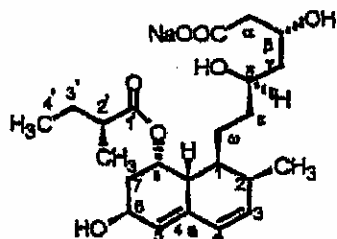
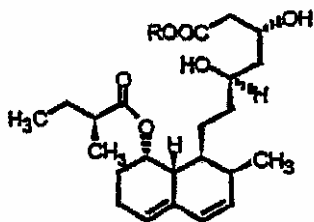


Цей винахід стосується нового мікробного процесу для одержання правастатину.
Зокрема, цей винахід стосується мікробного процесу для одержання правастатину формули (I)



(I)

зі сполуки загальної формули (II)



(II)

де R може бути лужним металом або іоном амонію з мікроорганізмом, де вищезгаданий мікроорганізм — це прокаріот з роду *Micromonospora*, котрий здатний гідроксильовувати сполуку загальної формули (II) у 6 β -положенні.

Гіперхолестеролаемія була визнана головним фактором ризику при атеросклеротичній хворобі, зокрема коронарній хворобі серця. Протягом останніх двох деkad 3-гідрокси-3-метилглутарил-кофермент A редуктазу (HMG-CoA редуктаза КФ 1.1.1.34) ретельно вивчали як головний обмежувач швидкості фермент в біосинтезі холестеролу. Було виявлено, що мевінолін і споріднені сполуки, які біосинтезувалися певними штамми різних видів грибів, є конкурентними інгібіторами цього ферменту [Endo, A. et al. J. Antibiotics 29, 1346-1348 (1976); Endo, A. et al., FEBS Lett. 72, 323-326 (1976); Kuo, C.H. et al., J. Org. Chem. 48, 1991-1998 (1983)].

Правастатин також належить до родини інгібіторів HMG-CoA редуктази. Спочатку, правастатин був відкритий як мінорний сечовий метаболіт компактину у собак (Tanaka, M. et al., неопубліковано) під час метаболічних досліджень компактину [Arai, M. et al. Sankyo Kenkyusho Nempo, 40, 1-38 (1988)].

Головною характерною властивістю правастатину як гідроксильованого продукту компактину є його тканинна селективність. Ці ліки сильно інгібують синтез стеринів в печінці й кишках, але слабо в інших органах. Є перевагою, що правастатин має нижчу токсичність ніж інші інгібітори HMG-CoA редуктази.

Було опубліковано, що мікробне гідроксильовання компактину може бути виконано різними способами кількома штамми видів, що належать до різних родів грибів, і штамми видів актиноміцет, які належать до родів *Nocardia*, *Actinomadura* і *Streptomyces*, серед інших *Streptomyces roseochromogenes* і *Streptomyces carbophilus* (Патент США №5179013, Патент США №4448979, Патент США №4346227, Патент США №4537859, Патент Японії №58010572).

Проблемою використання грибів для одержання правастатину з компактину є те, що ці організми загалом не переносять високі концентрації компактину в рідкому культуральному середовищі, очевидно внаслідок його протигрибової активності [Serizawa, N. et al., J. Antibiotics 36, 887-891 (1983)]. Було виявлено, що в *Streptomyces carbophilus* цитохром P450 система необхідна для гідроксильовання компактину в правастатин [Matsuoka, T. et al., Eur. J. Biochem. 184, 707-713 (1989)]. Складнощами генетичного модулювання здатності до гідроксильовання з використанням такого ферменту є те, що це є комплексом білків, а не одним білком.

Дані дослідження були спрямовані на пошук штамів актиноміцетів, котрий синтезував би правастатин з солей кислої форми компактину з більшим виходом і з допомогою застосування більшої концентрації субстрату в біоперетворенні ніж ті, що є відомими з попередніх патентних заяв.

Під час скринінгу, в якому було використано приблизно 6000 актиноміцет, головним чином ізоляти з зібрань авторів, але також оригінальні штамми з міжнародних зібрань штамів, п'ять *Streptomyces* і п'ять *Micromonospora* були відібрані для подальших досліджень, тому, що вони виявились здатними гідроксильовувати натрієву сіль кислої форми компактину в правастатин. Ці десять штамів актиноміцет, з котрих вісім штамів визначили таксономічно на рівні видів у лабораторії, де працюють автори, були такими:

Streptomyces violaceus (згідно з Kampf et al, 1991), штам №1/43.

Streptomyces rochei (Berger et al, 1949; Waksman і Lechevalier. 1953), штам №1/41.

Streptomyces resfomycifcus (Lindenbein, 1952), штам №1/44.

Streptomyces sp., штам №1/28.

Streptomyces lanatus, (Frommer, 1959), штам №1/16.

Micromonospora sp., штам №IDR-P₃.

Micromonospora purpurea (Luedemann і Brodsky, 1964), штам № IDR-P₄.

Micromonospora echinospora (Luedemann і Brodsky. 1964), штам № IDR-P₅.

Micromonospora megalomicea (Weinstein et al, 1969), штам № IDR-P₆.

Micromonospora rosaria (Horan і Brodsky, 1986), штам № IDR-P₇.

Нині немає жодних даних в літературі щодо здатності *Micromonospora* перетворювати солі кислої форми

компактину на правастатин, автори ретельно вивчили не лише цю певну ферментативну здатність, але також таксономічне положення цих вищезгаданих штамів *Micromonospora*.

Таксономічне положення штамів IDR-P₃, -P₄ -P₅, -P₆ і -P₇ на рівні споріднення.

