от типа микроорганизма и выбранных условий культивирования. Источник азота и/или источник углерода в культуре поддерживают на заранее выбранном уровне концентрации, составляющем по меньшей мере около 0,5 г/л, путем контролируемой подачи соответствующего(их) соединения(ий) способом периодической подпитки или путем подачи раствора в ходе непрерывного процесса культивирования. Концентрация углерода и, независимо

от него, источника азота в культивационной среде может предпочтительно составлять по меньшей мере 5 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или 100 г/л.

Культуральная среда может также содержать источник фосфора, например фосфорную кислоту, калия дигидрофосфат, дикалия гидрофосфат, или соответствующие натрийсодержащие соли, и/или соли металлов, такие как, например, сульфат магния или сульфат железа, которые необходимы для роста. В дополнение к вышеуказанным веществам также можно использовать важные для роста вещества, такие как аминокислоты или витамины. В культуральную среду также можно добавлять подходящие предшественники, в частности, для продукции вторичных метаболитов.

Вышеуказанные вещества могут добавлять в культуру в виде разовой загрузки или их могут добавлять подходящим образом в течение культивирования. Среда может включать другие компоненты, такие как витамины, эмульгаторы или антивспениватели. Помимо этого, вышеуказанные соединения могут присутствовать в среде в соответствующих требуемых концентрациях. Описания культуральной среды для различных микроорганизмов можно найти в справочнике "Руководство по методам общей бактериологии" ("Manual of Methods for General Bacteriology" - American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981) или для актиномицетов или *Streptomyces* - в руководстве "Практическая генетика *Streptomyces*" ("Practical *Streptomyces* genetics" Kieser, T., Bibb, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000, John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom), приведенном здесь в качестве ссылки.

Количество/загрузка источника углерода, источника азота или любых других подходящих составляющих среды можно контролировать путем подсоединения или связывания подачи с любым сенсорным устройством, способным определять условия в биореакторе, такие как pH или концентрация вторичного метаболита. Таким образом, подача, например, глюкозы или предшественника липстатина активируется средствами, контролирующими автоматическое добавление указанных соединений. Эти средства можно также использовать в непрерывном процессе.

Для того чтобы контролировать уровень pH в культуре, целесообразно использовать основные соединения, такие как гидроксид натрия, гидроксид калия, аммиак, водный раствор аммиака, или кислые соединения, такие как фосфорная кислота или серная кислота. Для того чтобы контролировать образование пены, могут использовать антивспениватели, такие как, например, полиглицолевые эфиры жирной кислоты. Для того чтобы поддерживать аэробные условия, если это желательно, в культуру вводят кислород или газовые смеси, содержащие кислород, такие как, например, воздух. Температура культуры составляет, в норме, от 20 до 40°C, предпочтительно от 28 до 32°C. Культивирование обычно продолжают до того момента, пока не образуется максимальное количество желаемого продукта, которое может достигаться за период времени от примерно 10 до примерно 200 ч.

Затравка предварительной культуры может содержать, по существу, те же составляющие, что и среда. В некоторых случаях, однако, может быть желательным, чтобы в основной культуре начиналась продукция или сверхпродукция вторичного метаболита, которая представляет собой стрессовую ситуацию для микроорганизма и, следовательно, отрицательно влияет на жизненно-важные функции. В таком случае композиция среды основной и затравочной культуры может быть разной.

Микроорганизм, продуцирующий липстатин, может представлять собой любой микроорганизм, способный к продукции указанного вещества, включая также генетически модифицированные микроорганизмы. Примером микроорганизма, продуцирующего липстатин, является *Streptomyces toxytricini* (Weibel E. et al., J. Antibiot. (1987), p. 1081). Однако существуют другие стрептомицеты и актиномицеты, способные продуцировать это вещество.

В предпочтительном воплощении штаммы-продуценты включают *Streptomyces toxytricini* CBS 314.55, CBS 566.68, ATCC 19813, ATCC 19928 и *Streptomyces virginiae* CBS 314.55, которые были получены либо Американской коллекцией типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC; USA), либо Центральным бюро грибковых культур (Centraalbureau for Schimmelcultures, CBS; Netherlands).

