



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 235 130** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 12 P 17/06, 7/42, 7/62, C 07**
D 309/30, C 12 N 9/99

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000124064/13, 17.02.1999

(24) Дата начала действия патента:
 17.02.1999ii.1-25

(30) Приоритет: 18.02.1998 SI P-9800046

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2002

(46) Дата публикации: 27.08.2004

(56) Ссылки: WO 9720834 A, 12.07.1997. US 4319039 A, 09.03.1997. US 4294846 A, 13.10.1981. WO 9706128 A, 20.02.1997. US 5202029 A, 13.04.1993.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 18.09.2000

(86) Заявка РСТ:
 IB 99/00808 (17.02.1999)

(87) Публикация РСТ:
 WO 99/42601 (26.08.1999)

(98) Адрес для переписки:
 119034, Москва, Пречистенский пер., 14,
 стр.1, 4-й этаж, ГОУЛИНГЗ ИНТЕРНЭШНЛ Инк.,
 пат.пов. В.Н.Дементьеву, рег.№ 001

(72) Изобретатель: ПЛАУМ Златко (SI),
 МИЛИВОЙЕВИЧ Душан (SI), СЕНИЦА Дэвид (SI)

(73) Патентообладатель:
 ЛЕК ФАРМАСЬЮТИКАЛ ЭНД КЭМИКАЛ
 КОМПАНИ Д.Д. (SI)

(74) Патентный поверенный:
 Дементьев Владимир Николаевич

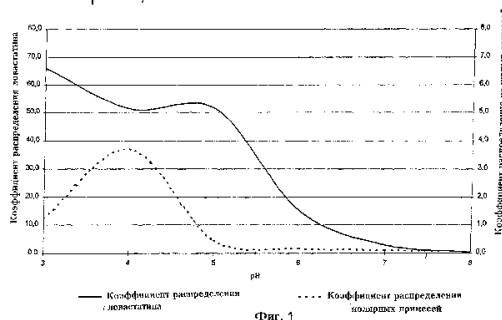
RU
2
2
3
5
1
3
0
C
2

RU
2
2
3
5
1
3
0
C
2

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И СПОСОБ ОЧИСТКИ ИНГИБИТОРА НМГ-СОА-РЕДУКТАЗЫ

(57) Изобретение относится к биотехнологии. Способ выделения и очистки ингибиторов НМГ-СоА-редуктазы включает осветление питательной среды с мицелием, концентрацию осветленного бульона, подкисление концентрата до pH в интервале 4,5-7,5 с последующей экстракцией ингибитора НМГ-СоА-редуктазы этилацетатом, кристаллизацию выделенного ингибитора НМГ-СоА-редуктазы из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя и кристаллизацию ингибитора НМГ-СоА-редуктазы из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворяющегося в воде. Последовательность стадий кристаллизации можно изменять. Сочетание конкретных стадий кристаллизации

применяют для очистки сырого ингибитора НМГ-СоА-редуктазы с получением ингибитора НМГ-СоА-редуктазы, имеющего чистоту выше 99,6%. Изобретение обеспечивает высокую чистоту целевого продукта, составляющую выше 99,6%. 2 н. и 23 з.п. ф-лы, 4 ил.





(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 235 130** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **C 12 P 17/06, 7/42, 7/62, C 07 D 309/30, C 12 N 9/99**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000124064/13, 17.02.1999
 (24) Effective date for property rights:
 17.02.1999с1. 1-25
 (30) Priority: 18.02.1998 SI P-9800046
 (43) Application published: 20.10.2002
 (46) Date of publication: 27.08.2004
 (85) Commencement of national phase: 18.09.2000
 (86) PCT application:
 IB 99/00808 (17.02.1999)
 (87) PCT publication:
 WO 99/42601 (26.08.1999)
 (98) Mail address:
 119034, Moskva, Prechistsenskij per., 14,
 str.1, 4-j ehtazh, GOULINGZ INTERNEhShNL
 Ink., pat.pov. V.N.Dement'evu, reg.№ 001

(72) Inventor: PFLAUM Zlatko (SI),
 MILIVOJEVICh Dushan (SI), SENITsA Dehvid (SI)
 (73) Proprietor:
 LEK FARMAS'JuTIKAL EhND KEhMIKAL
 KOMPANI D.D. (SI)
 (74) Representative:
 Dement'ev Vladimir Nikolaevich

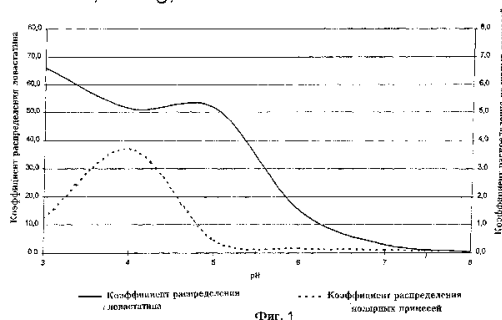
(54) **METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF HMG-COA-REDUCTASE INHIBITOR**

(57) Abstract:
 FIELD: biotechnology, preparative biochemistry.
 SUBSTANCE: invention relates to method for isolation and purification of HMG-CoA-reductase inhibitor that involves clearing nutrient medium with mycelium, concentrating cleared broth, acidification of concentrate to pH in the range 4.5-7.5 followed by extraction of HMG-CoA-reductase inhibitor with ethyl acetate. Crystallization of the isolated HMG-CoA-reductase inhibitor from water-mixing or water-soluble organic solvent and crystallization of HMG-CoA-reductase inhibitor from an organic solvent with limited mixing with water or dissolving in water. The sequence of crystallization stages can be altered. The combination of specific stages is used for

purification of the crude HMG-CoA-reductase inhibitor with purity above 99.6%. Invention provides high purity of the end product that exceeds 99.6%.

EFFECT: improved method for isolation and purification.

