

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 99577A

(51) C07D309/30

C12P 17/06

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

|                                                                                                     |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
| (21) Заявителски № 99577<br>(22) Заявено на 14.04.1995<br>(24) Начало на действие<br>на патента от: |      |      | (71) Заявител(и):<br>АГАИН, ИВАН А., СОФИЯ, СОФИЯ ( BG ); АГАИНА, САБИНКА Й., СОФИЯ, СОФИЯ ( BG );<br>(72) Изобретател(и):<br>АГАИН, ИВАН А., СОФИЯ ( BG ); АГАИНА, САБИНКА Й., СОФИЯ ( BG );<br>(74) Представител по индустриална собственост:<br>Юлиян Иванов Върбанов, 1421 София, "Юлиан Върбанов и партньори" ООД |  |  |
| Приоритетни данни                                                                                   |      |      | (86) № на РСТ заявка:<br>(87) № и дата на РСТ публикация:                                                                                                                                                                                                                                                              |  |  |
| (31)                                                                                                | (32) | (33) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
| (41) Публикувана заявка в бюлетин № 12   31.12.1996                                                 |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
| (45) Отпечатано на                                                                                  |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
| (46) Публикувано в бюлетин № на                                                                     |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
| (56) Информационни източници:                                                                       |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |
| (62) Разделена заявка от рег. №                                                                     |      |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ЛОВАСТАТИН

(57) Полученият по метода ловастатин е вторичен метаболит с противоположни свойства и е инхибитор на 3-хидрокси-3-метилглутарил-коензим А (HMG-CoA reductase). Той намира приложение в медицината за третиране на атеросклероза и първична хиперхолестеролемия, а също и като изходен продукт за получаване на полусинтетични производни. Методът се осъществява, като културалната течност, след завършване ферментации ята на *Aspergillus terreus*, се алкализират до pH 9,5-12, прибавя се флокулант и се филтрува. Мицелът се суспендира във вода, филтрува се и се промива. Ловастатинът от обединените филтрати се извлича и пречиства екстракционно с несмесващ се с вода органичен разтворител в присъствие на деемулгатор. Провежда се реекстракция с воден разтвор на алкален агент. Водният алкален реекстракт се подкислява до pH 4,0-5,5. Следва нова екстракция с органичния разтворител, екстрактът се промива с деминерализирана вода и се подлага на пречистващо-концентрираща обработка с последваща термична или каталитична лак тонизация, концентриране, кристализация, филтруване, промиване и сушене.

4 претенции, 0

BG 99577A

14-04-93

99577

Иван Александров Агаин

Сабинка Йоакимова Агаина

София

България

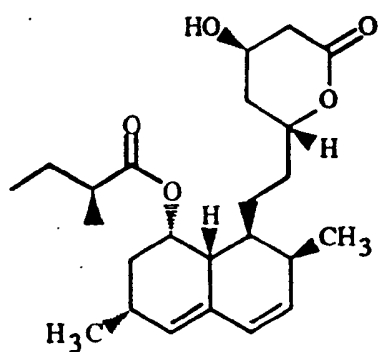
**Метод за получаване на Ловастатин с голяма  
чистота**

**Област на техниката.**

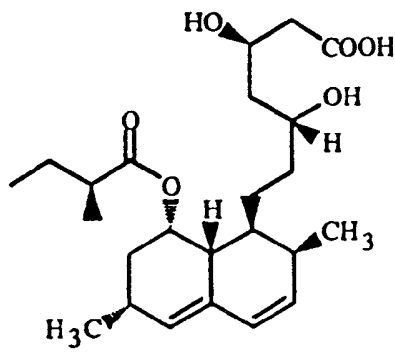
Изобретението се отнася до метод за получаване на ловастатин с висока чистота, който намира приложение в медицината, като хипохолестероемично, хиполипемично средство а също така като изходен продукт за получаване на гама полусинтетични производни с по-високи лечебни качества от самия ловастатин.

