



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1253432** **A3**

UD 4 C 12 P 1/02//A 61 K 35/70  
(C 12 P 1/02, C 12 R 1:66)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### К ПАТЕНТУ

(21) 2935800/30-15'

(22) 13.06.80

(31) 77807

(32) 21.09.79

(33) US

(46) 23.08.86. Бюл. № 31

(71) Мерк энд Ко., Инк. (US)

(72) Ричард Л. Монаган, Альфред

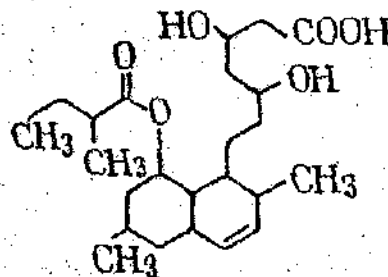
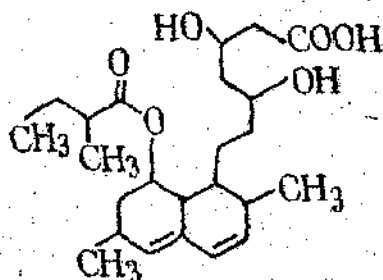
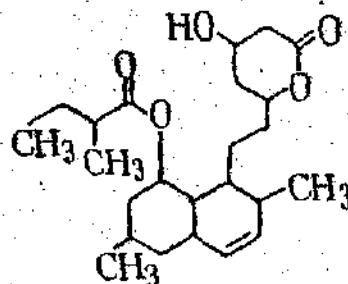
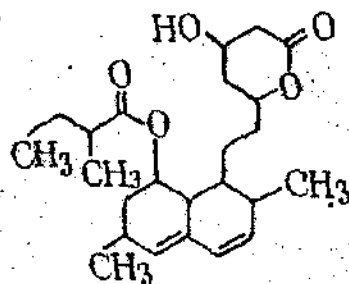
В. Альбертс (US), Джордж Альбертс-

Сконберг (CH), Генри Йосуа,

Мария В. Лопез и Карл Х. Хоффман (US)

(53) 615.779.932 (088.8)

(54) (57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОКСИКИСЛОТ  
ИЛИ ИХ ЛАКТОНОВ общих формул



путем ферментации питательной среды  
штаммом *Aspergillus terreus* ATCC  
№ 20542 с последующим выделением ука-

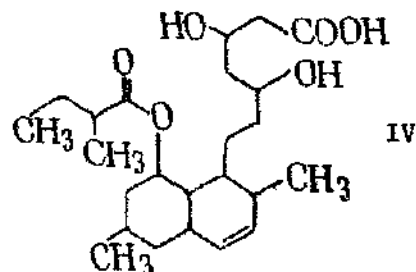
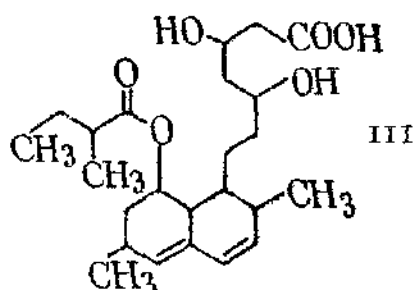
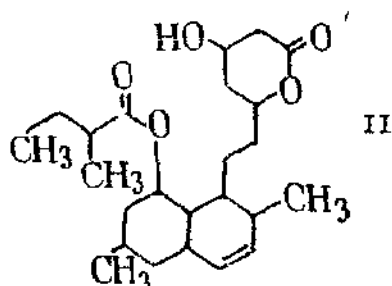
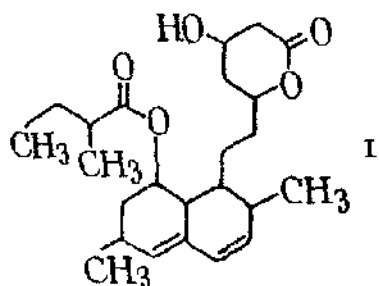
занных соединений из ферментационной  
смеси экстрагированием растворите-  
лем и последовательной хроматографией.