25 cl, 4 dwg, 5 ex



RU 2 235 130 C2

RU 2 235 130 C2

Предпосылки создания изобретения.

Ловастатин, правастатин, мевастатин, симвастатин, их производные и аналоги известны как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы и применяются в качестве анти(гипер)холестеринемических агентов. Их получают ферментацией микроорганизмов различных видов, относящихся к роду *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* или *Penicillium*.

Чистота активного ингредиента является важным фактором для получения безопасного и эффективного фармацевтического препарата. Высочайшая возможная чистота продукта особенно важна, если фармацевтический продукт нужно применять в течение более длительного периода, как, например, в случае лечения или предотвращения высокого содержания холестерина в плазме.

Накопление примесей из фармацевтических препаратов более низкой степени чистоты может вызвать в ходе лекарственного лечения множество побочных эффектов.

Известные способы выделения и очистки антихолестеринемических агентов включают различные комбинации методов экстракции, хроматографии, лактонизации и кристаллизации. Чистота конечного продукта, получаемого в результате этих операций, ниже 99.6%. Получение продукта более высокой степени чистоты этими методами возможно, но при этом выход заданного продукта неприемлемо низок для того, чтобы можно было использовать эти методы в больших промышленных масштабах.

Способ выделения, описанный в Международной заявке WO 92/16276, решает задачу получения ингибиторов HMG-CoA-редуктазы с чистотой выше 99.5%, но требуется сложное промышленное оборудование для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Согласно Международной заявке WO 92/16276 сырой ингибитор HMG-CoA-редуктазы с чистотой примерно 85% или выше растворяют в органическом растворителе или в растворе органического растворителя в воде. Затем смесь забуферивают до pH между 2 и 9 и помещают на колонку для ВЭЖХ. После отбора нужной фракции (пика) с ингибитором HMG-CoA-редуктазы часть растворителя удаляют, а затем добавляют воду или же отгоняют две трети смеси растворителей, а ингибитор HMG-CoA-редуктазы кристаллизуется. Достигаемая этим методом конечная чистота продукта действительно составляет по меньшей мере 99.5% при выходе около 90%.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к новому промышленному способу выделения и очистки ингибиторов HMG-CoA-редуктазы с чистотой выше 99.6% и, предпочтительно, выше 99.7% из ферментационного бульона (культуральной среды). Чтобы достичь этой цели, были предприняты обширные исследования по изучению химических соединений, образующихся при брожении, с использованием различных видов микроорганизмов, принадлежащих к роду *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Mucor*, *Amycolatopsis* или *Penicillium*, их химических свойств и их поведения в различных

растворителях при различных pH. Т.е. вышеуказанная цель была достигнута с помощью способа по данному изобретению, который включает следующие стадии:

5 - осветление бульона с мицелием и концентрирование осветленного бульона до меньшего объема;

- подкисление концентрата до значения pH в интервале 4.5-7.5 с последующей экстракцией ингибитора HMG-CoA-редуктазы этилацетатом;

10 - при необходимости, лактонизация; - кристаллизация ингибитора HMG-CoA-редуктазы из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя, и

15 - кристаллизация ингибитора HMG-CoA-редуктазы из органического растворителя, ограниченно смешивающегося водой или ограниченно растворяющегося в ней. Подробное описание изобретения

20 Описание чертежей На фиг.1 показана зависимость от pH коэффициента распределения ингибитора HMG-CoA-редуктазы (ловастатин) и примесей соответственно на стадии экстракции этилацетатом, и

25 на фиг.2, 3 и 4 изображены ВЭЖХ-диаграммы (хроматограммы) образцов ингибитора HMG-CoA-редуктазы после экстракции этилацетатом в виде сырого вещества, после кристаллизации из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя и после

30 дополнительной кристаллизации из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворяющегося в ней соответственно. Так как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы

35 обычно являются как внутри-, так и внеклеточными продуктами, необязательно, но предпочтительно их энергично растворять для перехода из мицелия в ферментационную жидкость. Способ растворения, описанный в

40 Международной заявке WO 97/20834, включает обработку ферментационного бульона щелочным основанием до pH 11.5 и перемешивание в течение трёх часов. Международная заявка WO 97/06128

45 показывает, что растворения можно достигнуть подщелачиванием ферментационного бульона до pH от 10-13 при температуре между 60 и 95°C. Ингибиторы HMG-CoA-редуктазы можно

50 эффективно растворять из мицелия при pH выше 9, но слишком продолжительное воздействие столь жёстких условий вызывает разрыв сложноэфирной связи между гидроксильной группой нафталинового ядра и карбоновой кислотой. Равновесие между

55 ингибиторами HMG-CoA-редуктазы и деацилированными ингибиторами HMG-CoA-редуктазы сдвигается в более жёстких условиях в сторону деацилированных продуктов. Неожиданно авторами настоящего изобретения было обнаружено, что эффективность процесса растворения, проводимого в температурном интервале от

60 10 до 40°C, предпочтительно в интервале от 18 до 40°, например, при комнатной температуре, менее чем в течение часа, предпочтительно менее чем в течение получаса, например в течение примерно 10 минут, при pH между 9.5 и 13, наиболее предпочтительно, между 9.5 и 11.5, равна

эффективности, достигаемой с помощью менее экономичных и более продолжительных по времени способов, осуществляемых при более высоких температурах, описанных в более ранних приведенных выше патентных заявках. Процесс растворения можно проводить также при pH ниже 9.5 и даже ниже 6, но в этом случае требуется применение огромных количеств органических растворителей.

Если осуществляют данный предпочтительный вариант способа растворения ингибитора HMG-CoA-редуктазы, ферментационный бульон последовательно обрабатывают подкисляющим агентом, соответствующей минеральной кислотой, чтобы довести значение pH до 7.5-8.5. Соответствующие минеральные кислоты суть фосфорная, серная и соляная. Ингибиторы HMG-CoA-редуктазы устойчивы в этом интервале pH, и ферментационный бульон также может храниться некоторое время после этой стадии, если это необходимо или желательно.

