

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 9300303 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **9300303**

(22) Datum prijave: **08.06.1993**

(51) MPK⁶: **C12P 17/06**, **C12P 7/42**,
C12P 7/62, **C12N 9/14**,
C12N 11/02

(45) Datum objave: **31.12.1994**

(72) Izumitelj: **HAJKO PAVICA, Novo mesto, SI;**
VESEL TANJA, Novo mesto, SI;
RADEŽ IVAN, Novo mesto, SI;
POKORNY MIROSLAV, Novo mesto, SI

(73) Nosilec: **KRKA tovarna zdravil p.o., Cesta herojev 45, 68000 Novo mesto, SI**

(74) Zastopnik: **PATENTNA PISARNA d.o.o., Čopova 14 p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI**

(54) POSTOPEK ZA IZOLACIJO HIPOLIPEMIČNE UČINKOVINE

(57) Opisan je postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine lovastatina iz fermentacijske brozge, micelija ali filtrata *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135) z

ekstrakcijo z butilacetatom. Laktonizacija poteka istočasno s koncentriranjem ekstrakta. Temu sledi direktna kristalizacija lovastatina v obliki laktona iz butilacetata.

SI 9300303 A

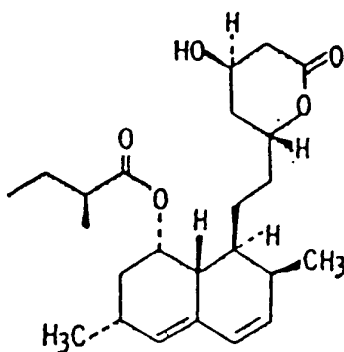
KRKA tovarna zdravil, p.o.

Postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine

Področje tehnike, v katero spada izum

Izum je s področja biotehnologije in se nanaša na postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine lovastatina iz fermentacijske brozge. Lovastatin nastaja kot sekundarni metabolit glive *Aspergillus terreus* (US patent 4,231,938), ki je deponirana v zbirki American Type Culture Collection pod št. ATCC 20541, ATCC 20542, ter *Monascus rubber*, ki je deponirana pri Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japonska (DE 30 06 216 A1) pod št. Ferm 4822. Znane so tudi druge vrste mikroorganizmov - producentov lovastatina, npr. mutant mikroorganizma *Aspergillus terreus* in *Aspergillus oryzae* z oznako Ao At/NBJ-V ATCC 74135.

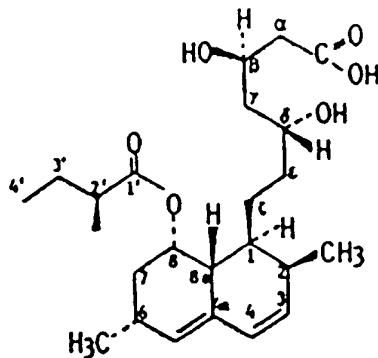
Lovastatin je kemijsko 1',2',6',7',8a'-heksahidro-3,5-dihidroksi-2',6'-dimetil-8'-(2''-metil-1''-oksobutoksi)-1-naftalenheptanonska kislina-5-lakton (Stubbs et al., 1986) s formulo (EP 0 033 537 A1)



spojina I

Aktivna oblika lovastatina je tudi kislina, ki je kemijsko 1,2,6,8,8a-heksahidro- β , δ -dihidroksi-1-naftalenheptanonska kislina (Alberts et al., 1980) s formulo

(EP 0 022 478 A1)



spojina II

Laktonska oblika lovastatina se uporablja kot sredstvo za zniževanje nivoja holesterola v krvi (Scott M.G. and Vega G.L., 1985). Zavira biosintezo mevalonske kisline z inhibicijo 3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A reduktaze (HMG-CoA reduktaza, E.C. 1.1.1.34) (Zubay et al., 1984).