РПФ-К

(19) **SU** (11) **1253432** **A3**

Изобретение относится к способу получения новых лекарственных ве-

ществ, обладающих гипохолестеремической активностью, общих формул



Эти соединения подавляют биосинтез холестерина и могут быть использованы для лечения атеросклероза, гиперлипемии и других подобных заболеваний, а также в качестве противогрибковых агентов.

Оксикислоты или их лактоны получают путем ферментации питательной среды штаммом *Aspergillus terreus* ATCC № 20542 с последующим выделением соединения из ферментационной смеси экстрагированием растворителем и последовательной хроматографией.

Штамм *Aspergillus terreus* (обозначенный MF-4845) в собрании культур (фирма Мерк энд Ко., Инк., Ревей, Нью-Йорк) помещен на постоянное хранение в коллекцию Американского Собрания Видов Культур, 12301, Парк-лун Драйв, Роквилл, Мэриленд 20852 и получил номер по каталогу ATCC № 20542.

Морфологическая характеристика микроорганизмов ATCC № 20542 аналогична морфологическим характеристикам рода *Aspergillus*. В результате сравнения с известными видами установлено, что штамм принадлежит виду *Aspergillus terreus*.

Выращивание этого штамма с целью получения новых соединений осуществляется в водной среде, обычной для получения других продуктов ферментации. Такая среда содержит источники углерода, азота и неорганические

соли, которые устаиваются микроорганизмами.

Углеводы, такие как сахара, например глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, ксилоза, манитол и т.п., крахмалы, такие как крахмал зерна, например овса, риса, кукурузный крахмал, кукурузная мука крупного помола и т.п., можно использовать, как по отдельности, так и в комбинации, в качестве источников усваиваемого углерода в питательной среде. Точное количество источника или источников углеводов, которое используется в среде, зависит частично от других ингредиентов, содержащихся в среде, но в общем случае количество углеводов обычно варьируется в пределах от 1 до 6 вес.% среды. Источники углерода можно использовать по отдельности или несколько таких источников углерода используется в комбинации. В качестве источников азота в процессе ферментации можно использовать протеиновые материалы. К соответствующим источникам азота относятся, например, гидролизаты дрожжей, первичные дрожжи, мука крупного помола соевых бобов, мука семян хлопка, гидролизаты казеина, насыщенный ликер кукурузы, растворимые вещества из дистиллятора или томатная паста и т.п. Источники азота используются либо по отдельности, либо в комбинации в количествах от 0,2 до 6 вес.% от веса водной среды.

К питательным неорганическим солям, которые можно использовать в среде для выращивания культуры, относятся обычные соли, содержащие натрий, калий, аммоний, кальций, фосфат, сульфат, хлорид, карбонат и другие подобные ионы. Они также могут содержать следы металлов, таких как кобальт, марганец, железо и магний.

Ферментация осуществляется при 20–37°C. Однако с целью получения оптимальных результатов ферментация осуществляется при 22–30°C. pH питательной среды, предназначенной для культивирования *Aspergillus* и получения новых соединений, может варьироваться от 6,0 до 8,0.

Хотя новые соединения вырабатываются культурой как на поверхности, так и в погруженном состоянии, процесс ферментации осуществляется в погруженном состоянии. В небольших масштабах ферментация в общем случае осуществляется при помощи внесения на соответствующую питательную среду культуры *Aspergillus* и затем, после переноса питательной среды с привитой культурой в среду для продуцирования, ферментация осуществляется при постоянной температуре около 28°C в течение нескольких дней при периодическом встряхивании.

Ферментация инициируется в стерилизованной колбе со средой при помощи одной или нескольких стадий развития семян. Питательной средой для стадии семени может быть любая подходящая комбинация источников углерода и азота. Колба с семенами выдерживается в камере при постоянной температуре около 28°C в течение двух дней при периодическом встряхивании или до тех пор, пока рост не достигнет удовлетворительного уровня и часть полученной в результате для прививки потомства второй стадии или среды для продуцирования. Колбы с потомством промежуточных стадий, если таковые используются, культивируются по существу тем же способом, т.е. часть содержимого колбы со стадии последнего потомства используется для прививки среды для продуцирования. Колбы с привитой культурой встряхиваются при постоянной температуре в течение нескольких дней, а в конце периода инкубирования содержимое колб

подвергается центрифугированию или фильтруется.