### Предшествуващо състояние на техниката.

Известно е че ловастатинът (2-метил-бутанолова киселина-1,2,3,7,8,8а-хексахидро-3,7-диметил-8-/-2-тетрахидро-4-хидроксид-6-оксо-2Н-пиран-ил/етил-1-нафталенил естер/2-бета, 6-алфа-диметил-8-2-метил-1-оксобоутоксид/лактон с формула (1)



Lactone



Hydroxyacid

е биологичен продукт, синтезиран от различни щамове гъби, като напр. *Aspergillus terreus* ATCC - 20541

Известни са методи за изолиране и пречистване на ловастатин (1,2,3,4) при които ловастатинът се изолира от ферментационната течност, чрез подкисляването ѝ до рН 3-6 и екстракция с етилацетат. Етилацетатния екстракт на ловастатин се промива с вода след което процесът може да продължи по няколко различни методи:

1. Съгласно [1] се концентрира под вакуум до маслообразна консистенция и последващо пречистване чрез колонна хроматография

2. От етилацетатния екстракт ловастатина се екстрахира с 0,1N водна натриева основа. Алкалния воден екстракт се подкислява до рН 5 и се екстрахира със смес от хексан/етилацетат. След отделяне на органичния слой, последния се обезводнява и ловастатина се утаява, като амониева сол с амониак газ. Тази сол се суспендира в толуол и се превръща в лактон при нагриване до температура 106°C в продължение на 2,5 часа.

Полученият лактон кристализира из концентрирания толуол и се прекристализира из етанол.

3. Известен е и метод за директна лактонизация на ловастатина по време на концентрирането на органичния разтворител (напр. бутилацетат) чрез пряка дестилация.

4. Алтернатива за отстраняване на по-голямата част от баластните вещества е вместо да се изолира ловастатина, като амониева сол, лактонизацията да се извърши в присъствието на всички примеси след което, значителна част от тях (преимуществено с карбоксилна функция) да бъде утаена с амоняк-газ и отстранена чрез филтрация [ 5 ]

Гореизброените известни методи, притежават редица недостатъци, по-важните от които са:

- използване на смеси от органични разтворители [1,2,3] които трудно се разделят при регенерация освен чрез високо ефективни ректификационни процеси;
- използване на двукратно препаративно хроматографско пречистване - през силикагел и след това през Sephadex LH-20-отново с трудни за регенерация разтворителни смеси; тези методи имат лабораторно или пилотно приложения и са твърде скъпи и бавни за индустриални мащаби или изискват специална за целта апаратура - скъпи сорбенти и специално пречистени органични разтворители.
- за по-пълно екстрахиране на активното вещество от ферментационната течност се прилага разделно екстрахиране на филтрата с етилацетат, а мицелия с нисши алкохоли (метанол) и така органичните разтворители се смесват отново за концентриране под вакуум.
- Друг метод [2] използва изолиране на ловастатин-киселина като амониева сол - за сепариране от органичните примеси и пигментите. Тази амониева сол [2,2' ] се получава чрез утаяване с амоняк газ в ацетон; Този метод освен техническите сложности с използването на газ - амоняк е и взриво опасен поради голямото количество ацетон; освен това количеството на амоняка е в голям излишък и води до частично деструктиране до смолистообразни вещества.
- Съществени недостатъци са и сравнително ниските добиви (30-60%) и ниската чистота - 95-97% (когато не е проведено двукратно хроматографско пречистване).
- Методът [5] за обратно утаяване с амоняк - газ на примесите с карбоксилна функция в бутилацетатен концентрат на лактона показва при пилотни и индустриални мащаби нисък добив и краен продукт с незадоволителни качествени показатели:
  - чистота - 93-95% при изискване минимум 98,5%

- специфична ротация  $-320,7^{\circ}$  при изискване  $324-338^{\circ}$
- лош хроматографски профил: основният пик е съпътстван с много на брой пикове на онечиствания, някои от които са по количество над 1-1,5%, което е недопустимо според международните изисквания.

Американски патенти No 429484 и No 4231938 преодоляват проблема с качеството на продукта с помощта на индустриална високоефективна течна хроматография, но това изисква скъпо оборудване.

Екстракционното пречистване обикновено включва реекстракция на продукта с водна натриева основа при което обаче се образуват големи по количество и много устойчиви емулсии. Това силно забавя процесите дори при използването на високоефективни сепаратори, води до загуба на разтворител, а заедно с него и на продукт, поради което някои автори [4] избягват тази фаза. Съкращаването на алкалната реекстракция обаче води до концентриране чрез дестилация на огромни обеми органични разтворители, (обикновено висококипящи) при което продуктът претърпява продължително термично третиране, съпроводено с деструкции а примесите също се концентрират, съутаяват се при кристализацията и силно влошават качеството на желанния продукт.

### **Задача на изобретението**

Изобретението цели да се разработи метод за получаване на ловастатин с висока степен на чистота (над 98,5%), висок добив на краен продукт, нисък процент на примесите, без да се прилага препаративна високоефективна течна хроматография.