Усі ці штамів утворювали добре розвинутий міцелій, що складався з розгалужених гіфів приблизно 0,4-0,7мкм в діаметрі. Повітряний міцелій відсутній або спостерігається лише в слідовій кількості. Нерухомі спори утворюються поодинокі на спорофорах. Гіфи субстратного міцелію є Грам-позитивними й не кислотостійкими. Штами №IDR P₃-P₇ є аеробними, хемо-органотропними й чутливими до рН нижче ніж 6,0. Стінки містять мезо-діамінопімелову кислоту. Вищезгадані діагностичні властивості - як ключові - явно показують, що ці моноспорні штамів актиноміцет є типовими членами роду *Micromonospora*.

Таксономічний опис *Micromonospora* sp. штаму №IDR-P₃.

Мікроморфологічні властивості: субстратний міцелій складається з добре розвинутих, скоріше викривлених, ніж прямих, моноподно розгалужених філаментів. Спори на спорофорах є одиницями, сферичними близько 1,8мкм у діаметрі й поширені приблизно рівномірно на гіфальних філаментах. Спори є або сидячими, або на кінцях коротких спорофор. У бульйонних культурах спори не спостерігалися на гіфах очевидно тому, що вивільнення зрілих спор є дуже швидким.

Культурно-макроморфологічні властивості:

Чапек-цукрозний агар: середній ріст, колонії мають червоне забарвлення, вкриті крапкоподібними чорними зонами спорилування.

Глюкоза-аспарагіновий агар: ріст записували як крапкоподібні й збільшені, червонувато-коричневі або чорні колонії. Червонуваті дифузні пігменти.

Поживний агар: задовільний ріст, збільшені, червонувато-коричневі або чорні колонії. Червонувато-коричневий екзопігмент у середовищі.

Солодовий дріжджовий екстрактний агар (ISP Med.2): добре розвинуті, збільшені й зморщені, коричневі колонії, вкриті частково чорними зонами спорилування або "псевдо-повітряним міцелієм" (що з'являється як обмежений білуватий або сіруватий пушок). Коричнювато або коричнево-червоний розчинний пігмент.

Неорганічна сіль-кукурудзяний агар (ISP Med.4): середній ріст червонувато-коричневих збільшених і зморщених колоній. Світло-червонуватий розчинний пігмент.

Гліцерин-аспарагіновий агар (ISP Med.5): ріст лише як сліди, сіро-білого або світло-оранжевого забарвлення, плоскі колонії, світло-рожевий розчинний пігмент.

Використання джерела вуглецю: хороший ріст на позитивне використання L-арабінози, D-галактози, D-фруктози, D-глюкози, D-ксилози, лактози, мелібіози, цукрози, D-манітолу, дульцитолу, гліцерину й інозиту. Ріст з L-рамнозою, D-рафінозою й інуліном було дещо кращим, ніж у негативному контрольному середовищі.

Використання джерела азоту: задовільний ріст з дріжджовим екстрактом і NZ-Аміном, без використання або незначне додавання NaNO₃.

Інші фізіологічно-біохімічні властивості: целюлоза й крохмаль гідролізуються, молоко перетравлюється дуже сильно. Тест на відновлення нітратів - негативний. Жодного росту на картопляних зрізах без карбонату кальцію (рН 5,8-6,0). Жодного утворення меланоїдного пігменту.

Цей штам №IDR-P₃ *Micromonospora* sp. виділяли із зразка бруду озера Balaton (Угорщина).

Систематичне положення: подальші порівняльні систематичні дослідження були б необхідними для визначення точного таксономічного положення цього штаму серед видів роду *Micromonospora*. На основі певних властивостей видається неможливим, щоб штам IDR-P₃ представляв нові види в межах роду *Micromonospora*.

Диференційно-діагностичний опис і визначення штамів *Micromonospora* IDR-P₄, -P₅, -P₆ і -P₇

Штам IDR-P₄

На вищезгаданих діагностичних середовищах, загалом, хороший ріст, помаранчеві до помаранчево-червоні, червоні, інколи жовтуваті або рожеві колонії. Розчинні пігменти й повітряний міцелій не утворюються. Кількість поодиноких спор є досить низькою. Вони зустрічаються на кінцях спорофор. Субстратний міцелій складається з добре розгалужених гіфів. Повітряний міцелій відсутній. Немає росту на D-мелібіозі, рафінозі, манітолі, гліцерині, лактозі, L-рамнозі, але хороший ріст на D-арабінозі, глюкозі, D-ксилозі й слабкий ріст на D-галактозі і D-фруктозі. На основі цих загальноприйнятих діагностичних властивостей автори визначали цей штам як член видів *Micromonospora purpurea* (Luedemann і Brodsky, 1964).

Штам IDR-P₅

Цей штам утворює головним чином поодинокі спорофори й сферичні темно-коричневі до чорних спори (0,8-1,5мкм у діаметрі), котрі міцно прилипають до спорофор і таким чином дозрівають. Згідно з електронно-мікроскопічними спостереженнями авторів, на поверхні цих спор можна побачити бородавчасті структури або вирости ("тупі колючки" згідно з Vol.4 Bergey's Manual of Syst. Bact. 1989, сс.2448), котрі є дуже характерними для спор *Micromonospora echinospora*. Отже, культурноморфологічні й фізіологічно діагностичні властивості цього штаму є також дуже подібними до *M. echinospora*. Колір добре розвинутих колоній стандартних діагностичних середовищ є помаранчево-коричневим або темно-пурпурним. Спороутворюючий шар є чорним або пурпурно-чорним, восковим. Повітряний міцелій відсутній. Пігмент меланін не утворюється. Молоко перетравлюється. Хороший ріст на D-ксилозі, D-арабінозі, D-глюкозі й цукрозі, але росту немає з L-рамнозою, рафінозою, D-галактозою, D-фруктозою, D-мелібіозою та гліцерином. Ми вважаємо цей штам як типовий член *Micromonospora echinospora*.