Для реализации в более значительных масштабах ферментация осуществляется в подходящем резервуаре, снабженном мешалкой и средствами для аэрации среды ферментации. В соответствии с предлагаемым способом питательная среда загружается в резервуар и стерилизуется при помощи нагревания примерно до 120°C. После охлаждения стерилизованная среда прививается предварительно выращенными семенами (потомством) продуцирующей культуры и процесс ферментации продолжается в течение, например, 3–5 дней. Одновременно осуществляется перемешивание и/или аэрация питательной среды и поддерживается температура примерно 28°C. Этот способ биосинтеза новых соединений предназначен, в частности, для получения больших количеств.

Соединения известным способом выделяются из бульона для ферментации.

Соединения I и II можно подвергнуть гидролизу с основаниями, такими как NaOH, чтобы получить соли, такие как соли натрия соединений III и IV. Используя основания с другими приемлемыми с фармацевтической точки зрения катионами, можно получить соли этих катионов. Аккуратное подкисление солей дает оксикислоты III и IV, которые можно превратить в соединения I и II при кислотных значениях pH. Обработывая соединения I и II при помощи кислотного или щелочного катализа с металлометанолом, этанолом, пропанолом или бутанолом, или с фенил-, диметиламином или ацетиламином алканоллами, получают соответствующие сложные эфиры соединений III и IV.

Соединения III и IV (особенно III) можно выделить известным способом без использования хроматографии в форме солей аммония. Такой способ выделения является более удобным и гораздо больше приспособлен для промышленного использования, чем хроматография. Кроме того, соли соединения III и IV являются гораздо более активными, чем соединения I и II в реальных условиях с целью ингибирования процесса биосинтеза холестерина и в качестве проти-

воплесневых агентов. В действительности, оксикислоты (и их соли) являются активными формами. Следовательно, такие соли являются более предпочтительными, в частности, при использовании в форме доз. Кроме солей аммония; являются и соли тетраметиламмония и соли этилендиамина, натрия, калия, кальция, N-метилглютамина, лизина, аргинина и орнитина.

Указанные соединения являются фармакологически активными соединениями и могут применяться как лекарственные препараты стоматическим или парентеральным способом в форме капсул, таблеток, инъекций и т.п. В общем случае используется стоматический способ применения. Дозы можно варьировать в зависимости от возраста, степени заболевания, веса тела и других факторов человека, но ежедневная доза для взрослого пациента содержится в области примерно от 2 до 2000 мг (в предпочтительном варианте 2-100 мг), которая может быть разделена на две - четыре отдельные дозы. При необходимости можно использовать и более высокие дозы.

Соединения можно также использовать в качестве противогрибковых агентов.

**Пример 1.** Ферментация. Пробирка с лиофилизированной культурой *Aspergillus terreus* ATCC № 20542 открывается в стерильных условиях и содержимое суспендируется в 250 мл колбу Эрленмайера без перегородки (семенная колба 11), содержащую 40 мл среды С, которая имеет следующий состав, г:

Насыщенный кукурузный ликер 5  
Томатная паста 40  
Овсяная мука крупного помола 10  
Глюкоза 10  
Среды элементов смеси № 2 10  
Дистиллированная вода 1000 мл  
рН 6,8 при помощи NaOH. Колба с привитой культурой инкубируется в течение 24-48 ч при 28°C на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах или амплитуда 5,08 см). Часть (примерно 0,5 мл) содержимого этой колбы затем используется для прививки культуры в наклонной пробирке, содержащей среду Е. Среда Е имеет следующий состав, г:

Экстракт дрожжей 4  
Солодовый экстракт 10

Декстроза 4

Агар 20

Дистиллированная вода 1000 мл  
рН 7,0 при помощи NaOH.