Культивирование подразумевает любой вид культивирования микроорганизма с использованием общеизвестных способов, включая хемостат, периодическое культивирование, культивирование с подпиткой и т.д., например, подходящие условия, благоприятствующие росту и/или продукции вторичного метаболита.

Соответствующие способы культивирования и очистки вторичных метаболитов, таких как липстатин, из ферментационной среды известны специалисту. Экстракцию можно выполнять, например, в водном растворе с подходящими органическими растворителями, что описано, например, в EP 1028115, включенном сюда путем ссылки.

Способы определения липстатина или его производных известны из уровня техники. Анализ можно проводить, например, путем обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием подходящей колонки и подходящего режима работы (Interstil C-18, мобильная фаза:ацетнонитрил:Н₃РO₄, детекция 200 нм).

Среда содержит более 0,3 мас.% линолевой кислоты и по меньшей мере 1 мас.% масла. Масло может представлять собой любое масло синтетического или натурального происхождения или их смесь, композиции и способ получения которых известны специалистам. Примерами подходящих масел явля-

ются соевое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло, льняное масло, рапсовое масло и масло семян кукурузы.

Предпочтительно в состав включают более 0,3 мас.% и не более 10 мас.% линолевой кислоты. Вне зависимости от количества линолевой кислоты количество масла может варьировать. Предпочтительно в состав включают более 1 и не более 5 мас.% масла.

Согласно предпочтительному воплощению настоящего изобретения источником углерода является сахар, выбранный из группы, состоящей из глюкозы, фруктозы и глицерина. Предпочтительно в качестве источника глюкозы используют глицерин. Концентрация глицерина в культуральной среде составляет предпочтительно по меньшей мере 5 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 или 100 г/л.

Согласно еще одному воплощению настоящего изобретения источником азота является дрожжевой экстракт или пептон. Предпочтительно в качестве источника азота используют дрожжевой экстракт. Концентрация дрожжевого экстракта в культуральной среде составляет по меньшей мере 1 г/л, более предпочтительно по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 г/л.

Согласно еще одному воплощению микроорганизмом, продуцирующим липстатин, является *Streptomyces toxytricini*. Подходящие композиции среды и условия роста для указанного штамма можно найти, например, в руководстве "Практическая генетика *Streptomyces*".

Согласно предпочтительному воплощению сама затравочная культура может включать по меньшей мере 0,2 мас.% линолевой кислоты, которая, как неожиданно было обнаружено авторами настоящего изобретения, оказывает стимулирующий эффект на количество липстатина, получаемое в ходе основного культивирования. Предпочтительно в затравочной культуре используется количество линолевой кислоты, составляющее по меньшей мере 0,25, предпочтительно 0,3; 0,35; 0,4; 0,45 или 0,5 мас.%.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что стадию основного культивирования можно также выполнять в анаэробных условиях с получением даже больших количеств липстатина. Это является неожиданным открытием вследствие того факта, что *Streptomyces toxytricini* и другие продуцирующие липстатин актиномицеты являются строго аэробными микроорганизмами, требующими для роста минимального количества кислорода. Согласно еще одному предпочтительному воплощению стадию культивирования выполняют в анаэробных условиях.