### **Същност на изобретението**

Методът, съгласно изобретението съдържа следните операции:

Ферментационната течност в края на процеса съдържа смес от приблизително еднакви количества ловастатин-лактон и ловастатин-киселина.

За максималното преминаване на цялото съдържание на ловастатина във водната фаза, като сол на ловастатин киселината се прилага алкализиране на ферментационната течност с NaOH в

границите на рН от 8,5 до 12 - (за предпочитане е рН 10,5). След довеждане на необходимото рН, към ферментационната течност се прибавя воден разтвор на флокулант и сместа се разбърква след което се филтрува. Мицелът се промива при същото рН между 10-11. С прилагането на флокулант и промиване на мицелия при алкално рН се постига добив при филтрация над 95%. Прибавянето на флокулант решително подобрява процеса на филтрация (табл.1, фиг. 1) по следните показатели:

- 1.- Увеличаване скоростта на филтрация или намаляване времето на филтрация.
- 2.- Увеличаване добива на филтрат.
- 3.- Увеличаване количеството на лавоустатин.
- 4.- Отстраняване част от пигментите.

Екстрахирането на лавоустатин-киселина се извършва при рН 2-6 за предпочитане 4,5-5 в присъствие на деемулгатор. При използване на подходящи деемулгатори, съотношението филтрирана ферментационна течност - органичен разтворител - напр. етилацетат, бутилацетат, метилизобутилкетон и др. - за предпочитане бутилацетат - може да бъде 6:1 до 15:1 за предпочитане 10:1.

Полученият бутилацетатен екстракт се реекстрахира с водна натриева основа, в присъствие на деемулгатори с което се избягват емулсиите и е възможно използване съотношение (1:2-5) на двете фази, което позволява висока степен на концентриране на активното вещество при елиминиране на по-голямата част от баластните вещества, които остават в органичната фаза. При използването на екстрактор-сепаратор при меки условия (стайна температура) за кратко време, първоначалният обем се намалява около 40 пъти (респективно концентрацията на активното вещество се увеличава 40 пъти) и основното количество примеси се отстранява без да се образуват нови такива в резултат на деградационни процеси.

Полученият воден екстракт се подкислява до рН 4,5-5 и отново се екстрахира с бутилацетат в съотношение 1:5-10. Полученият втори бутилацетатен екстракт се промива с обезсолена вода, след което се концентрира под вакуум и се лактонизира по някой от известните методи - термична или каталитична лактонизация.

## **Вариант II**

Водният реекстракт се смесва с 1/3 от обема бутилацетат. При разбъркване се довежда рН до 4-4,5. След разслояване водния слой се изхвърля.

Бутилацетатния слой се промива двукратно с дестилирана вода.

Бутилацетатния екстракт се охлажда до минус 15 - минус 20°C за 5-6 часа.

Кристализирания лед се отстранява чрез филтруване. Към концентрата, след обезцветяване с активен въглен се добавя амониев ацетат с 10% излишък от стехиометричното количество. При постоянно разбъркване сместа се охлажда до температура минус 10°C за 4-5 часа. Суспензията се центрофугира. Амониевата сол се промива върху центрофугата с охладен ацетон. Получената бяла, кристална амониева сол се суши. Добив 75% спрямо съдържанието във ферментационната течност. Чистота над 95 %.

Лактонизирането се извършва по известните методи.

## **Примери за изпълнение на изобретението**

### **Пример 1:**

45м<sup>3</sup> културална течност с активност 1,5 гр/литър ловастатин се алкализират с 20% NaOH при разбъркване до рН 10,5-11.

**Филтрация:** В продължение на 4 часа периодично се подава NaOH така че рН да не пада под 10. След стабилизиране на рН в границите 9,5-10,5 се прибавя 0,1% воден разтвор на Praestol 650 ВС в количество 100 гр/1 м<sup>3</sup>. Разбърква се 30 минути след което се филтрува на барабанен вакуум филтър. С промивни води (рН 10,5) обема на филтрата се довежда до 70м<sup>3</sup>. Добивът на филтрацията е над 95%.

**Екстракция:** Филтратът се довежда с помощта на H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> или сярна киселина до рН 4,5-5,0 при разбъркване.

Към бутилацетата приготвен за екстракцията се добавя при разбъркване 1,2 кг. Armogard 5356 предварително разтворен в 10-15 л. бутилацетат.

Екстракцията се извършва с помощта на сепаратор-екстрактор при съотношение 10:1. В отпадните води остават около 2-4% ловастатин или добивът на екстракцията е 96-98%. Бутилацетатния екстракт (7м<sup>3</sup>) се промива с обезсолена вода.