Наклонная пробирка с привитой культурой инкубируется в течение 11 дней при комнатной температуре. Затем она хранится при -60°C в течение 3-4 мес. Часть содержимого этой пробирки затем суспендируется в 250-миллилитровую колбу Эрленмайера без перегородки (семенная колба 2), содержащую 40 мл среды С. Колба с привитой культурой инкубируется в течение 24 ч при 28°C на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах, 5,08 см). Приготавливаются шесть колб Эрленмайера емкостью 250 мл без перегородки, содержащих 40 мл среды С. Затем в каждую колбу прививается культура при помощи 2 мл на каждую колбу содержимого семенной колбы 2. Эти шесть колб инкубируются в течение 48 ч при 28°C на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах 5,08 см). Затем берут шесть двухлитровых колб Эрленмайера, содержащих среду F в объеме 500 мл, и в каждую колбу прививается культура при помощи содержимого семенной колбы 3. Среда F имеет следующий состав, г:

Насыщенный кукурузный 15  
Крахмал СРС 20  
Кукурузная мука грубого помола 1  
Измельченные соевые бобы 4  
Глюкоза 5  
Соевое масло 2,5  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3  
CaCO<sub>3</sub> 6  
Дистиллированная вода 1000 мл  
и при помощи NaOH.

Колбы с привитой культурой инкубируются в течение 11 дн. без перемешивания при 28°C. После инкубирования в течение 11 дн. бульон подвергается экстрагированию.

Экстрагирование.

Весь бульон рН 6,0 смешивается в смесителе Варинга с тем, чтобы разбить тяжелый слой мицелля, центрифугируется и прозрачный верхний слой декантируется. После фильтрации 10 л фильтрата экстрагируется при помощи 3 л этилацетата, в результате чего получается 1820 мл прозрачного экстракта. Второе экстраги-

рование при помощи 3 л этилацетата дает 3350 мл прозрачного экстракта. Твердое вещество бульона экстрагируется при помощи перемешивания в течение 1 ч с использованием 2 л метанола и после фильтрации получается 2100 мл фильтрата.

Порции этих экстрактов сушатся и направляются для анализа. Фильтраты испытываются как ингибиторы фермента редуктазы HMG-CoA методом, описанным Бегом, Стоником и Бревером. При этом используются ферменты, полученные в соответствии с описанием, приведенным Клейнзеком, Рангатамом и Портером. Положительный тест - ингибирование составляет более 90% при 20 мкг/мл  $IC_{50}$  составляет 2,3 мкг/мл, что указывает на присутствие очень сильного ингибитора синтеза холестерина, действующего на содержание редуктазы HMG-CoA.

Результаты анализа экстракта приведены в табл.1.

Т а б л и ц а 1

Объем, мл	Общее содержание твердых частиц, мг	Общая активность, ед.
1820	1133	1496695
3350	787	314900
2100	13,16	1144067

## Гель-фильтрация.

Весь твердый материал, полученный из первых двух экстрактов, соединяется вместе, растворяется в метаноле и фильтруется с целью удаления нерастворимых твердых частиц, 30 мл фильтрата загружается в колонку для гелевой фильтрации (2,5 × 200 см, 980 мл), заполненную материалом Сефадекс LH-20, и проба фракционируется в соответствии с размером молекул при помощи метанола, который используется в качестве растворителя. Используя индекс преломляемости и данные УФ-анализа, наилучшие фракции определяются при помощи биоанализа (см. табл.2).

Т а б л и ц а 2

Фракция	Общее содержание твердых частиц, мг	Общая активность, ед.
1	89	106271
2	278	1099680
3	779	210357

