



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93552 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
C12P 17/02
C12R 1/465 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФЕРМЕНТАТИВНЕ ОДЕРЖАННЯ ЛІПСТАТИНУ

1

(21) а200814663
(22) 22.05.2007
(24) 25.02.2011
(86) РСТ/ЕР2007/004529, 22.05.2007
(31) 06010470.0
(32) 22.05.2006
(33) ЕР
(46) 25.02.2011, Бюл.№ 4, 2011 р.
(72) ГАСПАРИК АЛЕС, SI, СЛАДІК ГОРДАН, SI,
БЕНІСКИ СВАЖЕЛЬ НЕДА, HR, ПЕЛКО МІТЬЯ, SI,
РАСПОР ПЕТЕР, SI, ПЕТКОВІЧ ГРВОЄ, SI, ФЮЙС
ШТЕФАН, SI
(73) КРКА, SI
(56) ЕР А 0803576, 29.10.1997
WO А 03/048335, 12.06.2003
(57) 1. Спосіб одержання ліпстатину, що включає
стадії:
створення середовища, що містить
а) не менше 0,3 мас. % лінолевої кислоти або її
ефіру(ів), або солі(ей),
б) більше 1 мас. % масла;
інокуляції середовища зерна культури, що вклю-
чає мікроорганізм, продукує ліпстатин;
культивування і, можливо, виділення ліпстатину.
2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що мас-
ло вибирають з групи, що складається з натураль-
ного масла, синтетичного масла і їх сумішей.

2

3. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що нату-
ральне масло вибирають з групи, що складається
з олії соєвих бобів, соняшникової олії, рапсової
олії, пальмової олії, льняної олії і олії насіння куку-
рудзи або їх сумішей.
4. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що мік-
роорганізм, продукує ліпстатин, відноситься до
сімейства стрептоміцетів.
5. Спосіб за п.4, який відрізняється тим, що мік-
роорганізм, продукує ліпстатин, є *Streptomyces*
toxytricini або *Streptomyces virginiiae*.
6. Спосіб за п.5, який відрізняється тим, що мік-
роорганізм, продукує ліпстатин, є *Streptomyces*
toxytricini CBS 566.68.
7. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що се-
редовище включає щонайменше 0,2мас.% ліноле-
вої кислоти або її ефіру(ів), або солі(ей).
8. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що рО₂
підтримують на рівні від 0 до 10% після того як
первинна фаза зростання по суті закінчилася.
9. Спосіб за будь-яким з пп.1-8, який відрізняєть-
ся тим, що лейцин і/або джерело азоту додають у
вигляді органічної або неорганічної солі певного
складу.
10. Спосіб одержання тетрагідроліпстатину, що
включає одержання ліпстатину за будь-яким з
пп.1-9 і стадію перетворення ліпстатину на тетра-
гідроліпстатин.

Даний винахід відноситься до одержання вто-
ринних метаболітів, зокрема, до одержання ліпс-
татину. У даному винаході описаний спосіб, що
дозволяє одержувати вказаний інгібітор ферменту
з високим виходом і високою чистотою.

Ожирінням страждають більше 30% дорослого
населення промислового світу, що є важливою
проблемою охорони здоров'я суспільства, оскільки
збільшення маси тіла може бути небезпечним і
приводити до різних проблем зі здоров'ям. Прик-
лади хвороб, пов'язаних з ожирінням, включають
діабет типу II, гіпертонію, гіперліпідемію, ішемічну
хворобу серця, удар, рак грудей і товстої кишки,
апноє під час сну, захворювання жовчного міхура,

гастроезофагальну рефлюксну хворобу, жирову
інфільтрацію печінки, подагру, тромбоемболію.
Ожиріння є одним з основних секторів серцево-
судинних захворювань. Рівні холестерину, кров'я-
ного тиску, кров'яного цукру і сечової кислоти у
людей, страждаючих ожирінням, зазвичай вищі,
ніж у людей з нормальною вагою. Смертність від
ішемічної хвороби серця серед людей з надмірною
вагою, як правило, також вища.

Вирішальними чинниками ожиріння є соціальні
чинники, фізіологічні чинники, генетичні чинники,
чинники, обумовлені розвитком, і пониженою фізи-
чною активністю. Компоненти комплексної програ-
ми по зниженню ваги включають медичну оцінку,

(13) C2

(11) 93552

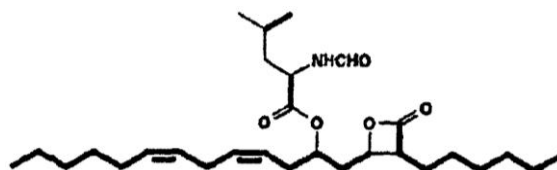
(19) UA

модифікацію харчування і дієти, дієтологічне виховання, когнітивне переструктурування, збільшення фізичної активності і довгостроковий лікарський нагляд.

Сучасні лікарські препарати, направлені на втрату ваги, можна розділити на дві групи залежно від механізму дії: препарати, що впливають на центральну нервову систему і препарати, що не впливають на центральну нервову систему. Перший тип може викликати зменшення ваги, впливаючи на певні нейротрансмітери і знижуючи, таким чином, апетит, але має побічні ефекти, що полягають у зміні кров'яного тиску і частоти ударів серця, навіть якщо ці препарати приймають протягом короткого часу. Другий тип є засобами, що знижують активність ліпаз, які пригнічують темп абсорбції жиру шляхом інгібування ліпаз. Ці ферменти здатні гідролізувати тригліцериди з утворенням гліцерину і вільних жирних кислот в ході процесу, який називається ліполіз. Утворені молекули (зокрема, вільні жирні кислоти), виступають як переносимі з кров'ю носії енергії, які можуть використовуватися печінкою, скелетною мускулатурою і іншими органами для аеробного дихання.

Приклади другого типу лікування ожиріння за допомогою інгібіторів ліпаз включають застосування таких сполук як ліпстатин і похідні ліпстатину.

Ліпстатин є сильним інгібітором ліпази підшлункової залози і є попередником орлістату, відомого з EP 0129748. Ліпстатин містить бета-лактонове кільце, що відповідає за необоротне інгібування ліпаз, яке несе два аліфатичні залишки з довжиною ланцюга 6 і 13 атомів вуглецю. Один з бічних ланцюгів містить дві ізольовані подвійні сполуки і гідроксигрупу, етерифікування з утворенням N-форміллейцину.