### Реекстракция:

Към 7м<sup>3</sup> промит бутилацетатен екстракт се прибавя 1,5кг. Armogard 5411 разтворен в 4-5л. бутилацетат и реекстракцията се извършва в съотношение 3:1. Получава се 2,2-2,5 м<sup>3</sup> воден реекстракт с рН 9-10.

Към водния реекстракт с рН 10 се прибавят 20-25 % бутилацетат. При разбъркване се прибавя минерална киселина за довеждане на Рн до 4,5-5,0; сместа се разбърква 20 минути и отстоява 4-5 часа. Долния воден слой се отстранява. Бутилацетатния концентрат се промива с равен обем деминерализирана вода. При температура 60-70°C и вакуум се дестилира около 30% от бутилацетата. След обезводняването сухия бутилацетатен концентрат се нагрява до 120°C за 2 часа при прав хладник. Степента на лактонизация се следи чрез HPLC. След завършване на процеса лактонизация (над 95% превръщане) бутилацетатния концентрат се охлажда до температура около 50°C и се промива двукратно с равен обем 1%-ен воден разтвор на натриева основа. След това се промива с обезсолена вода до рН 6,0.

Промития бутилацетатен концентрат се дестилира под вакуум при температура 60-70°C до съдържание на ловастатин 10-15%, обезцветява се на горещо с 2% въглен и се филтрува. Концентратът се охлажда при разбъркване до температура 0-минус 5°C в продължение на 24 часа.

Кристализирания ловастатин лактон се центрофугира на кошова триколонна центрофуга промива се със сух охладен бутилацетат и се суши под вакуум до съдържание на влага и летливи вещества не повече от 1%. Изсушения ловастатин лактон се разтваря в 10кратно количество етилацетат при нагряване на обратен хладник при температура 60°C. Прибавя се 2% активен въглен, разбърква се 30 мин. и се филтрува на горещо през рамкова филтър преса или барабанен филтър. Обезцветеният етилацетатен разтвор се охлажда при разбъркване при минус 20°C в продължение на 24-48 часа. Центрофугира се и се промива с леден етилацетат и след това с хексан. Суши се под вакуум при температура 55-60°C до съдържание на влага и летливи вещества не повече от 1%. Добив 70% спрямо съдържанието на ловастатин във ферментационната течност. Съдържание на ловастатин 98,5%

- Специфична ротация - 332°;

- Примеси от сродни вещества -

индивидуални примеси - не повече от 0,5%

тотални примеси - не повече от 1,5%

Пример 2:

45м<sup>3</sup> ферментационна течност се обработва както е описано в пример 1 до получаване на воден алкален реекстракт.

Към водния реекстракт -2,5 м<sup>3</sup> се прибавят 600 литра бутилацетат. При разбъркване сместа се подкислява до рН 4 с минерална киселина. След отсложаване водния слой се изхвърля. Бутилацетатния екстракт се промива двукратно с обезсолена вода.

Промития екстракт се охлажда до минус 15 - минус 20°C за 4-5 часа. Чрез филтрация водата се отстранява като лед.

Към обезводнения концентрат при разбъркване се добавя 13 кг. амониев ацетат с разчет 10% над стехиометричното количество. Сместа се разбърква 2 часа при t 0-5°C.

Кристалите от амониевата сол на ловастатина се центрофугират, промиват с охладен ацетон и сушат. Амониевата сол се суспендира в сух бутилацетат, като 5%-на суспензия

Сместа се нагрива до 120°C за 2 часа на обратен хладник, след което се дистилюва част от бутил ацетата на прав хладник така, че крайната концентрация на ловастатин да бъде 10 - 15%.

При 50-60°C се прибавят 2% по обема активен въглен, разбърква се 30 минути и въглена се отстранява чрез филтруване.

Концентрата се кристализира при охлаждане до температура минус 15°C . Получените кристали ловастатин лактон се филтруват, промиват и се прекристализират както е описано в пример 1. Получават се 52,5 кг ловастатин отговарящ на USP - XXIII.

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. USP No 4231 938, 1980
2. USP No 4319 039, 1982
3. USP No 4294 846, 1981
4. Патент на САЩ No 4916 239
5. Метод за изолиране и пречистване на ловастатин българска заявка за патент N 97660, 1993 г.

## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за изолиране и пречистване на ловастатин, характеризиращ се с това, че ферментационната течност се алкализира до рН 10-11, прибавя се флокулант и се филтрува след което мицелият се суспендира с вода и се филтрува и промива, ловастатинът се извлича и се пречиства екстракционно с несмесващи се с вода органични разтворители в присъствие на деемулгатори; след лактонизация концентратът на лактона се пречиства чрез промиване с 1%-на натриева основа, обезводнява се азеотропно след отмиване на натриевата основа с вода и се обезцветява с активен въглен при температура 50-60°C след което се охлажда за кристализация; получените кристали се филтруват, промиват се последователно с леден бутилацетат и хексан. Продуктът е с чистота над 98,5%.

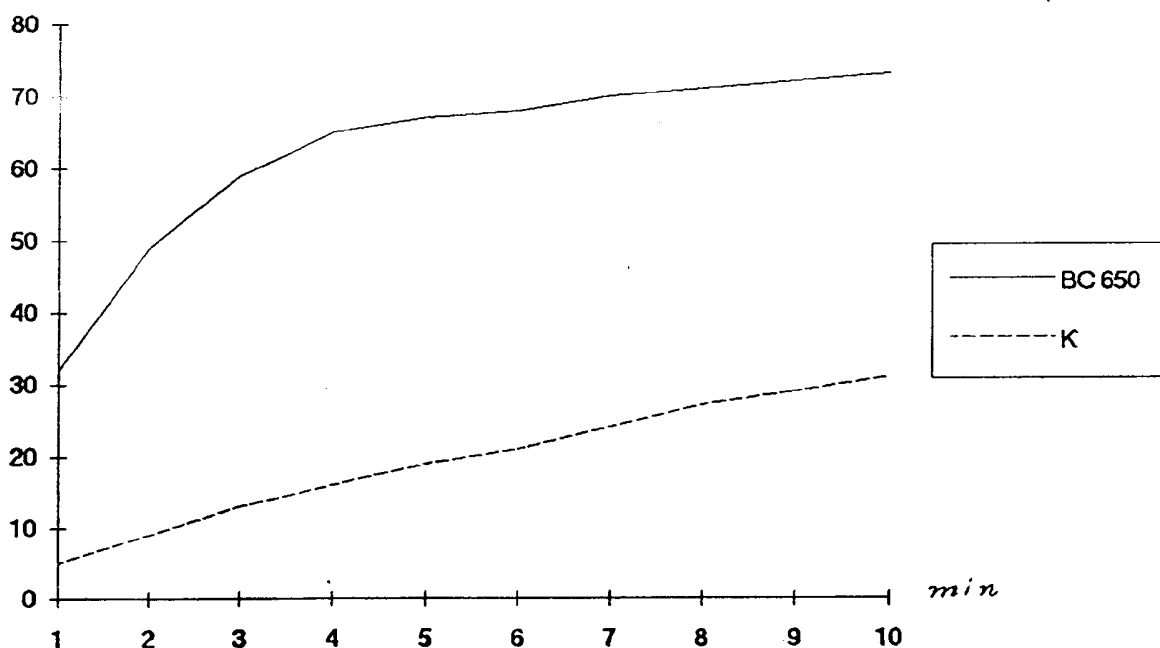
2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че алкалния реекстракт се подкислява до рН 4-5, екстрахира се с бутилацетат в съотношение 3:1, бутилацетатния концентрат се промива, обезводнява, обезцветява, ловастатина се утаява с помощта на органичен разтворител, като се извлича, промива, центрофугира, промива, суши и се суспендира в чист бутилацетат, където се извършва лактонизацията при нагряване при 120°C, след концентриране до 10-15%, концентрата се обезцветява и охлажда за кристализация, като кристалите се центрофугират, промиват и сушат, като крайния продукт е с чистота над 98,5% и добив над 70%.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че филтрацията на ферментационната течност се извършва при алкално рН в присъствие на флокулант (Praestol 650 BC).

4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че екстракцията на ловастатин се извършва в присъствие на деемулгатори (Armogard 5411, 5453 и др.).

Таблица 1  
Влияние на Praestol 650 BC върху скоростта на филтруване на  
*Asp. terreus*

| N  | Показател                              | Контрола<br>/без флокулант/ | Praestol 650<br>BC (0.1g/L) |
|----|----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. | Обем филтрат за<br>еднакво време       | 100                         | 127                         |
| 2. | Добив на филтрат - %<br>(без промивка) | 80                          | 89                          |
| 3. | Активност - %                          | 100                         | 124                         |
| 4. | Цвят на филтрат<br>- Е <sub>λ650</sub> | 8.22                        | 7.57                        |



Фиг. 1 - Влияние на Praestol 650 BC (0.1g/L) върху скоростта на  
филтруване на *Asp. terreus*