Штам IDR-P₆

На більшості діагностичних середовищ помірний до слабкого ріст. Помаранчеві або помаранчево-червоні колонії складаються з довгих розгалужених філаментів (приблизно 0,6мкм у діаметрі) і обмеженої кількості поодиноких, сферичних, темнозабарвлених спор (0,6-1,0мкм у діаметрі). Не утворює повітряного міцелію. У певних середовищах утворюються світло-червоні або рожеві розчинні пігменти. На тирозиновому агарі меланоїдні пігменти не утворюються. На базальному середовищі для цього штаму використовувались такі джерела вуглецю: D-ксилоза й D-фруктоза; лише слабо: D-мелібіоза, манітол і галактоза, але жодного або

спорадичного росту не спостерігали з гліцерином, L-рамнозою, лактозою й рафінозою (див. також Kawamoto, I. et al.: Agric. Biol. Chem., 47, 203-215, 1983). Штам №IDR-P₆ виявив значну подібність до видів *Micromonospora megalomicea*, (Weinstein, 1972) і автори вважають його членом цього виду.

Штам IDR-P₇

Хороший до помірного ріст на агарі Bennett, Czapek цукрознаму агарі, глюкоза-аспарагіновому агарі, поживному агарі, агарі на вівсяному борошні, картопляно-декстрозному агарі тощо. Колір пігментів вегетативного міцелію має діапазон від червонувато-коричневого до блідувато-коричневого. На певних середовищах утворюються винно-червоні дифузійні пігменти. На поверхні колоній часто утворюються чорні крапки. Вегетативні гіфи (середній діаметр 0,5мкм) інтенсивно розгалужені. Спори (1,4-1,7мкм у діаметрі) утворюються поодинокі, у положенні "сидячі" або на коротких спорофорах, і зустрічаються вздовж довжини гіфів. Ріст і споруляція відкритого мережевого типу Luedemann. Для цих штамів використовуються такі сполуки як єдине джерело вуглецю в середовищі: D-глюкоза, лактоза, D-манітол, L-рамноза, цукроза й D-ксилоза. Дульцитол, гліцерин, D-мелібіоза й D-рафіноза не використовуються. Автори визначили штам №IDR-P₇ як типовий член *Micromonospora rosaria* (Horan і Brodsky, 1986).

Вищенаведені штами *Micromonospora* було внесено до Національної колекції сільськогосподарських та промислових мікроорганізмів (NCAIM), Будапешт, Угорщина, під нижченаведеними числовими позначеннями:

Micromonospora sp. IDR-P₃ NCAIM (P) B 001 268

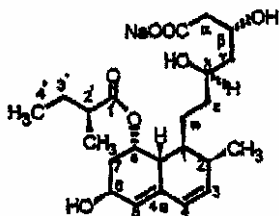
Micromonospora purpurea IDR-P₄ NCAIM (P) B 001271

Micromonospora echinospora ssp. *echinospora* IDR-P₅ NCAIM (P) B 001272

Micromonospora megalomicea ssp. *nigra* IDR-P₆ NCAIM (P) B 001273

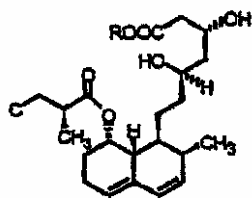
Micromonospora rosaria IDR-P₇ NCAIM (P) B 001274

Виходячи з вищезгаданого винахід стосується нового мікробного процесу для одержання правастатину формули (I)



(I)

зі сполуки загальної формули (II),



(II)

де R може бути лужним металом або іоном амонію,

за допомогою зануреного культивування штаму, котрий здатний б-г-гідроксилувати сполуку формули (II) шляхом аеробного ферментування, виділення та очищення сполуки формули (I), яка утворилася в процесі біоперетворення, що включає в себе такі етапи:

а) культивування штаму виду, що належить до роду *Micromonospora*, котрий здатний б-г-гідроксилувати сполуку формули (II), де R - як визначено вище - на поживному середовищі, що містить здатні засвоюватися при 25-32°C вуглець, джерела азоту й мінеральні солі;

б) харчування субстратом, який перетворюється на культури, що розвиваються;

в) гідроксилування субстрату до кінця біоконверсії;

г) відокремлення сполуки формули (I) з рідкого середовища культури, у разі потреби очищення сполуки.

Об'єм винаходу стосується диких штамів і будь-яких видів мутантів, що належать до роду *Micromonospora*, котрі здатні гідроксилувати натрієву сіль кислотної форми компактину в правастатин.

Згідно з кращим втіленням цього винаходу правастатин утворюється за допомогою штаму *Micromonospora*, вибраного з такої групи: *Micromonospora* sp. IDR-P₃ [NCAIM (P) B 001268] *Micromonospora purpurea* IDR-P₄ [NCAIM (P) B 001271], *Micromonospora echinospora* IDR-P₅ [NCAIM(P) B 001272], *Micromonospora megalomicea* IDR-P₆ [NCAIM (P) B 001273] і *Micromonospora rosaria* IDR-P₇ [NCAIM (P) B 001274].

Згідно з найкращим втіленням винаходу правастатин утворюється штамом *Micromonospora* sp. IDR-P₃ [NCAIM (P) B 001268].

Цей винахід може бути здійснений шляхом ферментування *in situ*, де гідроксилування відбувається за участю активно зростаючої культури *Micromonospora*.

