

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 160496 B

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3085/84

(51) Int.Cl.⁵ C 07 D 305/12

(22) Indleveringsdag: 22 jun 1984

C 12 P 17/02

(41) Alm. tilgængelig: 23 dec 1984

//(C 12 P 17/02

(44) Fremlagt: 18 mar 1991

C 12 R 1:465)

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 22 jun 1983 CH 3415/83

(71) Ansøger: *F. Hoffmann-La Roche AG; 124-184 Grenzacherstrasse; CH-4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Paul *Hadvary; CH, Erich *Hochuli; CH, Ernst *Kupfer; CH, Hans *Lengsfeld; CH, Ernst Karl *Weibel; CH

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) **Leucinderivater og fremgangsmåde til fremstilling af leucinderivater, samt lægemidler indeholdende leucinderivater**

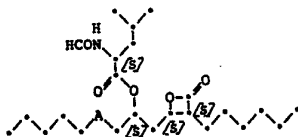
(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4189438, 4202824

(57) Sammendrag:

3085-84

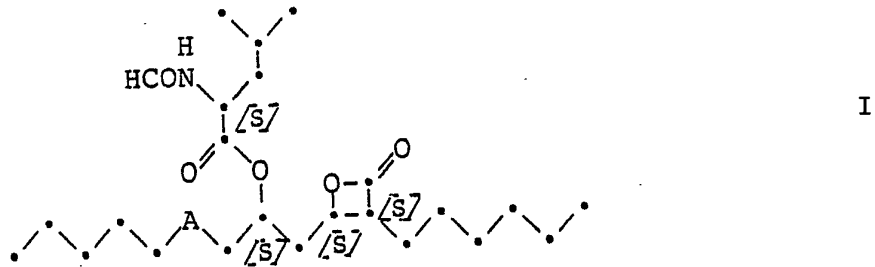
Hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I




hvor A betegner gruppen $\text{H}-\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})-\text{H}$ eller $-(\text{CH}_2)_5-$.

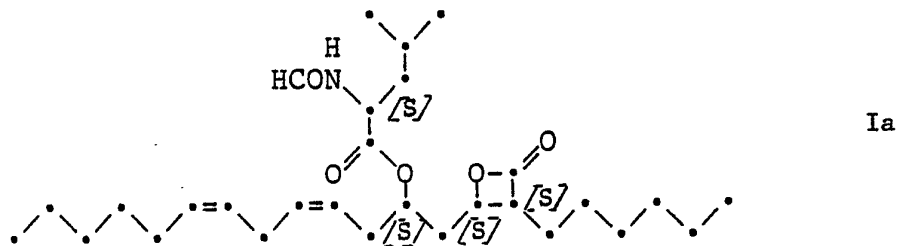
hæmmer pankreaslipase og kan anvendes til bekæmpelse eller forebyggelse af obesitas og hyperlipæmier.

Den foreliggende opfindelse angår leucinderivater med den almene formel I

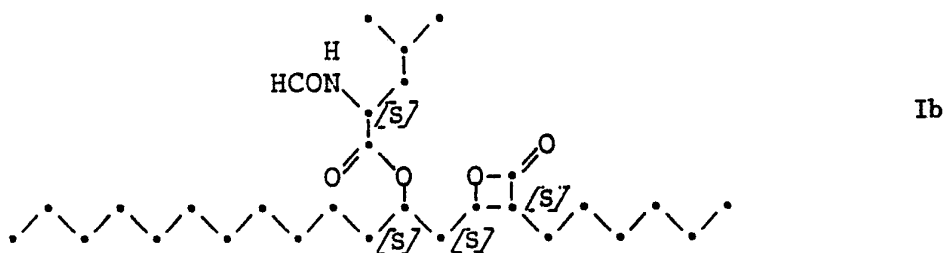


5 hvor A betegner gruppen  eller $-(CH_2)_5-$.

Den ovenfor viste almene formel I omfatter (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensyre-lactonen med formlen Ia



10 som i det følgende betegnes som lipstatin, og (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansyre-lactonen med formlen Ib



som i det følgende betegnes som tetrahydrolipstatin.