## Выделение и очистка,

Проба из фракции 2 предварительно фильтруется через слой в 1 г материала Уотерс Бондапак C18 /Поразил В и элюируется пятью объемами метанола. Метаноловый элюат концентрируется до объема 0,5 мл. Эта проба подвергается хроматографии несколько раз на материале Уотерс C18, из которого изготовлена колонна (3,9 мм 20 см), причем в качестве проявляющего растворителя используется смесь метанол: 0,05 М раствор фосфата аммония, pH 2,9, (75:25). Фракции исследуются на спектрофотометре Бекмана и те фракции, для которых максимум поглощения соответствует 236 нм с изгибами в 229 и 245 нм, соединяются и концентрируются при пониженном давлении до водного раствора. pH концентрата доводится до 6,5 при помощи 2 М раствора гидрата окиси калия и активные компоненты экстрагируются этилацетатом. Органический слой сушится, концентрируется до сухости и остаток растворяется в 0,3 мл метанола. Метаноловый раствор подвергается хроматографии и рециркулируется. Фракции, содержащие ранее элюированную компоненту, соединяются, концентрируются до водного раствора и экстрагируются хлороформом. Остаток из хлороформа помещается в метанол и растворитель выпаривается в атмосфере азота. 3,5 мг высушенного продукта, полученного таким образом, идентифицируется как оксикислота (соединение III). Фракции, содержащие вторую компоненту, соединяются и экстрагируются хлороформом. Получено 0,87 мг высушенного продукта, который идентифицирован как лактон (соединение I).

Физико-химические свойства соединения I (MSD-803) приведены ниже: т.пл. 170-171°C, молекулярный вес (масс-спектроскопия) 404; формула -  $C_{24}H_{26}O_5$  (найденно при помощи масс-спектроскопии 402,555, рассчитано 404,2563), УФ-спектр (в ацетонитриле), нм: 230,5 с E% 505,7; 237,5 с E% 576,6; 246 с E% 395,2.

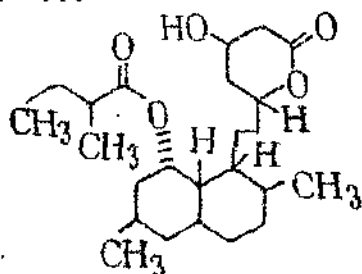
$^{13}C$  ЯМР химические сдвиги. Спектр получен в растворе  $CDCl_3$  (20,1 мг в 0,35 мл). Химические сдвиги приведены относительно внутреннего тетраметилсилана при нуле ppm, при

экспериментальных условиях импульс растворителя ( $\text{CDCl}_3$ ) имеет место в области 70,0 ppm (долей на миллион). Обнаружено 24 атома углерода, что согласуется с данными масс-спектро- скопии, они имеют следующие химичес- кие сдвиги, ppm: 11,5; 13,6; 16,0; 22,6; 24,1; 26,6; 27,2; 30,5; 32,5; 32,8; 35,9; 36,4; 37,1; 38,4; 41,3; 62,4; 67,8; 76,4; 128,4; 129,7; 131,7; 133,2; 170,8 и 177,2.

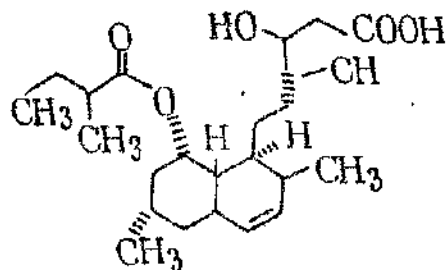
Оптическое вращение.

Характерное оптическое вращение  $[\alpha]_D^{25} = 320,7^\circ$  определяют на раство- ре 5,30 мг/мл  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Это значение получено при помощи измерения длины волны линии натрий-D.

На основе этих и других данных можно предположить, что продукт имеет следующую химическую стерео- структуру



Соответствующая оксикислота (сое- динение III) имеет структуру



Пример 2. Пробирка с лиофи- лизованной культурой *Aspergillus terreus* ATCC № 20542 открывается в стерильных условиях и содержимое суспендируется в 250-миллилитровую колбу Эрленмайера без перегородок (семенная колба), содержащую 40 мл среды С. Колба с привитой культурой инкубируется в течение 30 ч при  $28^\circ\text{C}$  на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах 4,08 см). В 250-миллилитровую колбу Эрленмайера без перегородки, содержащую 40 мл среды С, прививается культура при помощи 2 мл из колбы содержимого семенной колбы. Среда С имеет следую- щий состав.

Декстроза 45

Петонизированное молоко 24

Аутолизированные дрожжи 2,5

Полиголиколь Р2000 2,5 мл

5 Дистиллированная вода 1000 мл  
pH 7,0 при помощи  $\text{NaOH}$ .