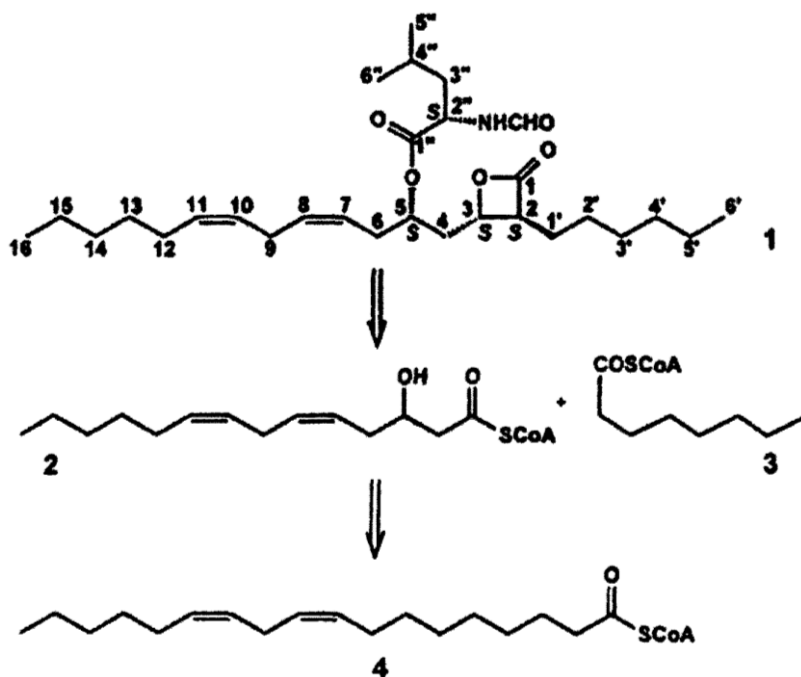


Було висловлено припущення, що ліпстатин можна синтезувати шляхом конденсації Клайзена октаноїлу-CoA з 3-гідрокситетрадеканойлом-CoA, утвореним з лінолевої кислоти. Тетрагідропохідна ліпстатину, тетрагідроліпстатин (Орлістат®, Ксенікал), застосовують для лікування важкого ожиріння, причому він утворює ковалентний аддукт з сериновим угрупованням ліпази підшлункової залози людини в результаті трансестерифікації. Ліпстатин і його похідні діють шляхом індукції підвищення екскреції жирів з калом (стеаторея), що призводить до зниження біодоступності проковтуваного жиру.

Хімічний синтез похідного ліпстатину тетрагідроліпстатину описаний, наприклад, в Hanessian, S. Et al. (J. Org. Chem., 58 (1993), p. 7768-81) і включає декілька стадій синтезу із загальним виходом 38%.

Однак, складні вторинні метаболіти, такі як ліпстатин, переважно одержують біохімічними способами з використанням відповідних штамів. Прикладом такого штаму, здатного до продукції ліпстатину, є *Streptomyces toxytricini* (Weibel E. et al., J. Antibiot. (1987), p. 1081).

Закладений в основу біосинтетичний шлях можна проілюструвати наступною ретробіосинтетичною схемою (1: ліпстатин; 2: 3-гідроксі- γ -5,8-тетрадекадієноїл-CoA; 3: октаноїл-CoA і 4: ліноїл-CoA).



Одержання ліпстатину біохімічними способами, такими як спосіб ферментації, розкрито, наприклад, в EP 0129748. Недоліками способу ферментації, розкритого у вказаному посиланні, є те, що ліпстатин міститься в малих кількостях - декілька міліграмів на літр - що робить подальше виділення і очищення важким і складним.

У EP 0803576 (Roche) розкритий спосіб, при якому деякі попередники ліпстатину, а саме, лінолева кислота, каприлова кислота і N-форміл-L-лейцин або, переважно, L-лейцин інокулювали у ферментацію. Вихід ферментації був малим унаслідок токсичності жирних кислот, і кількості живильного розчину були дуже маленькими. Подачу лінолевої кислоти і каприлової кислоти і/або їх солей переважно виконували так, щоб їх концентрація в сироватці залишалася нижчою, ніж 1000 міліграмів на літр. У даному способі ферментації застосовується середовище, що по суті містить жирів і масел, оскільки вони приводять до неконтрольованого вивільнення жирних кислот при ферментації і великої кількості залишку в кінці ферментації.

У WO 03/048335 (Teva) розкритий спосіб одержання ліпстатину, заснований на середовищі ферментації, що містить масло і джерело вуглецю, що засвоюється, де масове співвідношення масла і засвоєного джерела вуглецю підібране так, щоб регулювати біосинтез ліпстатину мікроорганізмом, причому для регулювання в'язкості бульйону ферментації вводять емульгатор. Переважна кількість масла, що завантажуються в бульйон ферментації, складає не більше 5 мас.%. Застосування запропонованої кількості масла приводить до збільшення кількості масляних залишків в кінці процесу, що може бути несприятливим для подальшої обробки. Окрім цього, в описаному способі серед основних параметрів культивування ключовим чинником була швидкість перемішування, і переважно при культивуванні її підвищували для того, щоб компенсувати понижений рівень кисню.

Завдання даного винаходу, таким чином, полягає в створенні покращеного способу одержання ліпстатину з виходом, що дозволяє допустиме виділення. Інше завдання полягає в забезпеченні високого виходу ліпстатину.

В ході багатьох досліджень, які привели до створення даного винаходу, автори даного винаходу провели експерименти з хімічним синтезом і способами ферментації, що дозволило їм в результаті виявити спосіб ферментації, який дозволяє вирішити вищеописану задачу. Вказаний спосіб включає стадії способу одержання ліпстатину, включаючи стадії створення середовища, що містить не менше 0,3мас.% лінолевої кислоти або її ефірів або солей і більше 1мас.% масла, інокуляції середовища зерна культури, що містить мікроорганізм, продукує ліпстатин, з подальшим культивуванням, і, можливо, виділення ліпстатину. У даному способі за даним винаходом стадію основного культивування, тобто, відповідну стадію ферментації, направлену на одержання ліпстатину, виконують в середовищі, що включає лінолеву

кислоту або її ефіри або солі і масло в певній кількості.