Stanje tehnike

Po končani fermentaciji se lovastatin nahaja v brozgi v obliki laktona (spojina I) in kisline (spojina II). Pri postopku izolacije, opisanem v EP 0 033 536 A2, lovastatin iz brozge ekstrahirajo z etilacetatom. Ekstrakt koncentrirajo z vakuumsko destilacijo. Ker se lovastatin pojavlja tako v obliki laktona kot tudi kisline, tržno pa je zanimiv lakton, je potrebno kislinsko obliko prevesti v lakton. Laktonizacijo izvajajo z refluksum koncentrata v toluenu pri 106 °C 2 uri. Po končani laktonizaciji raztopino koncentrirajo na majhen volumen. Čisto snov dobijo s pomočjo čiščenja koncentrata na kolonah, polnjenih s silikagelom, ob prisotnosti topil, kot so etilacetat, n-heksan. Zbrane frakcije ponovno koncentrirajo v vakuumu in nato čisti lovastatin v obliki laktona kristalizira.

Tehnični problem

Zaradi zapletene večstopenjske izolacije so izkoristki pridobivanja lovastatina iz fermentacijske brozge zelo nizki. Uporabljajo se različna topila, kot benzen, toluen, acetonitril, etilacetat, ki so toksična in je zato delo z njimi ljudem in okolju neprijazno.

Opis rešitve tehničnega problema

Postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine lovastatina izvedemo tako, da fermentacijsko brozgo, micelij ali filtrat *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135) ekstrahiramo z butilacetatom, ekstrakt koncentriramo pri znižanem tlaku pri temperaturi nad 40 °C in pustimo kristalizirati.

Lovastatin dobimo po postopku v smislu izuma izključno v obliki laktona, to pa zato, ker koncentriranje izvedemo v topilu, ki ima vrelišče višje od vode. Pri procesu laktonizacije se namreč sprošča voda, ki jo je potrebno odvajati iz reakcijskega medija.

S postopkom v smislu izuma skrajšamo pot pridobivanja lovastatina in s tem izboljšamo celokupen izkoristek izolacije. Z uporabo butilacetata pri ekstrakciji brozge in pri laktonizaciji se izognemo toksičnemu vplivu ostalih topil (toluen). Postopek je ponovljiv v industrijskem merilu s končnim izkoristkom 40 do 60% neodvisno od tega, ali mikroorganizem *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135) producira lovastatin intracelularno ali ekstracelularno v laktonski ali kislinski obliki.

Izolirana snov je enaka snovi, ki so jo izolirali po znanih postopkih. Strukturo potrjuje IR spektroskopija (sl.1), masna spektroskopija (sl.2), NMR (sl.3) in UV spektroskopija (sl.4).

Izum pojasnjujejo naslednji izvedbeni primeri, vendar ga nikakor ne omejujejo.

Primer 1

1000 ml fermentacijske brozge, dobljene s fermentacijo *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135), z vrednostjo pH 4,8, stare 120 ur, z vsebnostjo 300 µg/ml lovastatina (lakton + kislina) nakisamo s 36%-no HCl na pH 3-5. Fermentacijsko brozgo nato ohladimo pod 20 °C, dodamo 500 ml butilacetata in ekstrahiramo 4 ure pri tej temperaturi. Po končani ekstrakciji centrifugiramo ter ločimo vodno in organsko fazo. Micelij in vodno fazo zavržemo, organsko fazo pa nadalje obdelujemo. Organsko fazo koncentriramo z vakuumsko destilacijo pri temperaturi nad 40 °C na volumen 50 ml. Istočasno s koncentriranjem poteka tudi proces laktonizacije. Koncentrat nato ohladimo na temperaturo pod 20 °C in pustimo nekaj ur, da lovastatin izkristalizira. Dobljeni surovi produkt prekrystaliziramo. Dobimo 170 mg lovastatina v obliki laktona s čistoto nad 90%.

Primer 2

1000 ml fermentacijske brozge, dobljene s fermentacijo *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135), z vrednostjo pH 4,73, stare 120 ur, z vsebnostjo 190 µg/ml lovastatina (lakton + kislina) v filtratu in 15 µg/ml v miceliju nakisamo s 36%-no HCl na pH 3-5. Brozgo prefiltriramo preko Oliverjevega filtra. Micelij zavržemo, filtrat ohladimo na temperaturo pod 20 °C in dodamo polovični volumen butilacetata. Ekstrahiramo 1 uro. Naprej delamo kot v primeru 1. Dobimo 79 mg lovastatina v obliki laktona s čistoto nad 90%.