Мицелий удаляют из ферментационного бульона (культуральной среды) с помощью соответствующих стадий отделения, таких, например, как фильтрование и/или центрифугирование. Фильтрование является предпочтительным, и может применяться как классическая методика фильтрования, так и микро-, ультра- и диафильтрация. Осветлённый бульон (питательная среда) затем концентрируют до меньшего объёма, наиболее предпочтительно в пять-десять раз, с помощью обратного осмоса или других способов уменьшения объёма.

Подкисление и стадия экстракции этилацетатом, описанная ниже, являются важными моментами процесса очистки.

Указанный концентрат подкисляют подкисляющим агентом, соответствующей минеральной кислотой, до pH между 4.5 и 7.5. Можно применять уже упомянутые выше в качестве примеров минеральные кислоты. Затем ингибитор HMG-CoA-редуктазы экстрагируют из указанного концентрата с скорректированным pH этилацетатом. Экстракцию удобно проводить в колонне для противоточной экстракции. Соотношение между коэффициентами распределения ингибиторов HMG-CoA-редуктазы и растворимыми в этилацетате примесями является наибольшим при pH 5.5-7.5 и особенно при pH 6.0-7.0, и часть полярных примесей отделяется уже на этой стадии. Экстракция, проводимая при значениях pH ниже 5.0, особенно ниже 4.0, является более эффективной за счёт более высокого коэффициента распределения ингибиторов HMG-CoA-редуктазы, но она даёт более высокое содержание полярных примесей. Коэффициенты распределения примесей, растворимых в этилацетате, также высоки при таком значении pH, как это показано на фиг.1. Экстракция этилацетатом, проводимая при pH между 4.5 и 7.5, в частности выше 5.0 и в особенности выше 5.5, приводит к более низкому содержанию полярных примесей из-за их низких коэффициентов распределения. Более низкий коэффициент распределения ингибиторов HMG-CoA-редуктазы в процессе экстракции при таком значении pH можно компенсировать большей высотой противоточной

экстракционной колонны.

Если нужно, полученные этилацетатные вытяжки затем концентрируют, и ингибитор HMG-CoA-редуктазы лактонизируют, при необходимости, на этой стадии процесса. При pH между 5.5 и 7.5 основная часть ингибитора HMG-CoA-редуктазы находится в виде свободной кислоты. Следовательно, концентрирование и лактонизацию можно опустить, если ингибитор HMG-CoA-редуктазы не используется в фармацевтическом препарате в виде лактона. Лактонизацию удобно проводить при контактировании ингибитора HMG-CoA-редуктазы с каталитическим количеством минеральной или органической кислоты, более предпочтительно трифторуксусной кислоты (TFA). Ингибитор HMG-CoA-редуктазы, который при необходимости превращают в лактон, можно затем непосредственно кристаллизовать из этилацетата, как будет описано ниже. Или же этилацетат удаляют, обычно упариванием, и получают сырой продукт-ингибитор HMG-CoA-редуктазы, который при необходимости лактонизируют.

Полученный таким образом сырой ингибитор HMG-CoA-редуктазы затем, при необходимости, подвергают адсорбционной хроматографии, предпочтительно с обращённой фазой. Соответственно, в качестве подвижной фазы для адсорбционной хроматографии можно применять ацетонитрил или низшие спирты, такие, например, как метанол, этанол или пропанол, или смесь этих растворителей с водой. Предпочтительно, сырой ингибитор HMG-CoA-редуктазы растворяют в чистом ацетонитриле или смеси ацетонитрил/вода с содержанием ацетонитрила по меньшей мере 30 объёмных % (V/V), и полученный раствор пускают на колонну для адсорбционной хроматографии. Заполнение колонны включает, но не ограничивается, неподвижной фазой на основе октилсилана, диметилсилана, октадецилсилана, цианосилана, сополимера полистирола с дивинилбензолом или полиакрилата. Можно также использовать другие типичные для неподвижной фазы материалы, например диоксид кремния, оксид алюминия и т.п. Адсорбированные соединения элюируют подходящей подвижной фазой, такой, например, как градиент ацетонитрил/вода. Нужную фракцию (пик) ингибитора HMG-CoA-редуктазы собирают и растворитель подвижной фазы отгоняют, при этом ингибитор HMG-CoA-редуктазы кристаллизуется. Чистота кристаллизованных сырых ингибиторов HMG-CoA-редуктазы составляет 80-92% и зависит от профиля (распределения) примесей в ферментационном бульоне. При необходимости адсорбционную хроматографию можно заменить также нормальной хроматографией, флеш-хроматографией, промышленной ВЭЖХ, или экстракцией, или кристаллизацией.

Общая обработка с помощью кристаллизации, которая особенно пригодна по данному изобретению, будет подробнее описана далее. Более конкретно, она включает кристаллизацию ингибитора HMG-CoA-редуктазы из органического растворителя, смешивающегося с водой или

растворимого в воде, и кристаллизацию ингибитора HMG-CoA-редуктазы из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в воде. Порядок обеих кристаллизации может быть также обратным. Само по себе свойство органического растворителя либо смешиваться с водой или растворяться в ней, либо ограниченно смешиваться с водой или ограниченно растворяться в ней известно специалисту в данной области и, например, описано в "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol.A 24, 5th edition (1993), p.437-505. Применительно к данному изобретению термин "смешивающийся с водой или водорастворимый" относится к органическим растворителям, которые практически неограниченно, предпочтительно на 100%, смешиваются с водой или растворяются в ней, а термин "ограниченно смешиваются с водой или ограниченно растворяющийся в ней" включает также не смешивающиеся с водой или не растворимые в воде органические растворители. Кроме того, понятие "кристаллизация" по данному изобретению, в частности, также включает осаждение.