Про лінолеву кислоту, як і про деяких інші ненасичені жирні кислоти, відомо, що вона проявляє високу токсичність по відношенню до штам-продуценту. Цей ефект обумовлюється штамом-продуцентом, що викликається, епоксидуванням подвійного зв'язку лінолевої кислоти ферментами, такими як монокигеназу P450, які перетворюють подвійний зв'язок на високотоксичний епоксид. Повідомляється, що токсичні рівні лінолевої кислоти для зазвичай вживаного штам-продуценту *Streptomyces toxytricini* складають від 0,23 до 0,3 мас.%.

Автори даного винаходу несподівано виявили, що не дивлячись на цей відомий ефект, можна одержати вищий вихід ліпстатину шляхом створення середовища для стадії основного культивування, що включають кількості лінолевої кислоти, що знаходяться в діапазоні, який імовірно є токсичним для штамів-продуцентів *Streptomyces toxytricini* або *Streptomyces virginiae*, тобто, більше 0,3 мас.% лінолевої кислоти і щонайменше 1 мас.% масла, яке навіть може містити додаткові кількості лінолевої кислоти.

У даному способі згідно винаходу стадію основного культивування, тобто, відповідну стадію культивування, направлену на одержання ліпстатину, можуть виконувати в умовах обмеженого постачання кисню, тобто, в мікроаерофільних умовах, без необхідності збільшувати швидкість перемішування для підтримки рівня розчиненого кисню більше 10%.

Не обмежуючись конкретною теорією, нині вважають, що одночасне застосування масла і лінолевої кислоти дає комбінований ефект, який в результаті призводить до зниження токсичності лінолевої кислоти відносно штам, що застосовується для одержання ліпстатину. Це дозволяє проводити основну стадію культивування у присутності такої кількості лінолевої кислоти, яка б була токсичною у іншому випадку. Попередник ліпстатину - лінолева кислота - у свою чергу принаймні частково метаболізується штамом-продуцентом з утворенням ліпстатину, що приводить до вищого виходу даного інгібітору ліпаз.

Згідно втіленню даного винаходу запропонований спосіб одержання ліпстатину. Даний спосіб включає стадії (i) створення середовища, що містить не менше 0,3мас.% лінолевої кислоти або її ефіру(ів) або солі(ей) і більше 1мас.% масла, (ii) додавання зерна культури, включаючої мікроорганізм, продукує ліпстатин, (iii) культивування і (iv), можливо, виділення ліпстатину.

Важливо розуміти, що спосіб за даним винаходом можна виконувати в будь-якому типі посудини для ферментації, наприклад в колбі або ферментері.

Середовище може бути будь-яким середовищем, відповідним для стимулювання зростання мікроорганізмів. Середовище може бути синтетичним середовищем, тобто, містити тільки певні хімічні речовини, або комплексне середовище, тобто, середовище, що містить щонайменше один інгре-

дієнт невизначеного хімічного складу, такий як дріжджовий екстракт або пептон. При використанні тут виразу "хімічно визначене середовище" означає середовище, яке не містить джерел азоту або вуглецю, що не ідентифікуються, таких як тваринний або рослинний білок або композиції гідролізату білків, або комплексних джерел вуглецю, таких як, наприклад, мелясу або рідкий кукурудзяний екстракт, але в якому джерелами азоту є чітко визначені неорганічні або органічні сполуки, такі як аміак або амінокислоти, а джерелом вуглецю є чітко визначений цукор, такий як глюкоза. Окрім цього, таке синтетичне середовище містить мінеральні компоненти, такі як солі, наприклад, сульфати, ацетати, фосфати, і хлориди лужних лужноземельних металів, вітаміни і живильні мікроелементи. Тут приведені приклади хімічно визначеного середовища для цілей даного винаходу. Важливо розуміти, що ці середовища є лише прикладами. Фахівець в області техніки зможе створити інші середовища, що дозволяють культивувати рекомбінантні молочнокислі бактерії у вищеописаних умовах культивування.

Середовище включає відповідне джерело вуглецю і відповідне джерело азоту, забезпечуючий мікроорганізм сполуками, що містять вуглець і азот, таким чином, що мікроорганізм може використовувати/конвертувати ці сполуки для росту/розвитку/размноження і продукції вторинних метаболітів, що є метаболічними сполученнями, не важливими для нормального росту, розвитку і розмноження вказаного мікроорганізму.

Як джерела азоту можуть виступати цукор або вуглеводи будь-якого типу, такі як, наприклад, глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтоза, меляс, крохмаль і целюлоза. Альтернативою джерелу вуглецю є масла і жири, такі як, наприклад, масло соєвих бобів, соняшникова олія, масло земляного горіха і кокосове масло, або жирні кислоти, такі як, наприклад, пальмітинова кислота, стеаринова кислота і ліолева кислота, або спирти, такі як, наприклад, гліцерин або етиловий спирт, і/або органічні кислоти, такі як, наприклад, оцтова кислота. Ці речовини можна використовувати окремо або у вигляді суміші.

Як джерело азоту розглядають будь-яку(будь-які) органічну(і) азотовмісну(і) речовину(и), такі як пептони, дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, екстракт солоду, рідкий кукурудзяний екстракт, муку з соєвих бобів і сечовину, або неорганічні сполуки, такі як сульфат амонію, хлорид амонію, фосфат амонію, карбонат амонію і нітрат амонію. Джерела азоту можна використовувати індивідуально або у вигляді суміші. Джерела азоту також можна додавати у формі, яка робить їх відповідними для контролю pH в реакційній посудині.

Концентрації джерел вуглецю і джерел азоту залежать від типу мікроорганізму і вибраних умов культивування. Джерело азоту і/або джерело вуглецю в культурі підтримують на заздалегідь вибраному рівні концентрації, що становить щонайменше близько 0,5 гр/л, шляхом контрольованої подачі відповідної(их) сполуки(к) способом періодичного підживлення або шляхом подачі розчину в ході безперервного процесу культивування. Кон-

центрація вуглецю і, незалежно від нього, джерела азоту в середовищі культивації може, переважно, складати щонайменше 5гр/л, переважніше щонайменше 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 або 100гр/л.