Disse forbindelser er hidtil ukendte og har værdifulde farmakologiske egenskaber. Især hæmmer de pankreaslipase og kan anvendes til bekæmpelse eller forebyggelse af obesitas og hyperlipæmi.

- 5 Den foreliggende opfindelse angår forbindelserne med den ovenfor viste formel I som sådanne, fremstillingen af disse forbindelser og lægemidler, som indeholder forbindelsen med den almene formel I.

Fordøjelsen af de fedtstoffer (triglycerider), som optages med føden, finder sted i tarmen ved hjælp af pankreaslipase. Pankreaslipase
10 spaltes de primære esterbindinger i triglycerider, hvorved der som produkter dannes frie fedtsyrer og 2-monoglycerider. Disse produkter kan derefter resorberes og udnyttes. Gennem hæmning af pankreaslipasen forhindres denne spaltning af fedtstofferne i føden delvis og dermed også resorptionen og udnyttelsen af disse stoffer; triglyceri-
15 derne bliver udskilt i uforandret form.

Hæmningen af pankreaslipase ved hjælp af forbindelserne med den almene formel I kan påvises i forsøg, idet den oleinsyre, som frigøres ved spaltning af triolein med svinepankreaslipase, fastslås titrimetrisk. Til en emulsion, der indeholder 1 millimol taurodeoxy-
20 cholat, 9 millimol taurodeolat, 0,1 millimol kolesterol, 1 millimol eilecithin, 15 mg/ml bovint serumalbumin, 2 millimol tris-HCl, 100 millimol natriumchlorid og 1 millimol calciumchlorid, idet substratet indeholder triolein, sættes den i ethanol eller dimethylsulfoxid (10% af emulsionsvolumenet) opløste forbindelse med den almene formel I,
25 og reaktionen startes ved tilsætning af 100 μ l (175 U) svinepankreaslipase. pH-Værdien holdes under reaktionen på 8 ved tilsætning af natriumhydroxidopløsning. IC_{50} -Værdien beregnes på grundlag af det i løbet af 10 minutter fastsatte forbrug af natriumhydroxidopløsning. IC_{50} -Værdien er den koncentration, ved hvilken lipaseaktiviteten
30 hæmmes det halve af det maksimale. I nedenstående tabel 1 vises de fastsatte IC_{50} -værdier for forbindelserne med den almene formel I og angivelser af den akutte toxicitet (DL_{50} ved én gang oral administration hos mus).

Tabel 1

Testforbindelse	IC ₅₀ i µg/ml	DL ₅₀ i mg/kg peroralt
5 Lipstatin	0,07	>4000
Tetrahydrolipstatin	0,18	-

I et lignende forsøg blev en IC₅₀-værdi for tetrahydroesterastin (US 4.202.824) fastsat til at være 400 µg/ml. Esterastin (US 4.189.438), som ifølge angivelserne i US 4.202.824 er omtrent 16,5 gange mere aktiv end tetrahydroesterastin, er 240 henholdsvis 120 gange mindre aktiv end lipstatin og tetrahydrolipstatin. De sidstnævnte forbindelser indeholder en monosubstitueret isohexanoyl-oxy-sidekæde. Derimod indeholder de tidligere kendte forbindelser en di-substitueret propionyl-oxy-sidekæde.

Hæmningen af resorptionen af det fedt, som optages med føden, hvilket finder sted ved hæmning af pankreaslipasen, kan vises i et dobbeltmærkningsforsøg på mus. Til dette formål administreres et forsøgs-
 20 måltid til forsøgsdyrene, hvilket måltid indeholder ³H-triolein og ¹⁴C-oleinsyre, og en forbindelse med den almene formel I. Ved måling af radioaktiviteten fastsættes derefter den mængde ³H-triolein og ¹⁴C-oleinsyre (i % af den administrerede mængde), der udskilles med ekskrementerne. De i nedenstående tabel 2 anførte resultater viser, at udskillelsen af uforandret triglycerid er stærkt forhøjet i
 25 forhold til ubehandlede kontroldyr, og udskillelsen af oleinsyre i stor udstrækning er uforandret.