Примеры практически смешивающихся с водой или растворимых в воде органических растворителей включает: низшие алкиловые спирты, например, такие как метанол, этанол, пропанол и изопропиловый спирт, низшие алкилкетоны, например, такие как ацетон, метилэтилкетон, низшие алкиловые эфиры гликоля, такие как метилгликоль, этилгликоль, пропилгликоль и этилдигликоль, и дипольные апротонные растворители, такие как N,N-диметилформамид (DMF), N,N-диметилацетамид (DMAA) и диметилсульфоксид (DMSO), включая смеси этих растворителей. В качестве особенно предпочтительных примеров смешивающихся с водой растворителей следует упомянуть ацетон и низшие алканола. Примеры органических растворителей с ограниченной смешиваемостью с водой или ограниченной растворимостью в ней включают: высшие алканола, такие, например, как бутанол, изобутанол, амиловый спирт, гексанол, 2-этилгексанол, бензиловый спирт и циклогексанол, высшие алкилкетоны, такие как метилбутилкетон, метилизобутилкетон и циклогексанол, сложные эфиры, например, такие как метилацетат, этилацетат, н-пропил (и изопропил-) ацетат, н-бутил (и изобутил-) или т. -бутил-) ацетат и амилоцетат, простые эфиры, например, такие как диэтиловый эфир и диизопропиловый эфир, хлорированные углеводороды, такие, например, как хлористый метилен и хлороформ, ацетонитрил и т.п., включая смеси этих растворителей. Особенно предпочтителен в качестве растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в ней, этилацетат.

Неожиданно было обнаружено, что кристаллизация ингибиторов HMG-CoA-редуктазы из смешивающегося с водой органического растворителя, такого как ацетон или низший алканол, с последующими дополнительными перекристаллизациями из того же растворителя может удалить только минорную часть неполярных и основную часть полярных примесей, а кристаллизация

из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой, например этилацетата, с последующими дополнительными перекристаллизациями из того же растворителя удаляет только основные неполярные примеси. Последнее четко видно из ВЭЖХ-хроматограмм сырого ингибитора HMG-CoA-редуктазы (фиг.2), ингибитора HMG-CoA-редуктазы после кристаллизации из ацетона (фиг.3) и ингибитора HMG-CoA-редуктазы, полученного кристаллизацией из ацетона и затем перекристаллизованного из этилацетона (фиг.4). В соответствии с этим неожиданным фактом последнюю стадию по данному изобретению, включающую комбинированную кристаллизацию из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя и из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в ней, нельзя исключить из процесса получения ингибиторов HMG-CoA-редуктазы высокой степени чистоты.

Комбинированная кристаллизация по данному изобретению может быть осуществлена следующим образом. Сначала кристаллы сырого ингибитора HMG-CoA-редуктазы растворяют в вышеуказанном практически (предпочтительно на 100%) смешивающемся с водой или растворимом в воде органическом растворителе, в частности в ацетоне или низшем спирте, а затем добавляют воду, чтобы вызвать кристаллизацию или осаждение ингибитора HMG-CoA-редуктазы, растворённый в практически смешивающемся с водой или в практически растворимом в воде органическом растворителе, добавляют в воду для кристаллизации или осаждения. Эти операции можно повторять с тем же или другим смешивающимся с водой или растворимым в ней органическим растворителем, если необходимо, например, от одного до четырёх раз в зависимости от чистоты исходного продукта.

Полученные при этом кристаллы затем растворяют в вышеуказанном растворителе, ограниченно смешивающемся с водой или ограниченно растворимом в ней, например этилацетате, до соответствующей концентрации, предпочтительно в интервале от 10 до 35 г/л, наиболее предпочтительно в интервале от 15 до 25 г/л. После удаления от одной трети до трёх четвертей растворителя ингибитор HMG-CoA-редуктазы кристаллизуется. Кристаллизация из этого же самого или другого органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в ней, можно повторить, если требуется, например, от одного до трёх раз, в зависимости от чистоты продукта, полученного кристаллизацией из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя. Перекристаллизованный ингибитор HMG-CoA-редуктазы затем фильтруют и сушат, получая продукт с чистотой по меньшей мере 99.6%.

Как уже указывалось, порядок кристаллизации может быть обратным, т.е. сначала проводят кристаллизацию из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно

растворимого в ней, а затем кристаллизуют из смешивающегося с водой или растворимого в воде ограниченного растворителя. В предпочтительном варианте изобретения осуществляемую сначала кристаллизацию из этилацетата в качестве ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в воде органического растворителя можно проводить непосредственно после стадии экстракции этилацетатом или, при необходимости, после описанной выше стадии лактонизации.

По способу согласно данному изобретению можно достичь чистоты продуктов по меньшей мере 99.6% и даже по меньшей мере 99.7%.

В другом альтернативном варианте изобретения можно осуществлять разные виды перекристаллизации неоднократно и попеременно.

В другом аспекте данного изобретения ранее описанное сочетание стадий кристаллизации смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя и из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в ней, используют в качестве стадий окончательной очистки любого процесса выделения и/или очистки ингибиторов HMG-CoA-редуктазы.

Соответственно, такую стадию окончательной очистки можно применять в случае обычно получаемого сырого ингибитора HMG-CoA-редуктазы. При этом достигается чистота ингибитора HMG-CoA-редуктазы по меньшей мере 99.6% и даже по меньшей мере 99.7%.

Способ по данному изобретению особенно пригоден, когда в качестве ингибитора HMG-CoA-редуктазы применяют ловастатин. Соответственно, в другом аспекте данного изобретения описанный выше процесс применяют для выделения и/или очистки ловастатина.