Культуральне середовище може також містити джерело фосфору, наприклад, фосфорну кислоту, калію дигідрофосфат, дикалію гідрофосфат, або відповідні солі і/або солі металів, що містять натрій такі як, наприклад, сульфат магнію або сульфат заліза, які необхідні для росту. На додаток до вищезгаданих речовин також можна використовувати важливі для росту речовини, такі як амінокислоти або вітаміни. У культуральне середовище також можна додавати відповідні попередники, зокрема, для продукції вторинних метаболітів.

Вищезгадані речовини можуть додавати в культуру у вигляді разового завантаження, або їх можуть додавати відповідним чином протягом культивування. Середовище може включати інші компоненти, такі як вітаміни, емульгатори або антивсенівателі. Окрім цього, вищезгадані сполуки можуть бути присутніми в середовищі у відповідних необхідних концентраціях. Описи культурального середовища для різних мікроорганізмів можна знайти в довіднику "Вказівки по методам загальної бактеріології" ("Manual of Methods for General Bacteriology" - American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981) або, для актиноміцетів або *Streptomyces*, у довіднику "Практична генетика *Streptomyces*" ("Practical *Streptomyces* genetics" Kieser, T., Bibb, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000, John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom), приведеного тут як посилання.

Кількість/завантаження джерела вуглецю, джерела азоту або будь-яких інших відповідних складових середовища можна контролювати шляхом під'єднування або з'єднання подачі з будь-яким сенсорним пристроєм, здатним визначати умови в біореакторі, такі як pH або концентрація вторинного метаболіту. Таким чином, подача, наприклад, глюкози або попередника ліпстатину активується засобами, контролюючими автоматичне додавання вказаних сполук. Ці засоби можна також використовувати в безперервному процесі.

Для того, щоб контролювати рівень pH в культурі доцільно використовувати основні сполуки, такі як гідроксид натрію, гідроксид калію, аміак, водний розчин аміаку, або кислі сполуки, такі як фосфорна кислота або сірчана кислота. Для того, щоб контролювати утворення піни можуть використовувати антивспінювачі, такі як, наприклад, полігліколеві ефіри жирної кислоти. Для того, щоб підтримувати аеробні умови, якщо це бажано, в культуру вводять кисень або газові суміші, що містять кисень, такі як, наприклад, повітря. Температура культури складає, в нормі, від 20 до 40°C, переважно від 28 до 32°C. Культивування зазвичай продовжують до того моменту, поки не утворюється максимальна кількість бажаного продукту, яка може досягатися в період часу від приблизно 10 годин до приблизно 200 годин.

Попереднє зерно культура може містити ті ж складові, що і середовище. Однак, в деяких випадках бажано, щоб в основній культурі починалася

продукція або надпродукція вторинного метаболіту, що є стресовою ситуацією для мікроорганізму і негативно впливає на життєво-важливі функції. У такому разі композиція основного середовища і зерна культури може бути різною.

Мікроорганізм, продукує ліпстатин, може бути будь-який мікроорганізм, здатний до продукції вказаної речовини, включаючи також генетично модифіковані мікроорганізми. Прикладом мікроорганізму, продукує ліпстатин є *Streptomyces toxytricini* (Weibel E. Et al., J. Antibiot. (1987), p.1081). Однак, існують інші стрептоміцети і актиноміцети, здатні продукувати цю речовину.

У переважному втіленні штамми-продуценти включають *Streptomyces toxytricini* CBS 314.55, CBS 566.68, ATCC 19813, ATCC 19928 і *Streptomyces virginiae* CBS 314.55, які були одержані або Американською Колекцією Типових Культур (American Type Culture Collection, ATCC; USA), або Центральним Бюро Грибкових Культур (Centraalbureau for Schimmelcultures, CBS; Netherlands).

Культивування передбачає будь-який вид культивування мікроорганізму з використанням загальновідомих способів, включаючи хемостат, періодичне культивування, культивування з підживленням і так далі, наприклад, відповідні умови, що сприяють росту і/або продукції вторинного метаболіту.

Відповідні способи культивування і очищення вторинних метаболітів, таких як ліпстатин, з середовища ферментації відомі фахівцям. Екстракцію можна виконувати, наприклад, у водному розчині з відповідними органічними розчинниками, що описані, наприклад, в EP 1028115, включеному сюди шляхом посилання.

Способи визначення ліпстатину або його похідних відомі з рівня техніки. Аналіз можна проводити, наприклад, шляхом зворотньо-фазової високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням відповідної колонки і відповідного режиму роботи (Interstil C-18, мобільна фаза: ацетонітрил:Н₃РО₄, детекція 200нм).

Середовище містить більше 0,3мас.% лінолевої кислоти і щонайменше 1мас.% масла. Масло може бути будь-яким маслом синтетичного або натурального походження, або їх сумішшю, композиції яких і способи їх одержання відомі фахівцям. Прикладами відповідних масел є соєва олія, пальмова олія, соняшникова олія, льняна олія, рапсова олія і олія насіння кукурудзи.

Переважно, в склад включають більше 0,3мас.% і не більше 10мас.% лінолевої кислоти. Незалежно від кількості лінолевої кислоти кількість масла може варіювати. Переважно, в склад включають більше 1мас.% і не більше 5мас.% масла.

Згідно переважному втіленню даного винаходу, джерелом вуглецю є цукор, вибраний з групи, що складається з глюкози, фруктози і гліцерину. Переважно, як джерело глюкози використовують гліцерин. Концентрація гліцерину в культуральному середовищі складає, переважно, щонайменше 5гр/л, переважніше щонайменше 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 або 100гр/л.

Згідно ще одному втіленню даного винаходу, джерелом азоту є дріжджовий екстракт або пептон. Переважно, як джерело азоту використовують дріжджовий екстракт. Концентрація дріжджового екстракту в культуральному середовищі складає, щонайменше, 1гр/л, переважніше, щонайменше 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 або 25гр/л.