Гідроксилювання можна проводити за допомогою струшування для культур, що зростають в колбах для струшування, або шляхом аерування й струшування у ферментерах, коли сполуку формули (II) додають до культур, які зростають. У таких випадках може бути використаний агент, що запобігає піноутворенню. Відповідної густини культури цього штаму досягають, використовуючи придатне середовище, що містить доступний вуглець, джерела азоту, неорганічні солі, а також слідові елементи.

Наприклад, глюкоза, гліцерин, декстрин, крохмаль, рамноза, ксилоза, цукроза й розчинний крохмаль виявляють здатність засвоюватися як джерела вуглецю, а соєве борошно, кукурудзяний екстракт, пептон, дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, цитрат амонію й сульфат амонію як придатні джерела азоту. Неорганічні солі, такі як карбонат кальцію, фосфати натрію, фосфати калію та подібні, можуть бути додані до культурального середовища. Кращими середовищами для росту цього вибраного штаму є ті, що описані в прикладах.

Біоперетворення компактину на правастатин може бути здійснено різними способами ферментування, наприклад, культивуванням культури клітин, культивуванням з підживленням культури. Перевага віддається, якщо використовується культура, занурена та перемішана в рідині. Краща температура становить приблизно 25-37°C, найкраще, якщо приблизно 25- 32°C.

Перевага віддається, якщо рН становить приблизно 6,0-9,0, найкраще, якщо приблизно 7,0-8,5. Кращими умовами струшування визнано приблизно 200-400 обертів/хвилину, найкраще, якщо приблизно 250 обертів/хвилину.

У винаході запропоновано спосіб перетворення кислоти натрієвої солі компактину на правастатин. Кисла натрієва сіль компактину може бути використана в цьому винаході у будь-яких концентраціях, що забезпечать утворення правастатину. Краще, якщо концентрації компактину становлять 0,1-10г/літер, ще краще, якщо приблизно 0,3-3,0г/літер.

Винахід покриває будь-який відсоток перетворення компактину в правастатин штамами *Micromonospora* spp., щонайменше 30% і найкраще, якщо щонайменше приблизно 90%.

В процесі ферментації склад рідкого культурального середовища контролюється шляхом рідинної хроматографії високої роздільної здатності (HPLC). Згідно зі способом HPLC зразок рідкого культурального середовища розводять у подвійному метанолі, центрифугують і супернатант використовується для аналізу. Параметри HPLC системи, що використовували для аналізу, такі: обладнання "Waters analytical HPLC", завантаження колонки: Waters Novapack C₁₈ 5мкм; вимірювання при 237нм; об'єм ін'єкції 10мкл; швидкість потоку 0,6-0,9мл/хв лінійного градієнту; використовується елююванні градієнтами, елюенти: розчинник А=ацетонітрил -0,1М NaH₂PO₄ у воді (25:75), розчинник В - ацетонітрил - вода (рН 2 з H₃PO₄) (70:30).

Параметри градієнтного елюювання:

Час (хв)	Швидкість потоку (мл/хв)	Елюент А(%)	Елюент В (%)
0	0,6	100	0
2	0,7	100	0
12	0,9	0	100
21	0,9	0	100
22	0,9	100	0
27	0,7	100	0

Час затримки: правастатин (Na сіль) 10,6хв.; компактин (кисла Na сіль) 19,5хв.; правастатин (форма лактону) 17,3хв., компактин (форма лактону) 23,5хв.

Будь-який відомий спосіб може бути використаний для виділення правастатину, наприклад, екстракція-повторна екстракція, аніон-обмінна хроматографія, осадження.

Для виділення продукту з рідкого культурального середовища є перевагою те, що під час біоперетворення правастатин утворюється в його кислотній формі, таким чином, він може бути виділений з фільтрату рідкого культурального середовища його адсорбцією на аніон-обмінній хроматографічній колонці. Для виділення продукту переважно використовують сильно основну аніон-обмінну смолу, котра є полістирол-дивінілбензоловим полімером, що несе активні групи четвертинного амонію, наприклад Dowex AI 400 (OH⁻), Dowex 1x2 (OH⁻), Dowex 2x4 (OH⁻), амберлітові IRA 900 (OH⁻) смоли. Продукт, адсорбований на іон-обмінній смолі, може бути елюований з колонки водною оцтовою кислотою або хлоридом натрію, що містить суміш ацетон-вода, краще, якщо 1% хлоридом натрію, що містить суміш ацетон-вода (1:1). Правастатин, що містить фракції, змішують і ацетон в елюаті випаровують у вакуумі. рН концентрату доводять 15% сірчаною кислотою в діапазоні 3,5-4,0 і окислений водний розчин екстрагують етилацетатом. З екстракту етилацетату правастатин може бути екстрагований 1/10 і 1/20 об'ємним співвідношенням 5% гідрокарбонату натрію або слабо лужною водою (рН 7,5-8,0). Було виявлено, що правастатин може бути виділений в чистій формі з одержаного вище лужного водного екстракту колонковою хроматографією на неіонній адсорбційній смолі. Перевага віддається такому способу: спочатку етилацетат, розчинений у водній фазі видаляють дистилуванням у вакуумі з лужного водного екстракту й потім водний екстракт завантажують на колонку Diaion HP-20. Правастатин, адсорбований на колонці, очищають елююванням за допомогою водного ацетону, в якому вміст ацетону поступово підвищується, потім хроматографічні фракції, що містять правастатин як єдиний компонент, змішують і концентрують у вакуумі. Концентрат очищують деревним вугіллям і ліофілізують, потім кристалізують з суміші етанол -етилацетат, одержуючи правастатин, придатний для фармацевтичного застосування.