Практически чистые ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, полученные по способу согласно данному изобретению, например, такие как ловастатин, мевастатин, правастатин и симвастатин, а также их производные и аналоги, можно использовать для получения и/или лечения заболеваний. Полученные ингибиторы и фармацевтические препараты особенно пригодны в качестве лечебных или профилактических средств, используемых для того чтобы уменьшить вероятность (риск) удара, преходящего нарушения мозгового кровообращения, атеросклероза и инфаркта миокарда.

Следующие примеры иллюстрируют способ по данному изобретению, и их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение, сформулированное в Формуле изобретения.

Пример 1

Ферментационный бульон (160 л) с концентрацией ловастатина 1 г/л, полученный брожением *Aspergillus terreus* ATCC 20542, помещают в ёмкость (400 л) и доводят pH до 10 с помощью 1 М водного раствора гидроксида натрия. После 10-минутного интенсивного перемешивания при комнатной температуре pH бульона доводят до 9 с помощью 1 М серной кислоты и биомассу отфильтровывают. Затем фильтрат подкисляют 1 М серной кислоты до pH 6.5. К

5 фильтру добавляют 160 л этилацетата и полученную смесь перемешивают 20 мин. Водную и этилацетатную фазы разделяют с помощью экстракционного центрифугирования. Этилацетатную вытяжку упаривают на роторном испарителе до объема 14 л. Концентрация ловастатина в виде свободной кислоты в этилацетатном концентрате доходит до 10 г/л.

10 Затем этилацетатный концентрат (14 л) помещают в реактор (40 л) и лактонизируют. Лактонизацию инициирует каталитическое количество TFA (ТФК) (0.5 мл ТФК/1л концентрата). Процесс лактонизации длится два часа при 40°C. После лактонизации концентрат промывают дважды 14 л 5% водного раствора гидрокарбоната аммония. Водную фазу отделяют, органическую фазу дополнительно упаривают (досуша) в роторном испарителе. Образующийся продукт-масло (-1.5 л)- содержит 133 г ловастатина.

20 Полученное масло (161 мл) растворяют в 80 мл ацетонитрила и вносят в колонку для хроматографии (80 см, 3.6 см), заполненную ХАД-16 (ХАД-16 - торговое название компании Rohm and Haas, 20-50 меш). Сначала элюируют смесью ацетонитрил/вода 40:60 (pH 3, устанавливают с помощью соляной кислоты) со скоростью 75 мл/мин. Элюирование контролируют с помощью УФ-детектора (236 нм) и после появления первой капли с таким поглощением начинают элюирование смесью ацетонитрил/вода 55:45 (pH 3, доводят соляной кислотой). Собирают основную фракцию и после исчезновения ("падения") поглощения, колонку промывают 80:20 ацетонитрил/вода (pH 3, устанавливают соляной кислотой). Ацетонитрил отгоняют из основной фракции на роторном испарителе (50°C, 150 мбар или 15 кПа) и выпавшие кристаллы отфильтровывают. Масса кристаллов 24.5 г и содержание ловастатина 50 весовых % (вес/вес; W/W). Чистота 92.5% (ВЭЖХ).

40 Полученные кристаллы (24 г) растворяют в 350 мл ацетона и при постоянном перемешивании добавляют 700 мл воды. Смесь выдерживают 30 мин при 4°C. Выпавшие кристаллы отфильтровывают и сушат в вакууме при комнатной температуре. Масса кристаллов составляет 12.7 г при содержании ловастатина 90 весовых % (вес/вес). Чистота 98.8% (ВЭЖХ).

45 Перекристаллизацию из ацетона повторяют в тех же условиях и получают 11.3 г кристаллов с 97 вес.% содержанием ловастатина. Чистота 99.4% (ВЭЖХ).

50 Кристаллы (11.3 г), полученные после второй кристаллизации из ацетона, растворяют в 700 мл этилацетата и этилацетат упаривают в вакууме до концентрации ловастатина 70 г/л. Концентрат выдерживают при 8°C в течение одного часа. Выпавшие кристаллы ловастатина отфильтровывают и затем сушат в вакууме. Масса кристаллов составляет 9.4 г при содержании ловастатина 99.6% весовых. Чистота 99.7% (ВЭЖХ).

Пример 2

55 Кристаллы ловастатина (3 г), выделенные после ХАД-адсорбционной хроматографии, как описано в Примере 1, растворяют в 170 мл этилацетата. Этилацетат упаривают в вакууме (200 мбар, 20 кПа) при 50°C до 35

мл. Концентрат выдерживают один час при 10 °С. Выпавшие кристаллы ловастатина отфильтровывают и затем сушат в вакууме. Массы кристаллов 2.1 г при содержании ловастатина 96 вес.% (вес/вес). Чистота 99.0% (ВЭЖХ).

Полученные кристаллы (2.1 г) растворяют в 50 мл ацетона и добавляют 85 мл воды. Смесь выдерживают 30 мин при 10°С и кристаллы отфильтровывают и сушат в вакууме при 40°С. Масса полученных кристаллов составляет 1.9 г с содержанием ловастатина 99 вес.% (вес/вес). ВЭЖХ-чистота 99.8%.

Пример 3

Ферментационный бульон (30 л в 50 л биореакторе), содержащий правастатин (690 г на кг ферментационного бульона; ВЭЖХ-чистота правастатина составляет 48.7%) фильтруют и полученный в результате мицелий промывают водой. Фильтрат (51 л) подкисляют до pH 5.0 10%-ным водным раствором фосфорной кислоты. Активное вещество (правастатин) затем экстрагируют на экстракционной колонне из фильтрата 70 литрами этилацетата. Водную фазу (50 л), содержащую менее 2 г правастатина и основную часть примесей, сливают. Этилацетатную фазу упаривают до 800 мл и используют далее в процессе выделения. ВЭЖХ-чистота правастатина в этилацетатном экстракте составляет 70.3%.

Для дополнительного выделения маслообразный продукт подвергают адсорбционной хроматографии и комбинированной кристаллизации в соответствии с Примером 1.