Згідно ще одному втіленню, мікроорганізмом, продукує ліпстатин, є *Streptomyces toxytricini*. Відповідні композиції середовища і умови росту для вказаного штаму можна знайти, наприклад, в збірнику "Практична генетика *Streptomyces*".

Згідно переважному втіленню, саме зерно культури може включати щонайменше 0,2 мас.% лінолевої кислоти, яка, як несподівано було виявлено авторами даного винаходу, надає стимулюючий ефект на кількість ліпстатину, що одержується в ході основного культивування. Переважно, в зерні культури використовується кількість лінолевої кислоти, що становить щонайменше 0,25мас.%, переважно, 0,3мас.%, 0,35мас.%, 0,4мас.%, 0,45мас.% або 0,5мас.%.

Автори даного винаходу виявили, що стадію основного культивування можна також виконувати в анаеробних умовах, з одержанням навіть великих кількостей ліпстатину. Це є несподіваним відкриттям унаслідок того факту, що *Streptomyces toxytricini* і інші продукує ліпстатин актиноміцети є строго аеробними мікроорганізмами, що вимагають для росту мінімальної кількості кисню. Згідно ще одному переважному втіленню, стадію культивування виконують в анаеробних умовах.

Згідно ще одному втіленню даного винаходу, додають лейцин. Додавання даної сполуки як попередника біосинтезу ліпстатину покращує вихід, оскільки продукція домішок, таких як метіонінліпстатин, знижується. Переважно в склад включають більше 10-4мас.% і не більше 2,0мас.% лейцину. Було виявлено, що особливо переважним є додавання лейцину в ході підживлення з швидкістю від 10-4мас.% до 10-2мас.% за годину. Слід розуміти, що лейцин, як і будь-яка інша сполука, що подається, може бути представлений в чистому вигляді, або, альтернативно, розбавлений, наприклад, водою.

Автори даного винаходу також виявили, що додавання джерела азоту у вигляді органічної або неорганічної солі визначеного, тобто відомого, складу має сприятливий ефект на вихід. Поза зв'язком з якою-небудь теорією передбачається, що так звані комплексні сполуки, такі як пептон або дріжджовий екстракт, містять інгредієнти, що певною мірою інгібують біосинтез ліпстатину. Прикладом органічної або неорганічної солі певного складу є сіль амонію, така як сульфат амонію, яка, як було встановлено, є особливо прийнятною, оскільки з одного боку збільшуються виходи ліпстатину, і з іншого боку сульфат амонію можна використовувати, щоб контролювати рН в реакційній посудині. Найкращих результатів можна добитися при додаванні лейцину, а також органічної або неорганічної солі певного складу.

Цей факт дозволяє далі припускати, що в цілому додавання будь-якої складної речовини (будь-якого невідомого складу) слід уникати, оскі-

льки, згідно ще одному переважному втіленню, жоден з компонентів, що використовуються в даному способі, не має складного, тобто, невизначеного складу. Приклади подібних середовищ такого відомого складу відомі фахівцям.

Згідно одного з втілень даного винаходу, ліпстатин можна перетворювати на його похідні способом, відомим з рівня техніки. Відповідним похідним є, наприклад, тетрагідроліпстатин. Альтернативно, будь-яка фармацевтично прийнятна або прийнятна з погляду вживання сіль ліпстатину, тетрагідроліпстатину або іншого похідного ліпстатину охоплюється терміном "його похідні". Переважно похідною ліпстатину є тетрагідроліпстатин.

Згідно одного з втілень даного винаходу, вказаним маслом є рослинна олія, вибране з групи, що складається з соєвої олії, пальмової олії, соняшникової олії, льняної олії, рапсової олії і олії насіння кукурудзи, або їх суміш. Переважно використовують соєві боби.

Наступні приклади ілюструють винахід, не обмежуючи його.

Приклад 1.

а.) Спосіб культивування зерна культури

Склад середовища для зерна культури наступний:

Мука соєвих бобів	10гр
Гліцерин	20гр
Дріжджовий екстракт	5гр
Водопровідна вода 1 л	1л

Рівень pH довели до 7 за допомогою 10% NaOH. 5мл цього середовища заповнювали в пробірку на 50мл, закривали плівковою пробкою і стерилізували при 121°C протягом 20 хвилин. Стерилізоване середовище для інокуляту інокулювали суспензією спор *Streptomyces toxytricini*, і інкубували при 28°C протягом 20-30 годин в аеробних умовах.

б.) Спосіб основної ферментації

Приблизно 10 про. % вищеописаного зерна культури використовували для інокуляції пробірки на 50 мл, яка містила 5 мл середовища ферментації.

Склад середовища ферментації наступний:

Мука соєвих бобів	32г
Гліцерин	20г
Лецитин	14,0г
CaCO ₃	2,0г
MES	2г
Соєва олія	10г
Лінолева кислота	30г
Водопровідна вода	1л

pH середовища ферментації перед стерилізацією довели до 7,4 за допомогою 10% NaOH. Стерилізацію здійснювали при 121°C протягом 20 хвилин. Ферментацію проводили при 28°C протягом 6-7 днів в аеробних умовах.

Після ферментації протягом 144год. концентрація ліпстатину склала 417±55мл/л.

Приклад 2.

Повторили приклад 1 з тим виключенням, що до складу середовища для зерна культури додали 2 грами лінолевої кислоти.

Після ферментації протягом 144год. концентрація ліпстатину склала 556±81мл/л.

Приклад 3.

а.) Спосіб культивування зерна культури

Відтворили спосіб культивування зерна культури згідно Прикладу 1 з тим виключенням, що середовище для інокуляту інокулювали суспензією спор *Streptomyces virginiae*.

б.) Спосіб основної ферментації

Приблизно 10мас. % вищеописаного зерна культури використовували для інокуляції 40мл середовища ферментації, дозованого в колбу Ерленмейєру об'ємом 500мл.

Склад середовища ферментації наступний:

Мука соєвих бобів	40г	40г	40г
Гліцерин	20г	20г	20г
Лецитин	14,0г	14,0г	14,0г
Дріжджовий екстракт	5,0г	5,0г	5,0г
Соєва олія	/	10г	10г
Лінолева кислота	20г	20г	/
Водопровідна вода	1л	1л	1л
Титр ліпстатину через 6 днів ферментації	5мг/мл	67мг/л	34мг/л

pH середовища ферментації перед стерилізацією довели до 7,2 10% NaOH. Стерилізацію здійснювали при 121°C протягом 20хв. Ферментацію здійснювали при 28°C протягом 6 днів в аеробних умовах.