Після завершення біоперетворення правастатин може бути екстрагований або з ферментативного рідкого культурального середовища, або з фільтрату, одержаного після відокремлення маси міцелію. Останній може бути видалений шляхом фільтрування або центрифугування, проте перевага віддається, зокрема в

промисловості, проводити в цілому екстракцію рідкого культурального середовища. Перед екстрагуванням рН ферментативного рідкого культурального середовища або фільтрату рідкого культурального середовища доводили до 3,5-3,7 за допомогою мінеральної кислоти, переважно розведеною сірчаною кислотою. Екстракцію виконують за допомогою естеру оцтової кислоти за допомогою аліфатичного спирту, що містить 2-4 атомів вуглецю, переважно з етилацетатом або ізобутилацетатом. Етилацетатний екстракт промивали водою й висушували за допомогою безводного сульфату натрію. Потім з правастатину одержують лактонову похідну. Замикання кільця лактону виконують у висушеному розчині етилацетату за кімнатної температури, під час безперервного перемішування, викликаючи утворення лактону каталітичною кількістю трифтороцтової кислоти. Замикання кільця лактону перевіряють тонкошаровою хроматографією (TLC). Після завершення утворення лактону розчин етилацетату промивали спочатку 5% розчином водного гідрокарбонату натрію, потім водою, висушували за допомогою безводного сульфату натрію й випаровували у вакуумі. Залишок очищали колонковою хроматографією з силікагелем, що використовували як суміші елюенту етилацетату - н-гексану, вміст етилацетату поступово збільшували. Правастатин одержують з лактону правастатину за допомогою гідролізу при кімнатній температурі в ацетоні з еквівалентною кількістю гідроксиду натрію. Після утворення натрієвої солі правастатину його осаджують за допомогою ацетону. Потім осад фільтрують і промивають ацетоном та н-гексаном й висушують у вакуумі, після чого кристалізують із суміші етанол - етилацетат.

Було виявлено, що хроматографія на Sephadex LH-20 гелі є найкращою для очищення правастатину. Застосовуючи цей спосіб, правастатин може бути одержаний з чистотою 99,5% (що вимірювали HPLC).

У ході наших досліджень даний винахід було виявлено:

в екстракті органічного розчинника, переважно в екстрактах етилацетату або ізобутилацетату рідкого культурального середовища, або у фільтраті рідкого культурального середовища штаму *Micromonospora* sp. IDR-P₃, котрий здатний до 6β-гідроксилювання сполуки загальної формули (II), правастатин може бути одержаний як кристалічна сіль з вторинними амінами. Далі було виявлено, що для утворення солі придатні кілька вторинних амінів, що містять алкіл-, циклоалкіл-, аралкіл- або арил-замісники.

Придатні нетоксичні вторинні аміни були відібрані серед, таких як наприклад, діоктиламін, дициклогексиламін, дибензиламін. Виділення проміжних речовин органічних вторинних солей аміну, наприклад, дибензиламінова сіль, виконують додаванням дибензиламіну в 1,5 еквівалентній кількості щодо вмісту екстракту правастатину, потім екстракт концентрують дистилюванням у вакуумі до 5% його вихідного об'єму, потім ще одну кількість дибензиламіну додають в концентрат в 0,2 еквівалентному співвідношенні. Кристалічну дибензиламінову сіль осаджують з концентрату.

Кристалічний сирій продукт фільтрують і висушують у вакуумі, очищують деревним вугіллем в розчині метанолу або ацетону. Потім рекристалізацією очищеного продукту з ацетону може бути одержана хроматографічно чиста дибензиламінова сіль правастатину.

Органічні вторинні амінові солі правастатину можуть бути перетворені в правастатин гідроксидом натрію або алкоксидом натрію, краще, якщо етоксидом натрію.

Виділення правастатину через проміжну речовину, вторинну змінну сіль, значно простіша процедура, ніж будь-яка з інших відомих процедур виділення. Під час процедури артефакти не утворюються, й відокремлення правастатину від побічних продуктів біоперетворення та різних метаболічних продуктів, біосинтезованих гідроксильюючим мікроорганізмом, може бути успішно вирішено.

Процес згідно з винаходом наведений нижче у прикладах.

Приклад 1

Спори одержували з поверхні 7-10 добової культури штаму *Micromonospora* sp. IDR-P₃ [NCAIM (P) В 001268 в розчинному крохмалевому агарі (SM) і суспендували в 5 мл стерильної дистильованої води. Цю суспензію використовували для посіву в 100мл стерильного середовища в 500мл колбі Erlenmeyer.

Вміст SM середовища

Розчинний крохмаль	10,0г
Na ₂ HPO ₄	1,15г
KH ₂ PO ₄	0,25г
KCl	0,2г
MgSO ₄ ·xH ₂ O	0,2г
Агар	15,0г

в 1000мл дистильованої води

рН середовища доводили до 7,0 перед стерилізацією, й суміш стерилізували при 121°C протягом 25 хвилин.

Вміст ТІ середовища

Розчинний крохмаль	20,0г
Дріжджовий екстракт в	10,0г

в 1000 мл водопровідної води

рН доводили до 7,0 перед стерилізацією й нагрівали при 121°C протягом 25 хвилин.

Культуру, що розвивається, перемішували на роторному шейкері (250 обертів/хвилину; і амплітуда: 2,5см) протягом 3 днів при 32°C, потім 5мл її аліквоти використовували для посіву в 10 колб Erlenmeyer 500мл об'єму кожна, що містить 100мл ТТ середовища, стерилізованого при 121°C протягом 25 хвилин.