Пример 4

Сырой симвастатин (2.3 г) в лактонной форме растворяют в ацетоне (7 мл) и добавляют 15 мл воды. В результате получают маслообразный продукт, который кристаллизуется в течение 10 мин. Полученные кристаллы затем фильтруют, промывают водой и сушат при 40°С в течение 60 мин. Полученные в результате кристаллы (2.2 г) с ВЭЖХ-чистотой 99.51% растворяют в этилацетате (8 мл). Полученный раствор концентрируют до 4 мл, оставляют симвастатин кристаллизоваться на 60 мин при 8°С. Продукт отфильтровывают и промывают водой. Затем кристаллы сушат при 40°С в течение 60 мин. Чистота получающегося симвастатина (1.7 г) составляет 99.73%.

Пример 5

Сырой мевастатин (2.0 г) в лактонной форме с чистотой 98.5% (ВЭЖХ) растворяют в ацетоне (7 мл) и добавляют 20 мл воды. Получают продукт в виде масла, которое кристаллизуется в течение 10 мин. Полученные кристаллы затем фильтруют, промывают водой и сушат при 40°С в течение 60 мин. Эти кристаллы (1.8 г) с чистотой 99.33% (ВЭЖХ) затем растворяют в этилацетате (8 мл). Полученный раствор упаривают до 4 мл и мевастатин оставляют кристаллизоваться при 8°С в течение 60 мин. Продукт отфильтровывают и промывают водой. Затем кристаллы сушат при 40°С в течение 60 мин. Чистота полученного мевастатина (1.3 г) составляет 99.72%.

Формула изобретения:

1. Способ выделения и очистки ингибитора HMG-CoA-редуктазы от биомассы

мицелия, который заключается в осветлении питательной среды с мицелием и концентрировании осветленного бульона до меньшего объема; подкислении концентрата до величины pH в интервале 4,5-7,5 с последующей экстракцией ингибитора HMG-CoA-редуктазы этилацетатом; кристаллизации ингибитора HMG-CoA-редуктазы из смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя, кристаллизации ингибитора HMG-CoA-редуктазы из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворяющегося в ней.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что после экстракции ингибитора HMG-CoA-редуктазы проводят его лактонизацию.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий перед осветлением бульона с биомассой мицелия стадии растворения ингибитора HMG-CoA-редуктазы из биомассы мицелия при pH между 9,5 и 13 в ферментационной жидкости и корректировку величины pH бульона между 7,5 и 8,5.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что стадию растворения проводят при температуре в интервале 10-40°С в течение менее одного часа.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что осветление бульона с мицелием проводят, отделяя мицелий от бульона фильтрованием.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что осветленный бульон концентрируют методом обратного осмоса.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что концентрат подкисляют до величины pH в интервале 5,5-7,5.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что концентрат подкисляют до величины pH в интервале 6,0-7,0.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что ингибитор HMG-CoA-редуктазы, который экстрагируют из этилацетата и при необходимости лактонизируют, подвергают очистке с помощью адсорбционной хроматографии.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что в качестве подвижной фазы в адсорбционной хроматографии используют смесь ацетонитрила и воды.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что порядок стадий кристаллизации является обратным.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что смешивающийся с водой или растворимый в воде органический растворитель, применяемый на стадии кристаллизации, представляет собой ацетон или низший алкиловый спирт.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что стадия кристаллизации включает растворение ингибитора HMG-CoA-редуктазы в ацетоне, а затем добавление к ним воды.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия кристаллизации из органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в воде, включает растворение ингибитора

HMG-CoA-редуктазы в указанном органическом растворителе с концентрацией 10-35 г/л и удаление до трех четвертей указанного органического растворителя.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что органический растворитель, ограниченно смешивающийся с водой или ограниченно растворяющийся в ней, использующийся на стадии кристаллизации, представляет собой этилацетат.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что ингибитор HMG-CoA-редуктазы получают с чистотой выше 99,6%.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что в качестве смешивающегося с водой или растворимого в воде органического растворителя используют ацетон или низший алкиловый спирт.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выбранный ингибитор HMG-CoA-редуктазы представляет собой ловастатин.

19. Способ очистки ингибитора HMG-CoA-редуктазы, заключающийся в том, что ингибитор HMG-CoA-редуктазы, полученный выделением из культуральной среды способом, выбранным из группы, включающей экстракцию, хроматографию, лактонизацию или их комбинацию, подвергают комбинированной кристаллизации, включающей в себя кристаллизацию из смешанного с водой или растворимого в воде органического растворителя и кристаллизацию из органического растворителя, имеющего

ограниченную способность к смешиванию с водой или ограниченную растворимость в воде, при этом получают ингибитор HMG-CoA-редуктазы, имеющий чистоту выше 99,6%.

5 20. Способ по п.19, отличающийся тем, что полученный ингибитор HMG-CoA-редуктазы имеет степень чистоты выше 99,7%.

21. Способ по п.19, отличающийся тем, что в качестве смешивающегося с водой или растворимого в виде органического растворителя используют ацетон или низший алкиловый спирт.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанная кристаллизация включает растворение ингибитора HMG-CoA-редуктазы в ацетоне, а затем добавление к ним воды.

15 23. Способ по любому из пп.19-22, отличающийся тем, что указанная кристаллизация из указанного органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в воде, включает растворение ингибитора HMG-CoA-редуктазы в указанном органическом растворителе с концентрацией 10-35 г/л и удаление от одной трети до трех четвертей указанного органического растворителя.

25 24. Способ по любому из пп.19-23, отличающийся тем, что в качестве органического растворителя, ограниченно смешивающегося с водой или ограниченно растворимого в воде, используют этилацетат.

30 25. Способ по любому из пп.19-24, отличающийся тем, что ингибитор HMG-CoA-редуктазы представляет собой ловастатин.