Приклад 4.

Продукція ліпстатину в біореакторі на 150л.

а.) Спосіб культивування зерна культури

Склад середовища для зерна культури наступний:

Мука соєвих бобів	10г
Гліцерин	10г
Дріжджовий екстракт	5г
Антиспінювач	10мл
Водопровідна вода	1л

Середовище для зерна культури інокулювали 150мл суспензії спор. Швидкість мішалки встановили на 250об/хв, а швидкість аерації - 15л за хвилину. За період від 22 до 30 годин об'єм осаджених клітин склав більше 12%.

б.) Спосіб основної ферментації.

Близько 10 л даного зерна культури використовували для інокуляції ферментеру з об'ємом посудини 150л, що містить 90л середовища для продукції, що містить:

Мука соєвих бобів	30г
Гліцерин	20г
Лецитин	14,0г
CaCO ₃	2,0г
NaCl	0,7г
Na ₂ SO ₄	2г
KH ₂ PO ₄	0,1г
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,33г

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0г
Соєва олія	10г
Лінолева кислота	10г
Антивспінювач	0,5мл
Водопровідна вода	1л

Перед стерилізацією рН доводили до 7,0 10% NaOH, після чого проводили стерилізацію протягом 30 хвилин при 121°C.

Температуру ферментації встановили на 27°C, швидкість мішалки встановили на 350 об/хв, швидкість аерації складала 100л за хвилину. рН контролювали додаванням 10% NaOH і 30% H₂SO₄ і підтримували між 7,1 і 6,8. Мінімальну концентрацію розчиненого кисню встановили на рівні 30% і після досягнення цього рівня швидкість мішалки поступово підвищували до максимальної швидкості 450 об/хв.

Через 20 годин після інокуляції почали підживлення лінолевою кислотою. Швидкість підживлення встановлювали так, щоб рівень лінолевої кислоти був ледь підвищений. Через 70-100 годин після інокуляції концентрація розчиненого кисню впала до 0%, але несподіваним чином продукція ліпстатину продовжилася з незмінною швидкістю. Окрім цього, при ферментації рівень лінолевої кислоти складав більше 0,3%, що було раніше відоме як токсичний рівень, але така висока концентрація не впливала на продукцію ліпстатину. До кінця ферментації (209 год. після інокуляції), титр ліпстатину склав 914 мг/мл.

Таблиця 2

Титр ліпстатину
при ферментації в біореакторі на 150л

Години після інокуляції	Титр ліпстатину (мг/л)
41	187
65	274
89	528
113	611
137	774
161	724
185	870
209	914

Приклад 5.

Спосіб культивування зерна культури і одержання середовища для способу основної ферментації, описані в Прикладі 4, повторили з тим виключенням, що середовище для способу основної ферментації містило 10 грамів гліцерину, а не 20 грамів гліцерину, як в Прикладі 4.

Температуру ферментації встановлювали на рівні 27°C, швидкість мішалки обмежили значенням 330 об/хв, швидкість аерації складала до 50л за хвилину, рН контролювали, додаючи 10% NaOH і 30% H₂SO₄, і підтримували його на рівні між 7,1 і 6,8. Протягом 24-х годин концентрація розчиненого кисню впала до 1%. Після досягнення цього рівня швидкість мішалки регулювали так, щоб підтримувати концентрацію кисню на рівні показника 1%. Підживлення лінолевою кислотою

почали через 20 год. після інокуляції. Швидкість підживлення контролювали так само, як в прикладі 4. До кінця ферментації (160 год після інокуляції) титр ліпстатину склав 1500 мг/л.

Таблиця 3

Титр ліпстатину і концентрація лінолевої кислоти при ферментації в біореакторі на 150л

Години після інокуляції	Титр ліпстатину (мг/л)	Концентрація лінолевої кислоти (г/л)
0	p.m.z.	1,3
17	44	0,4
41	289	0,9
67	674	0,9
90	808	1,4
113	1092	1,6
137	1386	2
161	1476	2,4
185	1575	3

Приклад 6.

Після завершення способу ферментації ферментаційний бульйон підкисляли сірчаною кислотою до значення рН 1,6±0,1. Міцелій відокремлювали і 2кг сухого залишку, що містить 9,2г/кг ліпстатину, екстрагували 10л ацетонтрилу. Розчинник відокремлювали і ліпстатин, що містить, маслянисту речовину концентрували шляхом випаровування під вакуумом при 40°C. Одержали 74 грамів маслянистої речовини, що містить 12,8 грамів ліпстатину.

37 грамів одержаної маслянистої речовини, що містить 6,4 грамів ліпстатину, очищали на колонці з силікагелем (розмір частинок 40-63мкм) з мобільною фазою трет-бутил-метиловий ефір:гептан (відношення 2:3). Після випаровування мобільної фази одержали 5,03 грамів 93% ліпстатину (визначено за допомогою ВЕРХ).

Приклад 7.

Підживлення лінолевою кислотою і сульфатом амонію

Продукція ліпстатину в біореакторі на 150л.

У біореакторі з робочим об'ємом 30л приготували середовище для зерна культури наступного складу: 350 грамів муки соєвих бобів, 350 грамів гліцерину, 175 грамів дріжджового екстракту, 70 мл лінолевої кислоти, 35мл антивспінювача і водопровідна вода до 35л. рН доводили до 6,5 30% H₂SO₄. Стерилізацію виконували протягом 20 хвилин при 121°C, і потім посудину охолоджували до 27°C. Середовище зерна культури інокулювали 150мл суспензії спор. Мішалку встановлювали на 200 об/хв, і швидкість аерації складала 10л за хвилину. В період від 22 до 30 годин об'єм осаджених клітин досягав більше 12%.