Вміст ТТ середовища

Картопляний крохмаль	30,0г
Соєве борошно	30,0г
CaCO ₃	5,0г
CoCl ₂ ·x6H ₂ O	2,0мл
Пальмова олія	2,0г

в 1000 мл водопровідної води

pH доводили до 7,0 перед тепловою стерилізацією.

Інкубацію проводили при 32°C протягом 72 годин, потім 50мг кислоти натрієвої солі компактину додавали до кожної колби в дистильованій воді, і культивування здійснювали протягом 96 годин. Швидкість перетворення кислоти натрієвої солі компактину в правастатин, що вимірювали HPLC, становила 82%.

Після завершення ферментування культури об'єднували з одержаним спільним ферментативним рідким культуральним середовищем, що містило 410мг правастатину, виділення останнього здійснювали таким чином: ферментативне рідке культуральне середовище центрифугували при 2500 обертів/хвилину протягом 20хв. Супернатант рідкого культурального середовища і масу міцелію відокремлювали, потім останній ресуспендували в 250мл води, одержану суспензію перемішували протягом години й фільтрували. pH змішаних центрифугованого середовища й фільтрату доводили 15% сірчаною кислотою до 4,0, потім кислотний фільтрат екстрагували 3х300мл етилацетатом. Змішані екстракти етилацетату промивали 300мл води, висушували за допомогою безводного сульфату натрію й концентрували у вакуумі до 100 мл об'єму. Потім правастатиновий лактон одержували з правастатину додаванням трифтороцтової кислоти в каталітичній кількості за кімнатної температури під час безперервного перемішування. Утворення лактону правастатину перевіряли за допомогою TLC: адсорбент: Kieselgel 60 F₂₅₄ DC (Merck) алюмінієва фольга; розчинник, що розвивається: суміш ацетон - бензол - оцтова кислота (50:50:1,5); виявлено: фосфомолібденовою кислотою. R_f значення лактону правастатину становило 0,7. Після завершення утворення лактону етилацетат промивають 2х20мл 5% водного гідрокарбонату натрію, потім промивають 20мл води, висушують за допомогою безводного сульфату натрію й випаровують у вакуумі. Одержували 0,5г залишку випаровування, котрий хроматографували на 10г колонці, що містить Kieselgel 60 адсорбент (діаметр колонки: 1,2см, висота адсорбенту: 17см). Для елювання використовували суміші етилацетат - н-гексан, у якому вміст етилацетату поступово збільшували. Лактон правастатину елювали з колонки сумішшю 60% етилацетат - 40% н-гексан. Фракції, що містять лактон правастатину змішували й випаровували у вакуумі. Одержаний залишок, котрий містив 230мг лактону правастатину, розчиняли в 5мл ацетону, потім під час перемішування 110моль % гідроксиду натрію, додавали в 1М розчин етанолу. Розчин перемішували протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Потім, розчин концентрували до 2мл об'єму і 4мл ацетону додавали до концентрату. Суміш підтримували при +5°C протягом ночі. Осад фільтрували, промивали 2мл ацетону й потім 2мл н-гексану й висушували у вакуумі за кімнатної температури. Сирий правастатин, що утворився, розчиняли в етанолі, очищували деревним вугіллем, потім кристалізували з суміші етанол - етилацетат. Таким чином одержували 170мг правастатину.

Точка плавлення 170-173°C (декомп.) [α]_D²⁵ = +156° (с = 0,5, у воді).

Спектр УФ-поглинання (20мкг/мл, в метанолі): λ_{max}=231, 237, 245 нм (logε=4,263; 4,311; 4,136), Спектр ІЧ-поглинання (KBr): νOH 3415, νCH 2965, νC=O 1730, νCOO⁻ 1575см⁻¹.

¹H-ЯМР спектр (D₂O, δ, млн⁻¹): 0,86, d, 3H (2-CH₃); 5,92, dd, J = 10,0 і 5,4 Гц, 1H (3-H); 5,99, d, J = 10,0 Гц, 1H (4-H); 5,52, br, 1H (5-H); 4,24, m, 1H (6-H); 5,34, br, 1H (8-H); 4,06, t, 1H (β-H); 3,65, t, 1H (δ-H); 1,05, d, 3H (2'-CH₃); 0,82, t, 3H (4'-H₃).

¹³C-ЯМР спектр (D₂O, δ, млн⁻¹): 15,3, q (2-CH₃); 139,5, d (C-3); 129,5, d (C-4); 138,1, s (C-4a); 127,7, d (C-5); 66,6, d (C-6); 70,1, d (C-8); 182,6, s(COO⁻); 72,6, d (C- β); 73,0, d (C-δ); 182,0, s (C-1'); 18,8, q (2'-CH₃); 13,7, q (C-4').

Позитивний FAB мас-спектр (характерні іони): [M+Na]⁺ 469; [M+H]⁺ 447.

Негативний FAB мас-спектр (характерні іони): [M-H]⁻ 445, [M-Na]⁻ 423, m/z 101 [2-метил-масляної кислоти-N].

Приклад 2

У 10 Erlenmeyer 500мл колб, кожна з яких містить 100мл МТ₁ середовища для перетворення, висіяли культури, одержані, як описано в Прикладі 1, потім інкубували при 28°C протягом 96 годин, 50мг кислоти натрієвої солі компактину додавали до кожної колби в дистильованій воді, потім гідроксилювання здійснювали протягом 72 годин, в той час як інші 50-50мг субстрату додавали до культур у дистильованій воді й ферментування продовжували протягом 72 годин.