Колба с привитой культурой инку- бируется в течение 120 ч при  $28^\circ\text{C}$  на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах 5,08 см). После 120 ч инку- бирования содержимое колбы подверга- ется экстрагированию в соответствии с процедурой из примера 1. Общая производительность составляет 21  
10 500 ед./мл.

Пример 3. Ферментация. Про- бирка с лиофилизированной культурой ATCC № 20542 открывается в стериль- ных условиях и содержимое суспенди- руется в 250 мл колбу Эрленмайера без перегородки (семенная колба), содержащую приблизительно 10 мл сре- ды, которая имеет следующий состав, г

25 Насыщенный кукурузный ликер 5  
Томатная паста 40  
Овсяная мука грубого по- мола 10  
Глюкоза 10  
Раствор следов элементов 10

30 Дистиллированная вода 1000 мл  
pH 6,8 обеспечивается при помощи  $\text{NaOH}$ .

Раствор следов элементов, мг:  
35  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1000  
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1000  
 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100  
 $\text{H}_3\text{BO}_3$  56  
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  19  
40  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200  
Дистиллированная вода (демонизи- рованная) 1000 мл

Колба с привитой культурой инку- бируется в течение 24 ч при  $28^\circ\text{C}$  на вибраторе, совершающем 220 кол./мин (размах 5,08 см). Затем в двухлит- ровую колбу Эрленмайера без перего- родки, содержащую 500 мл среды, при- вивается культура при помощи 10 мл содержимого первой стадии фермента- ции из семенной смеси. Эта колба также находится на вибраторе в тече- ние 24 ч при  $28^\circ\text{C}$ .

В бак для ферментации из нержа- веющей стали емкостью 200 гал (757 л) загружается 485 л среды, содержащей целлюлозы 4,5 вес/об., пептонизиро- ванного молока 2,5% вес/об., ауто-

лизированных дрожжей 0,25 вес/об., полигликоля — P2000 0,25% об/об. pH среды доводится до 7,0. Содержимое стерилизуется в течение 15 мин при 121°C. Затем в бак заливается один литр содержимого со второй стадии и смесь инкубируется на вибраторе, совершающем 85 кол./мин, в течение 12 ч, затем на вибраторе, совершающем 130 кол./мин в течение 84 ч при 28°C при подаче воздуха со скоростью 5 0,142 м³/мин в течение 12 ч, а затем со скоростью 10 0,34 м³/мин в течение 84 ч.

#### Экстрагирование.

Соединяются две одновременно загружаемые порции в сто гал (378 л) бульона, подкисляются при перемешивании до pH 4,1 при помощи аккуратного добавления 800 мл концентрированной соляной кислоты и экстрагируются добавлением 75 гал (284 л) этилацетата, затем перемешивание продолжается в течение 2 ч.

Затем добавляется примерно 25 футов (11,34 м кг) кремнистого вспомогательного фильтрующего материала и весь полученный шлам пропускается через 61 см фильтр-пресс. Дополнительно 75 гал (284 л) этилацетата используется для промывки спрессованной лепешки и продолжения экстрагирования при помощи обращения направления подачи этилацетата через пресс. Эта процедура осуществляется четыре раза. Затем весь промывочный растворитель сливается из пресса и соединяется с первым фильтратом. Двухфазной смеси (фильтрату) дают возможность отстояться и водный слой удаляется. Слой этилацетата промывается при помощи 10 гал (37,85 л) деионизированной воды, фазам дают возможность разделиться и экстракты этилацетата концентрируются под вакуумом до примерно 10 гал (37,85 л).

#### Лактонизация.

Для того, чтобы осуществить циклизацию любого соединения IV в экстракте в соединение II производится следующая азеотропная обработка.

Экстракты этилацетата из дополнительных 300 гал (1135,5 л) бульона добавляются в экстракт и объем снижается до примерно 30 гал (113,5 л) бульона добавляются в экстракт и объем снижается до примерно 30 гал (113,5 л) при помощи вакуумной

дистилляции. Добавляется примерно 50 гал (189 л) толуола и содержимое концентрируется под вакуумом до объема 32 гал (121 л), эта стадия повторяется. Затем добавляется достаточное количество нового толуола, чтобы довести объем до 75 гал (284 л). Без использования вакуума содержимое доводится до дефлегмирования и это состояние поддерживается в течение 2 ч при температуре более 106°C.