Согласно еще одному воплощению настоящего изобретения добавляют лейцин. Добавление данного соединения в качестве предшественника биосинтеза липстатина улучшает выход, поскольку продукция примесей, таких как метионинлипстатин, снижается. Предпочтительно в состав включают более 10^{-4} мас.% и не более 2,0 мас.% лейцина. Было обнаружено, что особенно предпочтительным является добавление лейцина в ходе подпитки со скоростью от 10^{-4} до 10^{-2} мас.%/ч. Следует понимать, что лейцин, как и любое другое подаваемое соединение, может быть представлен в чистом виде или, альтернативно, разбавлен, например, водой.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что добавление источника азота в виде органической или неорганической соли определенного, т.е. известного, состава имеет благоприятный эффект на выход. Вне связи с какой-либо теорией предполагается, что так называемые комплексные соединения, такие как пептон или дрожжевой экстракт, содержат ингредиенты, в определенной степени ингибирующие биосинтез липстатина. Примером органической или неорганической соли определенного состава является соль аммония, такая как сульфат аммония, которая, как было установлено, является особенно предпочтительной, поскольку, с одной стороны, увеличиваются выходы липстатина и, с другой стороны, сульфат аммония можно использовать, чтобы контролировать pH в реакционном сосуде. Наилучших результатов можно добиться при добавлении лейцина, а также органической или неорганической соли определенного состава.

Этот факт позволяет далее предполагать, что в целом добавления любого сложного вещества (любого неизвестного состава) следует избегать, поскольку согласно еще одному предпочтительному воплощению ни один из компонентов, используемых в настоящем способе, не имеет сложного, т.е. неопределенного, состава. Примеры подобных сред такого известного состава известны специалисту.

Согласно одному из воплощений настоящего изобретения липстатин можно превращать в его производное способом, известным из уровня техники. Подходящим производным является, например, тетрагидролипстатин. Альтернативно, любая фармацевтически приемлемая или приемлемая с точки зрения питания соль липстатина, тетрагидролипстатина или другого производного липстатина охватывается термином "его производное". Предпочтительно производное липстатина представляет собой тетрагидролипстатин.

Согласно одному из воплощений настоящего изобретения указанное масло представляет собой растительное масло, выбранное из группы, состоящей из соевого масла, пальмового масла, подсолнечного масла, льняного масла, рапсового масла и масла семян кукурузы или их смесь. Предпочтительно используют соевые бобы.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, не ограничивая его.

Примеры

Пример 1.

а) Способ культивирования затравочной культуры.

Состав среды для затравочной культуры был следующим:

Мука соевых бобов	10 г
Глицерин	20 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Водопроводная вода	1 л

Уровень pH довели до 7 с помощью 10% NaOH; 5 мл этой среды заполняли в пробирку на 50 мл, закрывали пленочной пробкой и стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. Стерилизованную среду для инокулята инокулировали суспензией спор *Streptomyces toxytricini* и инкубировали при 28°C в течение 20-30 ч в аэробных условиях.

б) Способ основной ферментации.

Приблизительно 10 об.% вышеописанной затравочной культуры использовали для инокуляции пробирки на 50 мл, которая содержала 5 мл ферментационной среды.

Состав ферментационной среды был следующим:

Мука соевых бобов	32 г
Глицерин	20 г
Лецитин	14,0 г
CaCO ₃	2,0 г
MES	2 г
Соевое масло	10 г
Линолевая кислота	30 г
Водопроводная вода	1 л

pH ферментационной среды перед стерилизацией доводили до 7,4 с помощью 10% NaOH. Стерилизацию осуществляли при 121°C в течение 20 мин. Ферментацию проводили при 28°C в течение 6-7 дней в аэробных условиях.

После ферментации в течение 144 ч концентрация липстатина составила 417±55 мг/л.

Пример 2.

Повторили пример 1 с тем исключением, что в состав среды для затравочной культуры добавили 2 г линолевой кислоты.

После ферментации в течение 144 ч концентрация липстатина составила 556±81 мг/л.

Пример 3.

а) Способ культивирования затравочной культуры.

Воспроизвели способ культивирования затравочной культуры согласно примеру 1 с тем исключением, что среду для инокулята инокулировали суспензией спор *Streptomyces virginiae*.

б) Способ основной ферментации.

Примерно 10 мас.% вышеописанной затравочной культуры использовали для инокуляции 40 мл ферментационной среды, дозированной в колбу Эрленмейера объемом 500 мл.