Вміст МТі середовища для перетворення

Картопляний крохмаль	10,0г
Декстроза	20,0г
Соєве борошно	10,0г
Дріжджовий екстракт	10,0г
СаСО ₃	5,0г
Соняшникова олія	2,0г

в 1000 мл водопровідної води

pH середовища для біоперетворення доводили до 7,0 перед стерилізацією. Суміш стерилізували при 121°C протягом 25 хвилин.

Після завершення періоду біоперетворення культури об'єднували й правастатин виділяли з об'єданого рідкого середовища згідно з описаною нижче процедурою:

Об'єдане рідке середовище, що містить 750мг правастатину згідно з HPLC аналізом центрифугували за 2500 обертів/хвилину протягом 20хв. Відокремлену масу міцелію перемішували з 250мл води протягом години, потім фільтрували. Центрифуговане середовище й фільтрат змішували, pH розчину, що утворився, доводили до значення 3,5-4,0 15% сірчаною кислотою, потім розчин екстрагували 3х300мл етилацетату. Потім 150моль % дибензиламіну, перевіреного на кількість вмісту правастатину, додавали до етилацетатного екстракту. Етилацетатний екстракт випаровували до приблизно 30мл об'єму й суспензію тримали протягом ночі при 0-5°C. Осаджену дибензиламінову сіль правастатинової кислоти фільтрували й промивали на фільтрі охолодженням етилацетатом і н-гексаном, після чого висушували у вакуумі. В 33мл ацетону розчиняли 1,1г сирової дибензиламінової солі правастатинової кислоти й при 62-66°C температурі, а розчин очищали 0,1г деревного вугілля протягом 30 хвилин. Потім деревне вугілля видаляли за допомогою фільтрування з

розчину. Кристали осаджені з очищеного розчину, розчиняли знову за вищевказаної температури, потім розчин тримали при +5°C протягом ночі. Осад фільтрували, промивали охолодженим ацетоном та н-гексаном і висушували у вакуумі. Одержану дибензиламінову сіль правастатинової кислоти й (0,7г) суспендували в 10мл етанолу, потім 110моль % гідроксиду натрію додавали до розчину, вливаючи 1М водний розчин. Лужний розчин перемішували протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Після завершення утворення натрієвої солі додавали 30мл води й рН розчину нейтралізували, потім етанол дистильовали у вакуумі. Водний концентрат хроматографували на колонці, заповненій 50мл смоли Diaion HP 20 (діаметр колонки: 1,5см, висота смоли колонки: 28см). Колонку елюювали за допомогою сумішей ацетон-деіонізована вода, де концентрацію ацетону підвищували на 5%. Правастатин елюювали з колонки 15% ацетоном, що містив суміш ацетон-деіонізована вода. Фракції перевіряли у спосіб TLC, наведений в Прикладі 1. Значення R_f правастатину становило 0,5. Фракції, що містили правастатин, змішували, й вміст ацетону випаровували у вакуумі. Ліофілізацією водного залишку одержували 390мг хроматографічно чистого правастатину.

Приклад 3

У лабораторному ферментері стерилізували 4,5 літри ТТ/2 середовища при 121°C протягом 45 хвилин і висівали 500мл культури, що росте в умовах струшування, одержаної, як описано в Прикладі 1, потім інкубували при 32°C, аерували 250л стерильного повітря/годину й перемішували за допомогою плоского перемішувача при 300 обертів/хвилину. Інкубацію продовжували протягом 72 годин, і 2,5г натрієвої солі компактинової кислоти додавали до культури. Після 48 години біоперетворення компактин як субстрат повністю поглинався з ферментативного рідкого культурального середовища, потім 2,5г кислоти натрієвої солі компактину знову додавали в культуру. Друга доза компактину споживалася протягом 24 годин. Швидкість перетворення натрієвої солі компактинової кислоти в правастатин становила приблизно 90% в процесі біоперетворення.

Вміст ТТ/2 середовища для біопертворення

Глюкоза	75,0г
Розчинний крохмаль	50,0г
Соеве борошно	50,0г
Дріжджовий екстракт	50,0г
Пептон	5,0г
NaNO ₃	20,0г
CaCO ₃	25,0г
У 4500 мл водопровідної води	

Приклад 4

У лабораторному ферментері стерилізували 4,5 літри ТТ/1 середовища для ферментування при 121°C протягом 45 хвилин і висівали 500мл культури, що росте в умовах струшування, одержаної, як описано в Прикладі 1, потім інкубували при 28°C, аерували 200л стерильного повітря/годину й перемішували за допомогою плоского перемішувача при 400 обертів/хвилину.

Вміст ТТ/1 середовища для біопертворення

Глюкоза	125,0г
Картопляний крохмаль	25,0г
Соеве борошно	50,0г
Дріжджовий екстракт (Gistex)	50,0г
Пептон	50,0г
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0мг
Соняшникова олія	10,0г
У 4500 мл водопровідної води	

РН середовища для біопертворення доводили до 7,0 перед стерилізацією.

Культивування продовжували при 28°C протягом 96 годин. За цей час 2,5г натрієвої солі компактинової кислоти додавали в стерильному фільтрованому водному розчині до культури. На п'ятий день ферментування натрієва сіль компактинової кислоти повністю поглиналася ферментативним рідким культуральним середовищем. Потім субстрат додавали наступні 3 дні частинами по 2,5г/день. Кисла натрієва сіль компактину як субстрат поступово споживалася протягом чотирьох днів і перетворювалась повністю в правастатин. Згідно з результатами HPLC досліджень наприкінці ферментування з 10г компактину як субстрату утворювалось 9г правастатину.