Об'єм 10л даного зерна культури використовували для інокуляції ферментеру з об'ємом посудини 150л, що містить 90л середовища для продуктування, що містить: 4кг муки соєвих бобів, 1кг гліцерину, 1,4кг лецитину, 50мл антивспінювача, 200 грамів CaCO₃, 1000 грамів соєвої олії, 200 грамів лінолевої кислоти, 8 грамів FeSO₄, 4 грамів

ZnSO₄, 12 грамів MnCl₂·4H₂O і 12 грамів MnSO₄·7H₂O. Перед стерилізацією рН доводили до 6,5 30% H₂SO₄ і підтримували на рівні від 7,1 до 6,8. Протягом 24-х годин концентрація розчиненого кисню впала до 1%. Після досягнення вказаного рівня швидкість мішалки встановлювали так, щоб підтримувати концентрацію кисню на рівні показника 1%. Через 20 годин після інокуляції починали завантаження лінолевої кислоти і 30% розчину сульфату амонію. Швидкість завантаження лінолевої кислоти підтримували на тому ж рівні, що в прикладі 5. Швидкість завантаження 30% розчину сульфату амонію до кінця ферментації складала 12г/год. До кінця ферментації (130 годин після інокуляції) титр ліпстатину складало 1571мл/л.

Як джерело азоту використовували розчин амонію або амонієву сіль. Постійне джерело легко метаболізуемого азоту знизило швидкість деградації амінокислот. Рівні рН контролювали швидкістю додавання аміаку в комбінації з параметрами процесу ферментації.

Таблиця

Титр ліпстатину і концентрація лінолевої кислоти при ферментації в біореакторі на 150л

Години після інокуляції	Титр ліпстатину (мг/л)
18	198
40	586
59	830
76	910
80	994
102	1240
130	1571

Приклад 8.

Завантаження лінолевої кислоти і лейцину
Продукція ліпстатину в біореакторі на 150л.

У біореакторі з робочим об'ємом 30л готували середовище для зерна культури: 350 грамів муки соєвих бобів, 350 грамів гліцерину, 175 грамів дріжджового екстракту, 70мл лінолевої кислоти, 35 мл антивспінювача і водопровідна вода до 35л. рН доводили до 7 10% NaOH. Стерилізацію виконували протягом 20 хвилин при 12°C і потім в посудині охолоджували до 27°C. Середовище зерна культури інокулювали 150 мл суспензії спор. Швидкість мішалки встановлювали на 200 оборотів за хвилину, і швидкість аерування складала 10л в хвилину. У період від 22 до 30 годин об'єм осаджених клітин досягав більше 12%.

Об'єм 10л даного зерна культури використовували для інокуляції ферментеру з об'ємом посудини 150л, що містить 90л середовища продуценту, що містить: 4кг муки соєвих бобів, 1кг гліцерину, 1,4кг лецитину, 50мл антипіноутворювача, 200 міліграмів CaCO₃, 100 грамів соєвої олії, 200 грамів лінолевої кислоти, 8 грамів FeSO₄, 4 грамів ZnSO₄, 12 грамів MnCl₂·4H₂O і 12 міліграмів MgSO₄·7H₂O. Перед стерилізацією рН доводили до 6,5 10% NaOH і потім стерилізували протягом 30 хвилин при 121°C. Температуру ферментації встановлювали на 27°C, швидкість мішалки обме-

жували 330 оборотами за хвилину, швидкість аерації складала до 50 л за хвилину. рН контролювали, додаючи 10% NaOH і 30% H₂SO₄ і підтримуючи на рівні від 7,1 до 6,8. Протягом 24-го годин концентрація розчиненого кисню знизилася до 1%. Після досягнення цього рівня швидкість мішалки встановлювали так, щоб підтримувати концентрацію кисню на рівні показника 1%. Через 20 годин після інокуляції починали подачу лінолевої кислоти і 10% розчину лейцину. Швидкість подачі лінолевої кислоти підтримували такий, як в прикладі 5. Швидкість подачі 10% розчину лейцину до кінця ферментації складала до 25г/год. До кінця ферментації (160год. після інокуляції) титр ліпстатину склав 3249мл/л. Додавання ліпстатину при ферментації мало значний ефект відносно зменшення синтезу однієї з найважливіших домішок, сполучених з ліпстатином, - метіонінліпстатину.

Таблиця

Титр ліпстатину і концентрація лінолевої кислоти при ферментації в біореакторі на 150л

Години після інокуляції	Титр ліпстатину (мг/л)
22	212
44	795
59	1187
80	1877
98	2245
118	2782
140	2928
164	3249

Приклад 9.

Завантаження лінолевої кислоти, лейцину і сульфату амонію

Продукція ліпстатину в біореакторі на 150л.

У біореакторі на 150л з робочим об'ємом 30л виготовили середовище зерна культури наступного складу: 350 грамів муки соєвих бобів, 350 грамів гліцерину, 175 грамів дріжджового екстракту, 70мл лінолевої кислоти, 35мл антивспінювача і водопровідної води до 35л. рН доводили до 6,5 30% H₂SO₄. Стерилізацію виконували протягом 20-ти хвилин при 121°C і потім посудину охолоджували до 27°C. Середовище зерна культури інокулювали 150мл суспензії спор. Швидкість мішалки встановлювали на 200 оборотів за хвилину, а швидкість аерації складала 10 л за хвилину. В період від 22 до 30 годин об'єм осаджених клітин досягав більше 12%.

Об'єм 10л даного зерна культури використовували для інокуляції ферментеру з об'ємом посудини 150л, що містить 90л середовища продуценту, що містить: 4 кг муки соєвих бобів, 1 кг гліцерину, 1,4кг лецитину, 50мл антипіноутворювача, 200 грамів CaCO₃, 1000 грамів соєвої олії, 200 грамів лінолевої кислоти, 8 грамів FeSO₄, 4 грамів ZnSO₄, 12 грамів MnCl₂·4H₂O і 12 MgSO₄·7H₂O. Перед стерилізацією рН доводили до 6,5 30% H₂SO₄ з подальшою стерилізацією протягом 30 хвилин при 121°C. Температуру ферментації встановлювали на 27°C, швидкість мішалки обмежували 330 оборотами за хвилину, швидкість

аерації складала до 50л за хвилину, рН контролювали, додаючи 25% NH_3 і 30% H_2SO_4 і підтримуючи його на рівні від 7,1 до 6,8. Протягом 24х годин концентрація розчиненого кисню знизилася до 1%. Після досягнення цього рівня швидкість мішалки регулювали так, щоб підтримувати концентрацію кисню на рівні показника 1%. Після досягнення цього рівня швидкість мішалки регулювали так, щоб понизити концентрацію кисню до приблизно 1%. Через 20 годин після інокуляції починали подачу лінолевої кислоти і підживлюючого розчину азоту (10% розчину лейцину і 10% сульфату амонію). Швидкість подачі лінолевої кислоти контролювали як в прикладі 5. Швидкість подачі підживлюючого розчину азоту до кінця ферментації складала 25г/год. До кінця ферментації (136год. після інокуляції) титр ліпстатину склав 4773 мл/л.