35

40

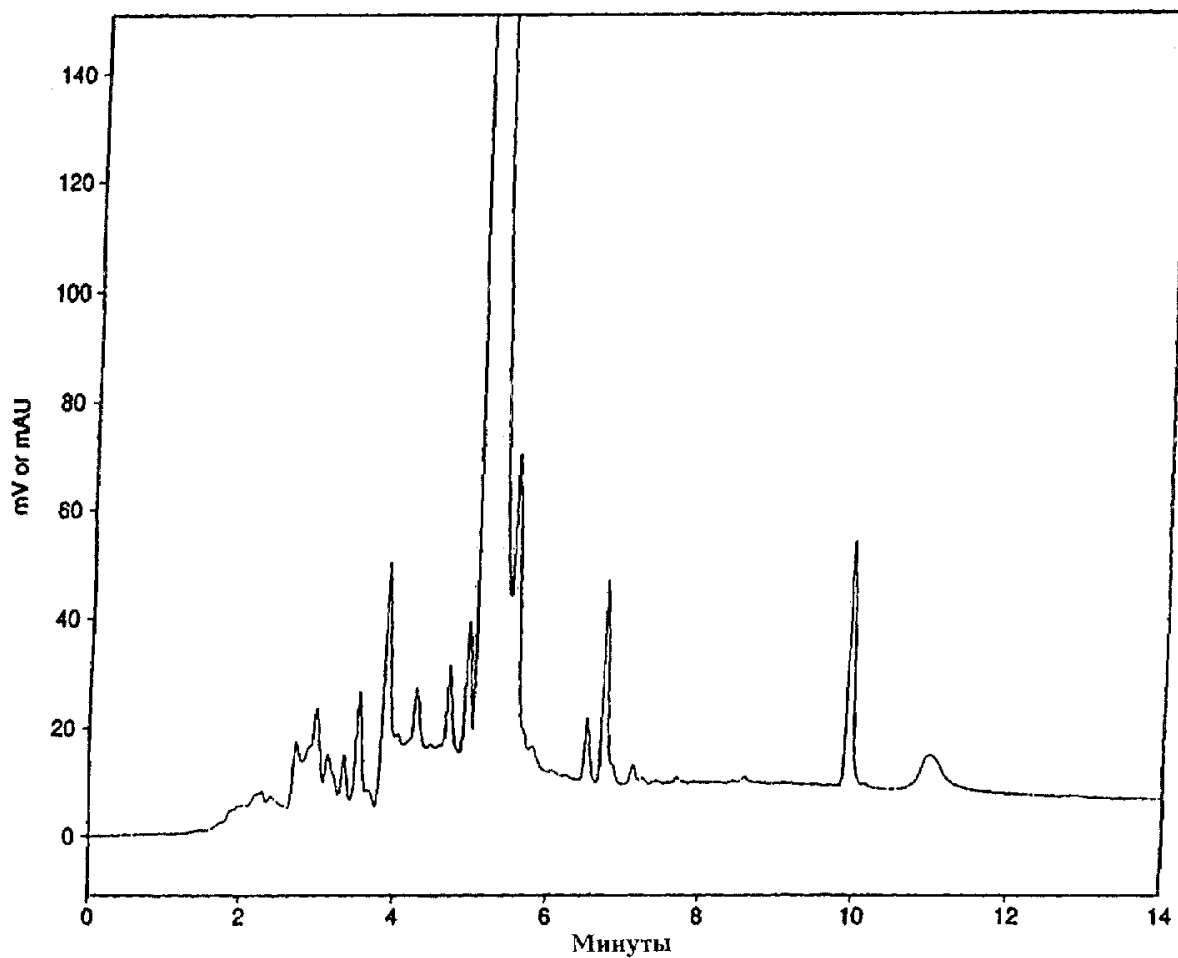
45

50

55

60

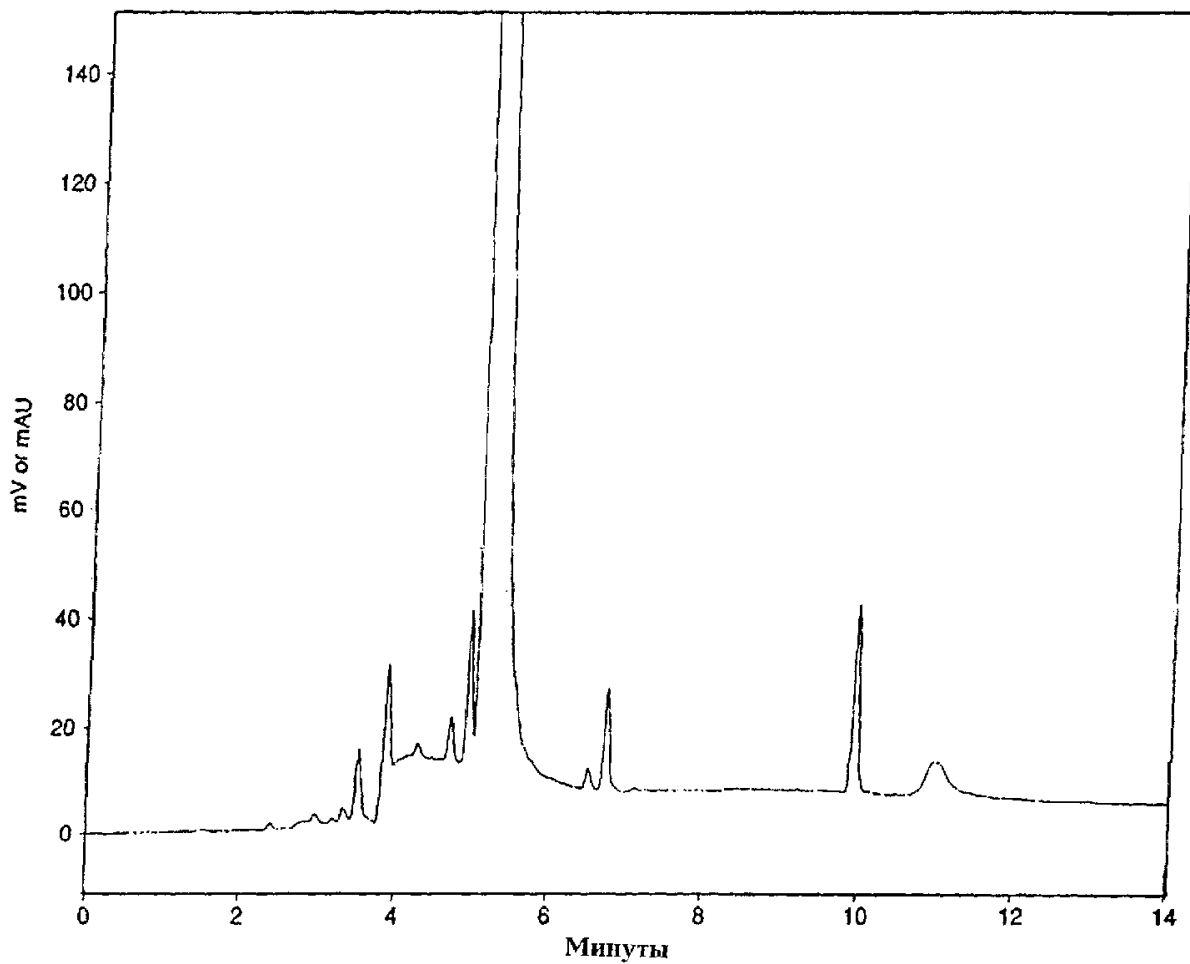
RU 2235130 C2



Минуты
Фиг. 2