Після завершення біоперетворення правастатин, що утворився в концентрації 1800пг/мл, виділяли таким чином:

при 2500 обертів/хвилину протягом 20хв. центрифугували 5 літрів культурального середовища. Потім 2 літри води додавали до відокремленої маси міцелію й суспензію перемішували протягом години й фільтрували. Ці два фільтрати об'єднували й пропускали зі швидкості потоку 500мл/годину через колонку, що містить 300г (540мл) Dowex AI 400 (ОН⁻) смоли (діаметр колонки: 4см, висота смоли: 43см), потім смолу промивали 1л деіонізованої води. Потім колонку елюювали 1л суміші ацетон-вода (1:1), що містить 10г хлориду натрію, збираючи 50мл фракції. Фракції перевіряли у TLC спосіб, наведений в Прикладі 1. Фракції, що містили продукт, змішували й ацетон віддистильовували у вакуумі. РН концентрату доводили до значення 3,5-4,0 15% сірчаною кислотою, потім екстрагували 3x250мл етилацетату. До змішаного екстракту етилацетату додавали 40мл деіонізованої води, потім рН доводили до значення 7,5-8,0 1М гідроксидом натрію. Після 15хв. перемішування водну і етилацетатні фази відокремлювали, потім розчин етилацетату екстрагували 2x40мл деіонізованої води, як було описано вище. Потім змішаний лужний водний розчин концентрували до 50мл об'єму й хроматографували на колонці, заповненій неіонною адсорбентною смоєю 600мл Diaion HP20 (Mitsubishi Co., Японія) (діаметр колонки: 3,8см, висота смоли: 53см). Колонку промивали 600мл деіонізованої води, потім елюювали за допомогою сумішей ацетон-деіонізована вода, де концентрації ацетону

підвищували по 5%, збираючи 50мл фракції. Елюат аналізували у TLC спосіб, наведений в Прикладі 1. Правастатин елюювали з колонки сумішшю ацетон-деіонізована вода, що містить 15% ацетону. Фракції, що містять правастатин як одиничний компонент, змішували й розчин концентрували у вакуумі до 150мл об'єму. Потім 0,6г деревного вугілля додавали до концентрованого водного розчину, й правастатин очищали за кімнатної температури протягом 1 години. Потім фільтрували деревинне вугілля, й фільтрат ліофілізували. 6,5г ліофілизованого правастатину, що утворився, кристалізували двічі з суміші етанолу й етилацетату. Осад фільтрували, промивали 20мл етилацетату і 20мл н-гексану й висушували у вакуумі за кімнатної температури. Таким чином одержали 4,6г хроматографічно чистого правастатину.

Приклад 5

Спорову суспензію одержували з 5 мл стерильної дистильованої води з поверхні 10-добової культури, розчиненої в кукурудзяному агарі, як описано в Прикладі 1, штаму *Micromonospora echinospora* ssp. *echinospora* IDR-P₅ [NCAIM (P) B 001272], здатного до 6β-гідроксилювання кислоти натрієвої солі компактину, і одержану спорову суспензію використовували для посіву 100мл середовища T1, стерилізованого в 500мл Erlenmeyer колбі. Вміст середовища T1 було також описано в Прикладі 1. Посаджене середовище струшували на роторному шейкері (250 обертів/хвилину, 2,5см амплітуда) протягом 3 днів при 28°C, потім 5мл аліквоти культури переносили до 100-100мл біоконверсійного середовища TT/1 стерилізованого в 500мл Erlenmeyer колбі протягом 2 хв. при 121°C. Вміст середовища TT/1 описано в Прикладі 4. Колби струшували на роторному шейкері (250 обертів/хвилину, 2,5см амплітуда) протягом 3 днів при 25°C, потім 10-10мг компактину як субстрату (кисла натрієва сіль компактину) додавали в стерильному фільтрованому водному розчині в культуру, потім ферментування продовжували протягом 168 годин.

Наприкінці біоперетворення вміст правастатину ферментативного рідкого культурального середовища визначали у HPLC спосіб. За цей час середня концентрація правастатину становила 40мкг/мл.

Приклад 6

Ферментування, подача субстрату та біоперетворення здійснювали зі штамом IDR-P₆, [NCAIM (P) B 001273] *Micromonospora megalomicea* ssp. *nigra*, як було описано в Прикладі 5. Вміст правастатину ферментативного рідкого культурального середовища визначали у спосіб HPLC. Наприкінці біоперетворення вміст правастатину рідкого культурального середовища становив 50мкг/мл.

Приклад 7

5мл аліквоти засівної культури штаму IDR-P₄ [NCAIM (P) B 001271] *Micromonospora purpurea*, одержаного, як описано в Прикладі 1, використовували для висівання 100-100мл TT/14 середовища, що міститься в 500мл Erlenmeyer колбах, й стерилізованого протягом 25 хвилин при 121°C.

Вміст середовища TT/14

Картопляний крохмаль	5,0г
Глюкоза	25,0г
Дріжджовий екстракт (Gistex)	15,0г
Пептон	15,0г
CaCO ₃	1,0г

У 1000мл водопровідної води

pH середовища для біоперетворення доводили до 7,0 перед стерилізацією.

Колби струшували на роторному шейкері (250 обертів/хвилину, 2,5см амплітуда) протягом 3 днів. Подачу субстрату, біоперетворення й визначення вмісту правастатину здійснювали, як описано в Прикладі 5. Наприкінці перетворення вміст правастатину ферментативного рідкого культурального середовища становив 40мкг/мл.

Приклад 8

Ферментування, подачу субстрату й перетворення виконували зі штамом IDR-P₇, [NCAIM (P) B 001274] *Micromonospora rosalia*, як було описано в Прикладі 1. Наприкінці біоперетворення 350мкг/мл правастатину вимірювали у ферментативному рідкому культуральному середовищі у спосіб HPLC.