Состав ферментационной среды был следующим:

Мука соевых бобов	40 г	40 г	40 г
Глицерин	20 г	20 г	20 г
Лецитин	14,0 г	14,0 г	14,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г	5,0 г	5,0 г
Соевое масло	/	10 г	10 г
Линолевая кислота	20 г	20 г	/
Водопроводная вода	1 л	1 л	1 л
Титр липстатина спустя 6 дней ферментации	5 мг/мл	67 мг/л	34 мг/л

pH ферментационной среды перед стерилизацией доводили до 7,2 10% NaOH. Стерилизацию осуществляли при 121°C в течение 20 мин. Ферментацию осуществляли при 28°C в течение 6 дней в аэробных условиях.

Пример 4.

Производство липстатина в биореакторе на 150 л.

а) Способ культивирования затравочной культуры.

Состав среды для затравочной культуры был следующим:

Мука соевых бобов	10 г
Глицерин	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Антивспениватель	10 мл
Водопроводная вода	1 л

Среду для затравочной культуры инокулировали 150 мл суспензии спор. Скорость мешалки установили на 250 об/мин, а скорость аэрации - 15 л/мин. В течение от 22 до 30 ч объем осажденных клеток составил более 12%.

б) Способ основной ферментации.

Примерно 10 л этой затравочной культуры использовали для инокуляции ферментера с объемом сосуда 150 л, содержащего 90 л среды для продукции, содержащей:

Мука соевых бобов	30 г
Глицерин	20 г
Лецитин	14,0 г
CaCO ₃	2,0 г
NaCl	0,7 г
Na ₂ SO ₄	2 г
KH ₂ PO ₄	0,1 г
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,33 г
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 г
Соевое масло	10 г
Линолевая кислота	10 г
Антивспениватель	0,5 мл
Водопроводная вода	1 л

Перед стерилизацией pH доводили до 7,0 10% NaOH, после чего проводили стерилизацию в течение 30 мин при 121°C.

Температуру ферментации установили на 27°C, скорость мешалки установили на 350 об/мин, скорость аэрации составляла 100 л/мин; pH контролировали добавлением 10% NaOH и 30% H₂SO₄ и поддерживали между 7,1 и 6,8. Минимальную концентрацию растворенного кислорода установили на уровне 30% и после достижения этого уровня скорость мешалки постепенно повышали до максимальной скорости 450 об/мин.

Спустя 20 ч после инокуляции начали подпитку линолевой кислотой. Скорость подпитки устанавливали таким образом, чтобы уровень линолевой кислоты был слегка повышен. Спустя 70-100 ч после инокуляции концентрация растворенного кислорода упала до 0%, но неожиданным образом продукция липстатина продолжилась с неизменной скоростью. Помимо этого, при ферментации уровень линолевой кислоты составлял более 0,3%, что было ранее известно как токсический уровень, но такая высокая концентрация не оказывала какого-либо влияния на продукцию липстатина. К концу ферментации (209 ч после инокуляции) титр липстатина составил 914 мг/мл.

Таблица 2

Титр липстатина при ферментации
в биореакторе на 150 л

Часы после инокуляции	Титр липстатина (мг/л)
41	187
65	274
89	528
113	611
137	774
161	724
185	870
209	914

Пример 5.

Способ культивирования затравочной культуры и получение среды для способа основной ферментации, описанные в примере 4, повторили с тем исключением, что среда для способа основной ферментации содержала 10 г глицерина, а не 20 г глицерина, как в примере 4.

Температуру ферментации устанавливали на уровне 27°C, скорость мешалки ограничили значением 330 об/мин, скорость аэрации составляла до 50 л/мин, pH контролировали, добавляя 10% NaOH и 30% H₂SO₄ и поддерживали его на уровне между 7,1 и 6,8. В течение 24 ч концентрация растворенного кислорода упала до 1%. После достижения этого уровня скорость мешалки регулировали таким образом, чтобы поддерживать концентрацию кислорода на уровне примерно 1%. Подпитку линолевой кислотой начали спустя 20 ч после инокуляции. Скорость подпитки контролировали так же, как в примере 4. К концу ферментации (160 ч после инокуляции) титр липстатина составил 1500 мг/л.