Таблиця

Титр ліпстатину і концентрація
лінолевої кислоти в біореакторі на 150л

Години після інокуляції	Титр ліпстатину (мг/л)
16	74
40	1210
65	2012
89	2581
93	2698
117	3701
136	4773

Приклад 10.

Екстракція ліпстатину

Після завершення способу ферментації бульйон ферментації об'ємом 2500л (що містить 1,9 гр/л ліпстатину) підкисляли сірчаною кислотою до значення рН $2,5 \pm 0,5$. Бульйон ферментації завантажували в реакційну посудину і змішували з 1300л етилацетату з попередніх екстракцій (що містить 0,7 грамів ліпстатину) і 700л свіжого етилацетату.

1ша екстракція: Суміш завантажували в безперервний екстрактор, що працює із швидкістю завантаження $2\text{м}^3/\text{год}$. В ході екстракції у вигляді протитечії додатково додавали ще 715л свіжоприготованого етилацетату. Після завершення екстракції одержували 1827л етилацетату, що містить 4,0кг ліпстатину і 3450л екстрагованого бульйону, що містить 1,9кг ліпстатину

2га екстракція: 3450л екстрагованого бульйону з 1ої екстракції повторно екстрагували 1000л свіжоприготованого етилацетату. Після завершення екстракції одержували 1383л екстракту етилацетату, що містить 1,3кг ліпстатину і 3040л екстрагованого бульйону, що містить 0,7кг ліпстатину.

Екстракти етилацетату об'єднували з одержанням 5, 3кг ліпстатину в етилацетаті і далі концентрували. Концентрат двічі повторно екстрагували ацетонітрилом (об'ємне відношення концентрату до ацетонітрилу складало 1 до 3), і відокремлювали домішки, що не розчинилися. Ацетонітріл далі концентрували з одержанням неочищеного ліпстатину.

Приклад 11.

i. Хроматографічне очищення ліпстатину
Неочищений ліпстатин піддавали хроматографічному очищенню з використанням силікагелю як стаціонарна фаза і суміш терт-бутил метиловий ефір : гептан як мобільна фаза.

Умови хроматографії

Колонка: 10см×150см, заповнена 4000 грамів силікагелю 40-63мкм.

WO 2007/134836 21 РСТ/EP2007/004529

Завантаження: суміш силікагелю і неочищеного ліпстатину (масове співвідношення 10:1)

Швидкість потоку: 50мл/хв

Фракції, що містять ліпстатин, збирали і одержували ліпстатин з чистотою 92%.

ii. Хроматографічне очищення ліпстатину

Неочищений ліпстатин піддавали хроматографічному очищенню з використанням силікагелю як стаціонарна фаза і суміш терт-бутил метиловий ефір:гептан як мобільна фаза.

Умови хроматографії

Колонка: 8500 грамів силікагелю 40-63мкм.

Мобільна фаза: терт-бутил метиловий ефір:гептан (об'ємне відношення 40:60)

Завантаження: 580 мл неочищеного ліпстатину (масове співвідношення 10:1)

Швидкість потоку: 30мл/хв

Фракції, що містять ліпстатин, збирали і одержували 520 грамів ліпстатину з чистотою 82%.

iii. Хроматографічне очищення ліпстатину

Неочищений ліпстатин піддавали хроматографічному очищенню з використанням силікагелю як стаціонарна фаза і суміш терт-бутил метиловий ефір:гептан як мобільна фаза.

Умови хроматографії

Колонка: 8500 грамів силікагелю 40-63мкм.

Мобільна фаза: терт-бутил метиловий ефір:гептан (об'ємне відношення 40:60)

Завантаження: 1700мл неочищеного ліпстатину (чистота згідно ВЕРХ 44,8%)

Швидкість потоку: 30мл/хв

Фракції, що містять ліпстатин, збирали і одержували 630 грамів ліпстатину з чистотою 74%.

Приклад 12.

Одержання орлистату гідруванням

Орлістат можна синтезувати шляхом гідрування ліпстатину, одержаного на стадії очищення.

Ліпстатин (35 грамів), етанол (0,8л) і 3,3 грамів 5% Pd/C завантажували в реактор і перемішували декілька годин при температурі від 10 до 40°C. Потім суміш фільтрували і чистий розчин завантажували в посудину автоклаву і додавали ще 3,3 грамів паладію на активованому вугіллі. Автоклав закривали, створювали інертну атмосферу азоту і заповнювали воднем до 3,5 бар. Суміш перемішували при 15-25°C, доки не припинялося поглинання водню. Потім водень випускали і автоклав вентильовали азотом. Каталізатор фільтрували і розчинник випаровували. Одержували 34,7 грамів ледь жовтого масла, який з часом перетворювався на воскоподібну рідину.

Приклад 13.

Кристалізація орлистату

Орлістат, одержаний гідруванням (15кг, аналіз: 97,6%), у вигляді суміші форм I і II, як описано в WO 2005/026140, і гептан (60л) завантажували у

футерований склом реактор і перемішували лопатевою мішалкою. Суспензію розчиняли нагріванням, потім охолоджували до приблизно 22°C, осаджували 10 грамами орлистату форми II, перемішували при тій же температурі протягом 1

години і охолоджували до 15°C протягом приблизно 2-х годин. Одержані кристали дозрівали протягом 15-ти годин і їх фільтрували підсосом. Після охолодження у вакуумі одержували 14,1 грамів.