Primer 3

1000 ml fermentacijske brozge, dobljene s fermentacijo *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135), z vrednostjo pH 4,78, stare 120 ur, z vsebnostjo 5 µg/ml lovastatina (lakton + kislina) v filtratu in 300 µg/ml v miceliju nakisamo s 36%-no HCl na pH 3-5 in odcentrifugiramo. Filtrat zavržemo, miceliju dodamo 4-kratni volumen butilacetata in ohladimo pod 20 °C. Ekstrahiramo 4 ure. Ekstrakciji sledi centrifugiranje. Micelij zavržemo in filtrat obdelamo kot v primeru 1. Dobimo 90 mg lovastatina v obliki laktona s čistoto nad 90 %.

Za

KRKA tovarna zdravil, p.o.:

PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA



PATENTNI ZAHTEVEK

Postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine lovastatina, označen s tem, da fermentacijsko brozgo, micelij ali filtrat *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135) ekstrahiramo z butilacetatom, ekstrakt koncentriramo pri znižanem tlaku pri temperaturi nad 40 °C in pustimo kristalizirati.

Za

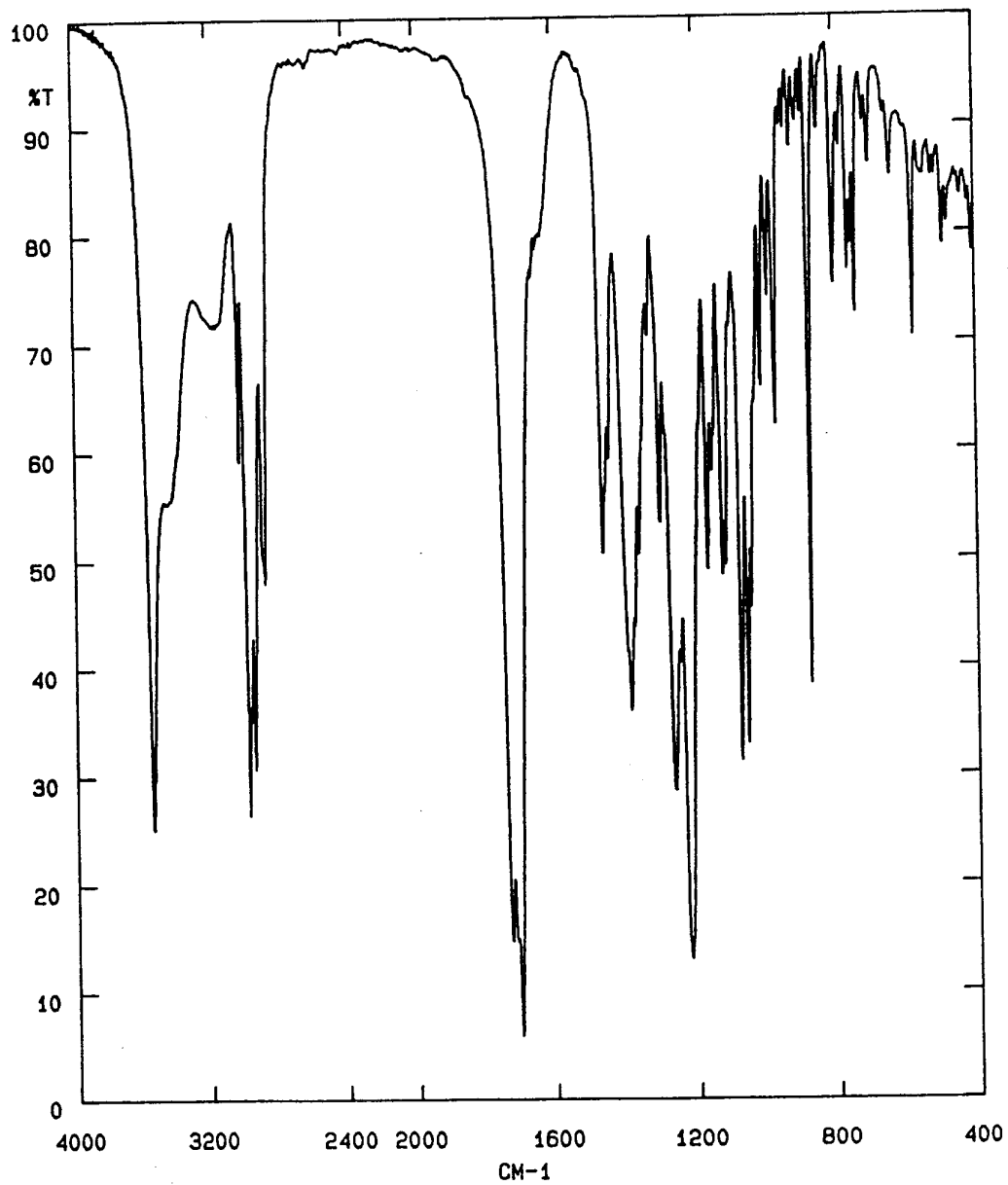
KRKA tovarna zdravil, p.o.:

PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA

22594-VI-1993-Pr

POVZETEK

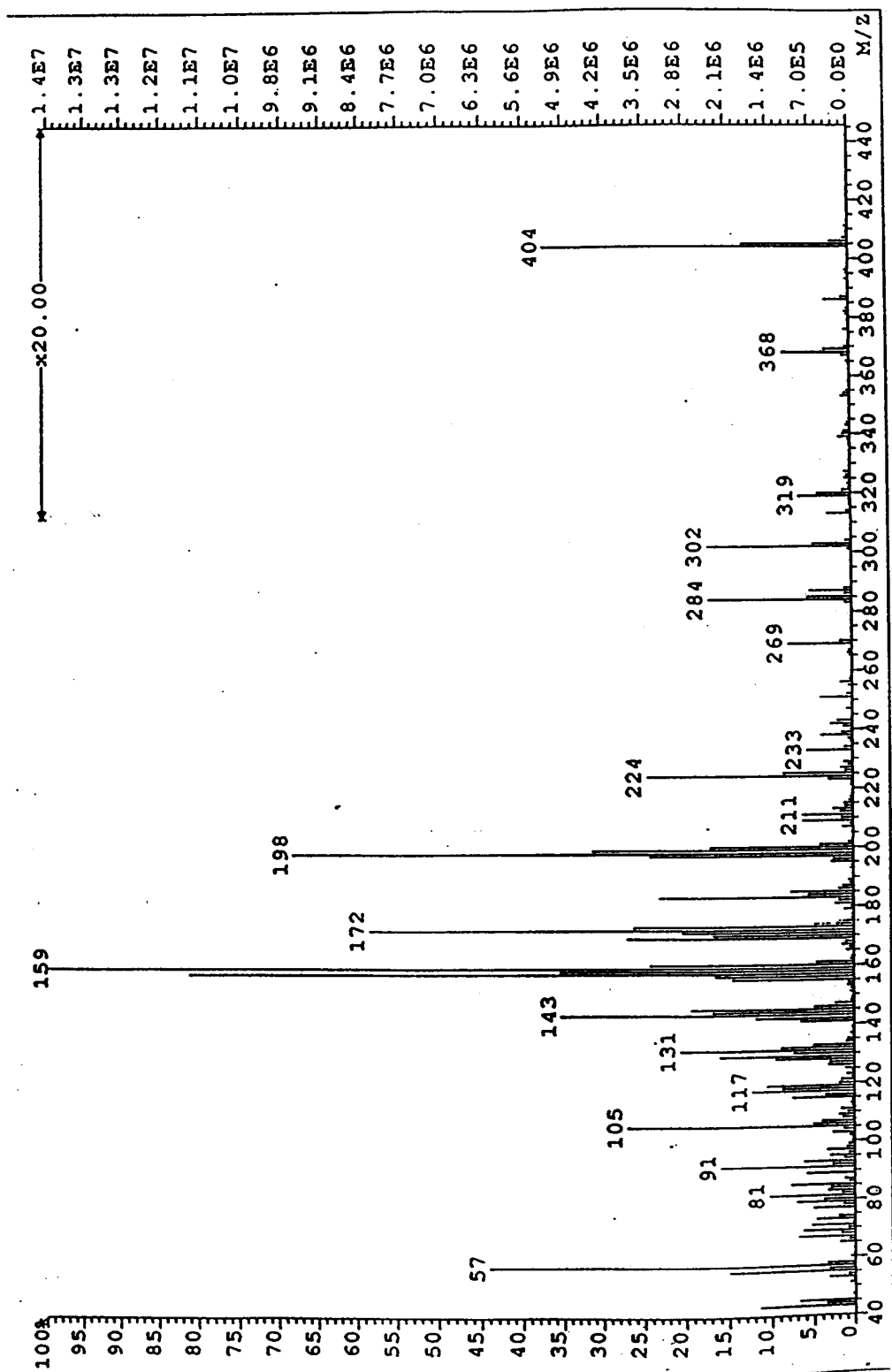
Opisan je postopek za izolacijo hipolipemične učinkovine lovastatina iz fermentacijske brozge, micelija ali filtrata *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) ali *Aspergillus oryzae* (Ao At/NBJ-V ATCC 74135) z ekstrakcijo z butilacetatom. Laktonizacija poteka istočasno s koncentriranjem ekstrakta. Temu sledi direktna kristalizacija lovastatina v obliki laktona iz butilacetata.