Таблица 3

Титр липстатина и концентрация линолевой кислоты
при ферментации в биореакторе на 150 л

Часы после инокуляции	Титр липстатина (мг/л)	Концентрация линолевой кислоты (г/л)
0	p.m.z.	1,3
17	44	0,4
41	289	0,9
67	674	0,9
90	808	1,4
113	1092	1,6
137	1386	2
161	1476	2,4
185	1575	3

Пример 6.

После завершения способа ферментации ферментационный бульон подкисляли серной кислотой до значения pH 1,6±0,1. Мицелий отделяли и 2 кг сухого остатка, содержащего 9,2 г/кг липстатина, экстрагировали 10 л ацетонтрила. Растворитель отделяли и содержащее липстатин маслянистое вещество концентрировали путем выпаривания под вакуумом при 40°C. Получили 74 г маслянистого вещества, содержащего 12,8 г липстатина.

37 г полученного маслянистого вещества, содержащего 6,4 г липстатина, очищали на колонке с силикагелем (размер частиц 40-63 мкм) с мобильной фазой трет-бутилметилэфир:гептан (отношение 2:3). После выпаривания мобильной фазы получили 5,03 г 93% липстатина (определено с помощью ВЭЖХ).

Пример 7.

Подпитка линолевой кислотой и сульфатом аммония.

Продукция липстатина в биореакторе на 150 л.

В биореакторе с рабочим объемом 30 л приготовили среду для затравочной культуры следующего состава:

Мука соевых бобов	350 г
Глицерин	350 г
Дрожжевой экстракт	175 г
Линолевая кислота	70 мл
Антивспениватель	35 мл
Водопроводная вода	до 35 л

pH доводили до 6,5 30% H_2SO_4 . Стерилизацию выполняли в течение 20 мин при 121°C и затем сосуд охлаждали до 27°C. Среду затравочной культуры инокулировали 150 мл суспензии спор. Мешалку устанавливали на 200 об/мин и скорость аэрации составляла 10 л/мин. В течение 22-30 ч объем осажденных клеток достигал более 12%.

Объем 10 л этой затравочной культуры использовали для инокуляции ферментера с объемом сосуда 150 л, содержащего 90 л среды для продуцирования, содержащей:

Мука соевых бобов	4 кг
Глицерин	1 кг
Лецитин	1,4 кг
Антивспениватель	50 мл
$CaCO_3$	200 г
Соевое масло	1000 г
Линолевая кислота	200 г
$FeSO_4$	8 г
$ZnSO_4$	4 г
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	12 г
$MnSO_4 \times 7 H_2O$	12 г

Перед стерилизацией pH доводили до 6,5 30% H_2SO_4 и поддерживали на уровне от 7,1 до 6,8. В течение 24 ч концентрация растворенного кислорода упала до 1%. После достижения указанного уровня скорость мешалки устанавливали таким образом, чтобы поддерживать концентрацию кислорода на уровне примерно 1%. Спустя 20 ч после инокуляции начинали загрузку линолевой кислоты и 30% раствора сульфата аммония. Скорость загрузки линолевой кислоты поддерживали на том же уровне, что в примере 5. Скорость загрузки 30% раствора сульфата аммония до конца ферментации составляла 12 г/ч. К концу ферментации (130 ч после инокуляции) титр липстатина составлял 1571 мг/л.

В качестве источника азота использовали раствор аммония или аммониевую соль. Постоянный источник легко метаболизируемого азота снизил скорость деградации аминокислот. Уровни pH контролировали скоростью добавления аммиака в комбинации с параметрами процесса ферментации.

Титр липстатина и концентрация линолевой кислоты при ферментации в биореакторе на 150 л.

Часы после инокуляции	Титр липстатина (мг/л)
18	198
40	586
59	830
76	910
80	994
102	1240
130	1571

Пример 8.

Загрузка линолевой кислоты и лейцина.

Продукция липстатина в биореакторе на 150 л.