Этот раствор далее концентрируется под вакуумом до небольшого объема, который затем концентрируется до маслянистого остатка в большом роторном испарителе под вакуумом.

#### Хроматография на силикагеле.

Полученные экстракты освобождаются от других растворителей добавлением 2 гал (7,5 л) метиленхлорида и повторной концентрацией до масла.

Маслянистый остаток растворяется примерно в 5 гал (18,9 л) смеси этилацетат-метиленхлорид (30/70 об./об.), а затем приготавливается шлам при помощи добавления 2,8 кг силикагеля.

Шлам наносится ровным слоем на верхнюю часть колонны из силикагеля с размерами 30,5 см 127 см, заполненную той же смесью растворителей.

Элюирование производится смесью этилацетат-метиленхлорид (40/60 об./об.) со скоростью 800 мл/мин. Головной прогон составляет 10 гал (37,85 л), затем собираются фракции каждая объемом в 4 гал (15,141 л).

Фракции от 6 до 10 включительно концентрируются под вакуумом до маслянистого остатка, который растворяется в горячем этилацетате, обрабатывается обесцвеченным углеродом, фильтруется пока горячий и затем охлаждается. Кристаллы MSD 803 (соединение I) выделяются фильтрацией, а маточные растворы концентрируются до масла и подвергаются хроматографии.

Повторная хроматография на силикагеле.

Остаточные маточные растворы из одного и того же экстракта бульона, эквивалентные по производительности дополнительным 600 гал (2271 л) сырья для ферментации, соединяются в соответствии с приведенным в растворе метиленхлорида. Половина этого раствора используется для дальней-

шей хроматографии на силикагеле. Исследование небольшой порции показывает, что общее содержание твердых частиц составляет 325 г. Раствор обрабатывается 40 г обесцвеченного углерода, фильтруется и лепешка промывается метиленхлоридом. Соединенные фильтрат и промывочные растворы концентрируются под вакуумом до маслянистого остатка. Остаток вновь растворяется в 800 мл смеси этилацетат-метиленхлорид (30-70 об./об.) и раствор превращается в шлам добавлением 225 г силикагеля. Шлам загружается в верхнюю часть слоя силикагеля колонны с размерами 14 35 см, заполненной той же смесью растворителей. Проявление осуществляется смесью этилацетат-метиленхлорид (40/60 об./об.). Головной прогон, составляющий 3 л, сбрасывается, а затем собираются фракции объемом 800 мл каждая.

Хроматография при обращенно-фазовом заполнении.

40 мл из 12 фракции хроматографической процедуры концентрируется до масла весом 500 мг и затем масло вновь растворяется в 5 мл ацетонитрила. Этот ацетонитрильный раствор загружается в хроматографическую колонку из нержавеющей стали с размерами: внешний диаметр 1,59 см, длина 1,8 м, заполненную препаративной обращенной фазовой жидкостью для колонн хроматографии Бонданак С 18/Поразил В. Колонна элюируется смесью, содержащей 55% об./об. ацетонитрила и 45% и 0,05 М раствора фосфата аммония, pH 3. Объем элюирования между 1360 и 1700 мл собирается на основе исследования показателя преломления. Органический растворитель удаляется под вакуумом и остаточный водный раствор экстрагируется этилацетатом. После удаления под вакуумом этилацетата остается 120 мг соединения, которое кристаллизуется из концентрированного ацетонитрильного раствора, в результате чего образуются кристаллы MSD 883 (соединение II), т.пл. 129-131°C, молекулярный вес 406, найдено при помощи спектроскопии 406, 2706, рассчитано 406, 2719.

Оптическое вращение.