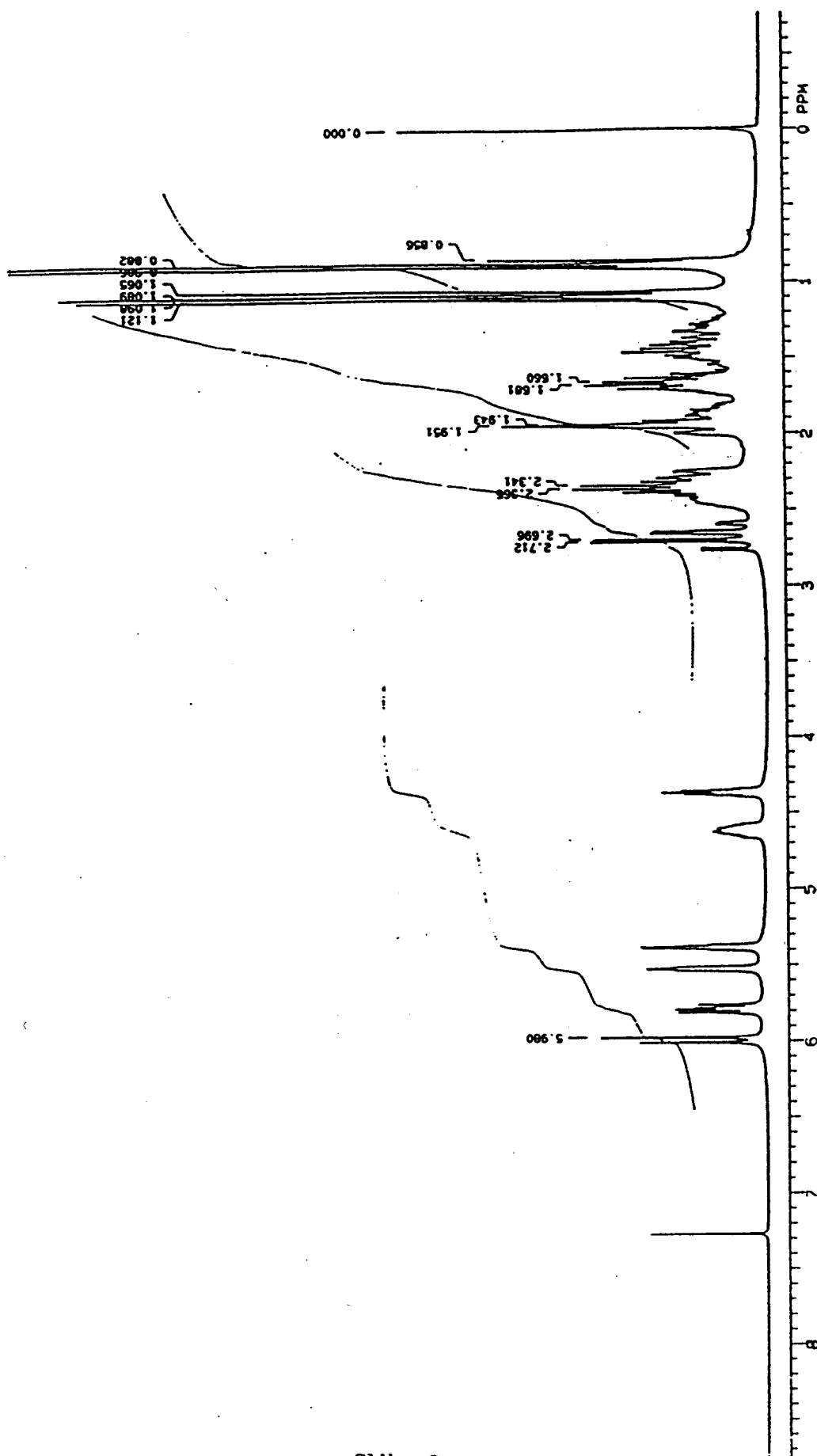
Slika 1

PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA

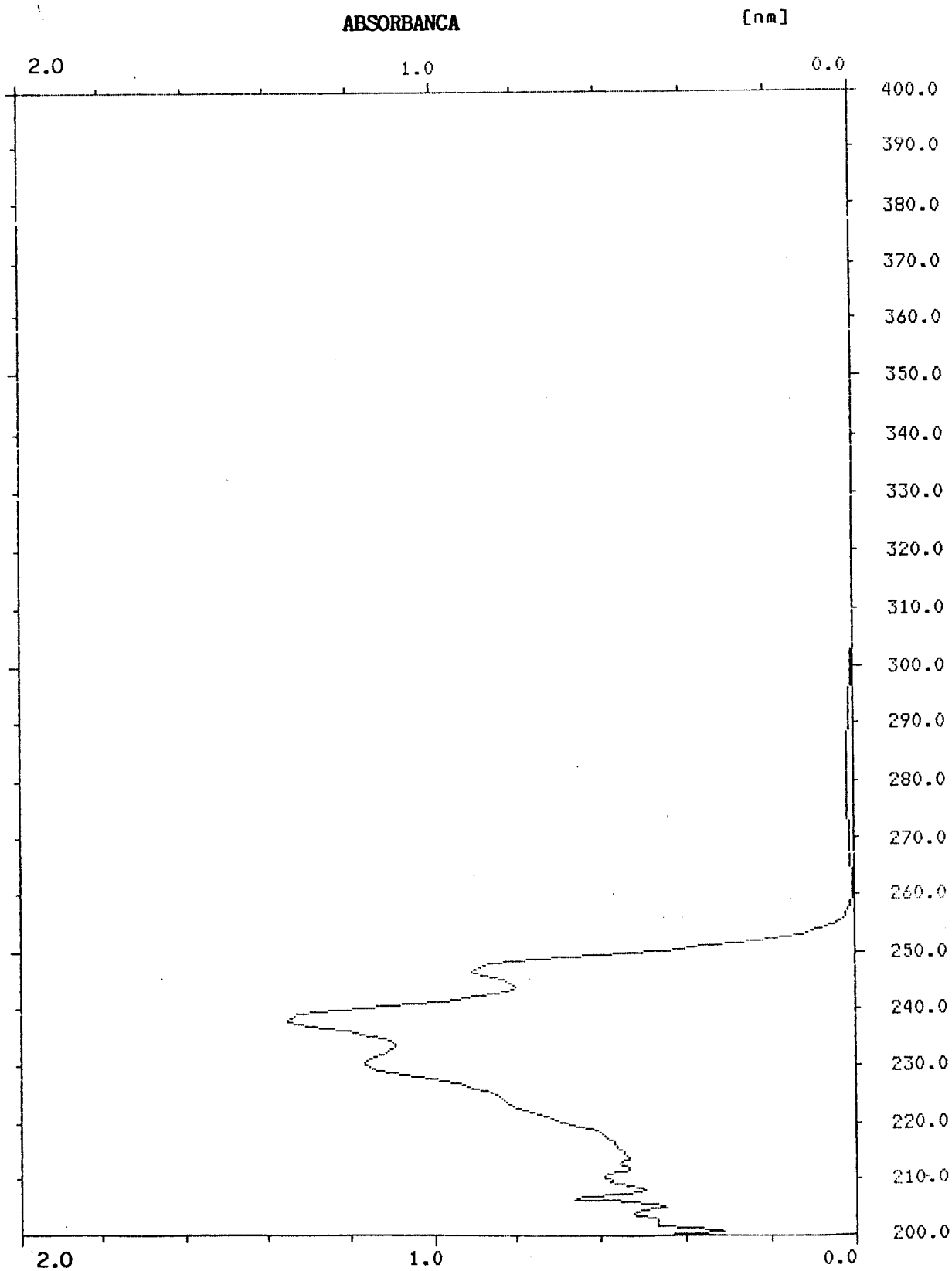
A



Slika 2



Slika 3



Slika 4

PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA

A