В биореакторе с рабочим объемом 30 л готовили среду для затравочной культуры:

Мука соевых бобов	350 г
Глицерин	350 г
Дрожжевой экстракт	175 г
Линолевая кислота	70 мл
Антивспениватель	35 мл
Водопроводная вода	до 35 л

pH доводили до 7 10% NaOH. Стерилизацию выполняли в течение 20 мин при 121°C и затем сосуд охлаждали до 27°C. Среду затравочной культуры инокулировали 150 мл суспензии спор. Скорость мешалки устанавливали на 200 об/мин и скорость аэрирования составляла 10 л/мин. В течение 22-30 ч объем осажденных клеток достигал более 12%.

Объем 10 л этой затравочной культуры использовали для инокуляции ферментера с объемом сосуда 150 л, содержащего 90 л среды продуцента, содержащей:

Мука соевых бобов	4 кг
Глицерин	1 кг
Лецитин	1,4 кг
Антипенообразователь	50 мл
CaCO ₃	200 мг
Соевое масло	100 г
Линолевая кислота	200 г
FeSO ₄	8 г
ZnSO ₄	4 г
MnCl ₂ ×4 H ₂ O	12 г
MgSO ₄ ×7H ₂ O	12 мг

Перед стерилизацией pH доводили до 6,5 10% NaOH и затем стерилизовали в течение 30 мин при 121°C. Температуру ферментации устанавливали на 27°C, скорость мешалки ограничивали 330 об/мин, скорость аэрации составляла до 50 л/мин, pH контролировали, добавляя 10% NaOH и 30% H₂SO₄ и поддерживая на уровне от 7,1 до 6,8. В течение 24 ч концентрация растворенного кислорода понизилась до 1%. После достижения этого уровня скорость мешалки устанавливали таким образом, чтобы поддерживать концентрацию кислорода на уровне примерно 1%. Спустя 20 ч после инокуляции начинали подачу линолевой кислоты и 10% раствора лейцина. Скорость подачи линолевой кислоты поддерживали такой же, как в примере 5. Скорость подачи 10% раствора лейцина к концу ферментации составляла до 25 г/ч. К концу ферментации (160 ч после инокуляции) титр липстатина составил 3249 мг/л. Добавление липстатина при ферментации имело значительный эффект в отношении уменьшения синтеза одной из важнейших примесей, связанных к липстатином, - метионинлипстатина.

Титр липстатина и концентрация линолевой кислоты при ферментации в биореакторе на 150 л

Часы после инокуляции	Титр липстатина (мг/л)
22	212
44	795
59	1187
80	1877
98	2245
118	2782
140	2928
164	3249

Пример 9.

Загрузка линолевой кислоты, лейцина и сульфата аммония.

Продукция липстатина в биореакторе на 150 л.

В биореакторе на 150 л с рабочим объемом 30 л изготовили среду затравочной культуры следующего состава:

Мука соевых бобов	350 г
Глицерин	350 г
Дрожжевой экстракт	175 г
Линолевая кислота	70 мл
Антивспениватель	35 мл
Водопроводная вода	до 35 л

pH доводили до 6,5 30% H₂SO₄. Стерилизацию выполняли в течение 20 мин при 121°C и затем сосуд охлаждали до 27°C.

Среду затравочной культуры инокулировали 150 мл суспензии спор. Скорость мешалки устанавливали на 200 об/мин, а скорость аэрации составляла 10 л/мин. В течение 22-30 ч объем осажденных клеток достигал более 12%.