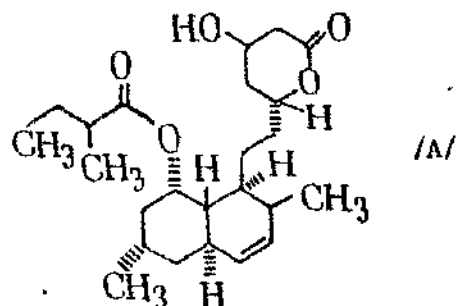
Характерное оптическое вращение  $[\alpha]_D^{25} = 148,6^\circ$  определяют на раство-

ре 5,23 мг/мл  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Это значение получено при помощи измерения длины волны линии натрий-D.

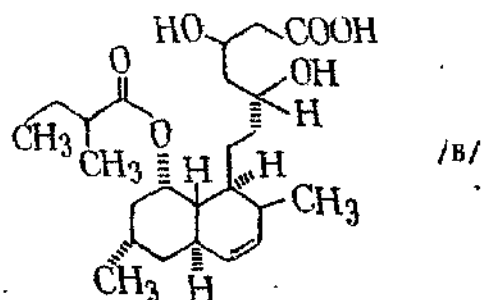
$^{13}\text{C}$  ЯМР химические сдвиги ( $\text{CDCl}_3$ ), ppm:

11,8; 14,9; 16,5; 21,1; 23,1; 26,7 (2C); 30,9; 31,3; 33,0; 35,7; 35,9; 37,4; 48,5; 38,6; 41,9 (2C); 62,3; 70,1; 76,5; 131,0; 132,6, 171,2 и 176,7.

На основании этих и других данных можно предположить, что продукт имеет следующую химическую стерео-структуру



Соответствующие оксикислоты (соединение IV) тогда имеет структуру



Пример 4. Ингибирование в пробирке редуكتазы HMG кофермента А.

Используется модифицированный метод Бега. Модификация заключается в инкубировании фермента с ингибитором в течение 5 мин перед иницированием реакции с субстратом. При работе с такими сильными ингибиторами, какими являются новые соединения, стандартная процедура, в соответствии с которой фермент добавляется только в смесь ингибитор-субстрат, дает нелинейную кинетику.

Используя модифицированную процедуру, соль натрия соединения IV дает показатель  $\text{IC}_{50}$  ингибирования редуктазы HMG-CoA, равный  $2,7 \cdot 10^{-9}\text{M}$ , по сравнению с  $5,4 \cdot 10^{-9}\text{M}$  для соединения ML 236 В.

Ингибирование в реальных условиях синтеза холестерина (соединение II).



Нескольким группам самцов крыс Голдмана вводится либо 5% эмульфор в соляном растворе, либо испытываемое соединение в эмульфоре через трубку, введенную в желудок. Спустя 1 ч вводится ВП 80 мCi  $^{14}\text{C}$  ацетата/кг. Затем спустя 50 мин производится анализ крови крыс и определяется содержания  $^{14}\text{C}$  холестерина, как меры синтеза холестерина:

Доза, мг/кг	Ингибирование, %
0,15	38
0,6	51
1:2	70

Пример 5. Сравнение соединений I, II и ML-236B, как ингибиторов синтеза холестерина в клеточной культуре.

Используется модифицированная процедура А.У. Албертса и др. для измерения количества биосинтезированного  $^{14}\text{C}$  холестерина из  $^{14}\text{C}$  уксусной кислоты в клетках мышей

L-M в культуре. Испытуемое соединение в 10 мкл диметилсульфоксида добавляется в монослойные культуры с  $5^{14}\text{C}$  ацетата. После 3 ч инкубирования клетки омываются и  $^{14}\text{C}$  холестерин экстрагируется и выделяется при помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир - диэтиловый простой эфир - уксусная кислота (75:25:1). Область на пластинке, содержащая  $^{14}\text{C}$  холестерин, устанавливается с использованием оставшегося пятна на этой области I, и содержания  $^{14}\text{C}$  определяется при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика.

При помощи этой модифицированной процедуры устанавливается, что соединение II дает значение  $\text{IC}_{50}$  для ингибирования редуктазы HMG-CoA, равное 17 нм, по сравнению с 22 нм для соединения I и 46 нм для соединения ML-236B.

Редактор Н. Бобкова      Составитель В. Романова  
Техред В. Кадар      Корректор М. Пожо

Заказ 4635/60

Тираж 490

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4