RU 2235130 C2

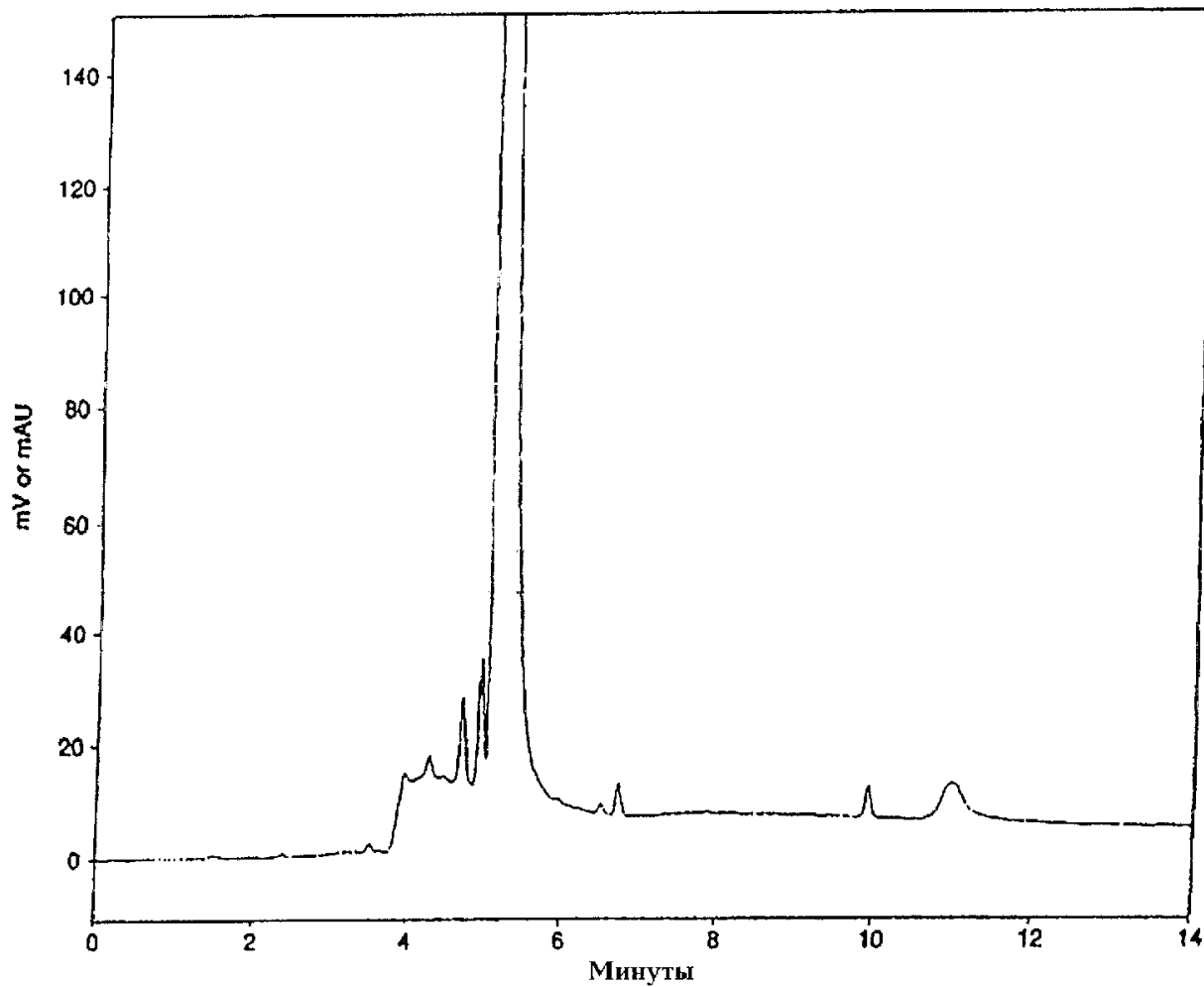
RU 2235130 C2



Минуты
Фиг. 3

RU 2235130 C2

RU 2235130 C2



Минуты
Фиг. 4

RU 2235130 C2