Объем 10 л этой затравочной культуры использовали для инокуляции ферментера с объемом сосуда 150 л, содержащего 90 л среды продуцента, содержащей:

Мука соевых бобов	4 кг
Глицерин	1 кг
Лецитин	1,4 кг
Антипенообразователь	50 мл
CaCO ₃	200 мг
Соевое масло	1000 г
Линолевая кислота	200 г
FeSO ₄	8 г
ZnSO ₄	4 г
MnCl ₂ ×4 H ₂ O	12 г
MgSO ₄ ×7H ₂ O	12 мг

Перед стерилизацией pH доводили до 6,5 30% H₂SO₄ с последующей стерилизацией в течение 30 мин при 121°C. Температуру ферментации устанавливали на 27°C, скорость мешалки ограничивали 330 об/мин, скорость аэрации составляла до 50 л/мин, pH контролировали, добавляя 25% NH₃ и 30% H₂SO₄ и поддерживая его на уровне от 7,1 до 6,8. В течение 24 ч концентрация растворенного кислорода понизилась до 1%. После достижения этого уровня скорость мешалки регулировали таким образом, чтобы поддерживать концентрацию кислорода на уровне примерно 1%. После достижения этого уровня скорость мешалки регулировали так, чтобы снизить концентрацию кислорода до примерно 1%. Спустя 20 ч после инокуляции начинали подачу линолевой кислоты и питательного раствора азота (10% раствора лейцина и 10% сульфата аммония). Скорость подачи линолевой кислоты контролировали, как в примере 5. Скорость подачи питательного раствора азота к концу ферментации составляла 25 г/ч. К концу ферментации (136 ч после инокуляции) титр липстатина составил 4773 мг/л.

Титр липстатина и концентрация линолевой кислоты
в биореакторе на 150 л

Часы после инокуляции	Титр липстатина (мг/л)
16	74
40	1210
65	2012
89	2581
93	2698
117	3701
136	4773

Пример 10. Экстракция липстатина.

После завершения способа ферментации ферментационный бульон объемом 2500 л (содержащий 1,9 г/л липстатина) подкисляли серной кислотой до значения pH $2,5 \pm 0,5$. Ферментационный бульон загружали в реакционный сосуд и смешивали с 1300 л этилацетата с предыдущих экстракций (содержащего 0,7 г липстатина) и 700 л свежего этилацетата.

1-я экстракция. Смесь загружали в непрерывный экстрактор, работающий со скоростью загрузки 2 м³/ч. В ходе экстракции в виде противотока дополнительно добавляли еще 715 л свежеприготовленного этилацетата. После завершения экстракции получали 1827 л этилацетата, содержащего 4,0 кг липстатина, и 3450 л экстрагированного бульона, содержащего 1,9 кг липстатина.

2-я экстракция. 3450 л экстрагированного бульона с 1-й экстракции повторно экстрагировали 1000 л свежеприготовленного этилацетата. После завершения экстракции получали 1383 л экстракта этилацетата, содержащего 1,3 кг липстатина, и 3040 л экстрагированного бульона, содержащего 0,7 кг липстатина.

Экстракты этилацетата объединяли с получением 5, 3 кг липстатина в этилацетате и далее концентрировали. Концентрат дважды повторно экстрагировали ацетонитрилом (объемное отношение концентрата к ацетонитрилу составляло 1:3) и отделяли нерастворившиеся примеси. Ацетонитрил далее концентрировали с получением неочищенного липстатина.

Пример 11.

i) Хроматографическая очистка липстатина.

Неочищенный липстатин подвергали хроматографической очистке с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы и смеси трет-бутил метиловый эфир:гептан в качестве мобильной фазы.

Условия хроматографии.

Колонка: 10×150 см, заполнена 4000 г силикагеля 40-63 мкм.

Мобильная фаза: трет-бутил метиловый эфир:гептан (объемное отношение 40:60).

Загрузка: смесь силикагеля и неочищенного липстатина (массовое соотношение 10:1).

Скорость течения: 50 мл/мин.

Фракции, содержащие липстатин, собирали и получали липстатин с чистотой 92%.

ii) Хроматографическая очистка липстатина.

Неочищенный липстатин подвергали хроматографической очистке с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы и смеси трет-бутил метиловый эфир:гептан в качестве мобильной фазы.

Условия хроматографии.

Колонка: 8500 г силикагеля 40-63 мкм.

Мобильная фаза: трет-бутил метиловый эфир:гептан (объемное отношение 40:60).

Загрузка: 580 мл неочищенного липстатина (массовое соотношение 10:1).

Скорость течения: 30 мл/мин.

Фракции, содержащие липстатин, собирали и получали 520 г липстатина с чистотой 82%.

iii) Хроматографическая очистка липстатина.

Неочищенный липстатин подвергали хроматографической очистке с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы и смеси трет-бутил метиловый эфир:гептан в качестве мобильной фазы.

Условия хроматографии.

Колонка: 8500 г силикагеля 40-63 мкм.

Мобильная фаза: трет-бутил метиловый эфир:гептан (объемное отношение 40:60).

Загрузка: 1700 мл неочищенного липстатина (чистота согласно ВЭЖХ 44,8%).

Скорость течения: 30 мл/мин.

Фракции, содержащие липстатин, собирали и получали 630 г липстатина с чистотой 74%.

Пример 12. Получение орлистата гидрированием.

Орлистат можно синтезировать путем гидрирования липстатина, полученного на стадии очистки.

Липстатин (35 г), этанол (0,8 л) и 3,3 г 5% Pd/C загружали в реактор и перемешивали несколько часов при температуре от 10 до 40°C. Затем смесь отфильтровывали и чистый раствор загружали в сосуд автоклава и добавляли еще 3,3 г палладия на активированном угле. Автоклав закрывали, создавали инертную атмосферу азота и заполняли водородом до 3,5 бар. Смесь перемешивали при 15-25°C, пока не прекращалось поглощение водорода. Затем водород выпускали и автоклав вентилировали азотом. Катализатор отфильтровывали и растворитель выпаривали. Получали 34,7 г слегка желтоватого масла, который со временем превращался в воскоподобную жидкость.

Пример 13. Кристаллизация орлистата.

Орлистат, полученный гидрированием (15 кг, анализ: 97,6%), в виде смеси форм I и II, как описано в WO 2005/026140, и гептан (60 л) загружали в футерованный стеклом реактор и перемешивали лопастной мешалкой. Суспензию растворяли нагреванием, затем охлаждали до примерно 22°C, осаждали 10 г орлистата формы II, перемешивали при той же температуре в течение 1 ч и охлаждали до 15°C в течение примерно 2 ч. Полученные кристаллы созревали в течение 15 ч и их отфильтровывали подсосыванием. После охлаждения в вакууме получили 14,1 г.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения липстатина, включающий стадии создания среды, содержащей:
 - а) не менее 0,3 мас.% линолевой кислоты или ее эфира(ов) или соли(ей);
 - б) более 1 мас.% масла;инокуляции среды затравочной культурой, включающей микроорганизм, продуцирующий липстатин;
культивирования и, возможно, выделения липстатина.
2. Способ по п.1, где масло выбирают из группы, состоящей из натурального масла, синтетического масла и их смесей.
3. Способ по п.1, где натуральное масло выбирают из группы, состоящей из масла соевых бобов, подсолнечного масла, рапсового масла, пальмового масла, льняного масла и масла семян кукурузы или их смесей.
4. Способ по п.1, где микроорганизм, продуцирующий липстатин, относится к семейству стрептомицетов.
5. Способ по п.4, где микроорганизм, продуцирующий липстатин, представляет собой *Streptomyces toxytricini* или *Streptomyces virginiae*.
6. Способ по п.5, где микроорганизм, продуцирующий липстатин, представляет собой *Streptomyces toxytricini* CBS 566.68.
7. Способ по п.1, где среда включает по меньшей мере 0,2 мас.% линолевой кислоты или ее эфира(ов) или соли(ей).
8. Способ по п.1, где pO_2 поддерживают на уровне от 0 до 10% после того, как первоначальная фаза роста, по существу, закончилась.
9. Способ по любому из пп.1-8, где лейцин и/или источник азота добавляют в виде органической или неорганической соли определенного состава.
10. Способ получения тетрагидролипстатина, включающий получение липстатина согласно любому из пп.1-9 и стадию превращения липстатина в тетрагидролипстатин.