Tabel 2

Testforbindelse	Antal forsøgsdyr	Dosis	Udskillelse i % af den administrerede mængde	
			Triolein	Oleinsyre
Kontrol	12	-	3,5 ± 0,3	10,1 ± 0,6
Lipstatin	6	40 mg/kg*	56,8 ± 13	13,8 ± 5,6

35

* Forsøgene blev udført med et præparat, som indeholder ca. 10% lipstatin. Den angivne dosis er den administrerede mængde af lipstatin.

Forbindelserne med den almene formel I fremstilles ved fremgangsmåden
5 ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved, at

man aerobt dyrker mikroorganismen *Streptomyces toxytricini* 85-13
NRRL 15443 i et vandigt dyrkningsmedium, som indeholder egnede
carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte, og den dannede
forbindelse med formlen Ia udvindes fra næringsvæsken, hvorefter om
10 ønsket forbindelsen med formlen Ia hydrogeneres til fremstilling af
forbindelsen med formlen Ib.

Streptomyces-stammen, der danner lipstatin (forbindelsen med formlen
Ia), kan isoleres fra jordprøver på Mallorca, Spanien, og mikroorga-
nismen har fået laboratoriebeteignelsen *Streptomyces* sp. 85-13, og er
15 blevet identificeret som *Streptomyces toxytricini* Preobrazhenskaya &
Sveshnikova hos CBS, Baarn (Holland) (jfr. *Bergey's Manual of Deter-*
minative Bacteriology, 8. udgave, s. 811). Den fik derfor den nye
beteignelse *Streptomyces toxytricini* 85-13. En lyofiliseret prøve af
denne stamme blev deponeret hos Agricultural Research Culture Collec-
20 tion, Peoria, Illinois, den 14. juni 1983 med deponeringsbeteignelsen
NRRL 15443 i henhold til bestemmelserne i Budapest-Traktaten.

Nedenfor følger en beskrivelse af identifikationen af *Streptomyces*
sp. 85-13:

Medier

25 Sammensætningen af de anvendte medier er beskrevet i *Int. J. Syst.*
Bacteriol. 16 (3), 1966 s. 313-321.

Nonomura-diagram

Nonomura benyttede resultaterne fra det internationale *Streptomyces*-

projekt (ISP) til klassifikation af *Streptomyces*-arter (*J. Ferment. Technol.* 52 (2), 1974).

Farver

Navnene og kodenumrene for luftmyceliets farver stammer fra Tresner & Backus, "System of color wheels for streptomycete taxonomy". Farverne på koloniernes bagside stammer fra H. Prauser's selektion fra Bau-
mann's "Farbtonkarte Atlas I".

Metoder

Man anvendte ISP-metoderne (jfr. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16 (3),
1966, s. 313-340).

I. Agarkulturer efter 16 dage ved 28°C (dobbelbestemmelse)

a) Havremelsagar

Vækst: fortrinlig; kolonier: tynde, udbreder sig; luftmycelium: fløjlsagtigt, rosabrunt (Light Brown 57); kolonibagside: gullig (Pr. Coo- 3-m) med brede purpurgrå kanter (Pr. Oc-6-c); opløselige pigmenter: utydelige.

b) Stivelse/saltagar

Vækst: god; kolonier: tynde, udbreder sig; luftmycelium: fløjlsagtigt, rosabrunt (Light Brown 57) med en hvid sektor; kolonibagside: mørk halmfarvet (Pr. Coo (Cr)5a), kanter og andre zoner rosa (Pr. Oc- 5-b) med enkelte mørkt rødbrune punkter (Pr. 0-5-5(r)); opløselige pigmenter: utydelige. Den stivelsesnedbrydende aktivitet er stærkt udbredt.

c) Glycerol/asparaginagar

Vækst: god; kolonier: tynde, udbreder sig; luftmycelium: fløjlsagtigt, lyst rosabrunt (R4ec: Grayish Yellowish Pink); kolonibagside: orange (Pr. Oc-3-m/r); opløselige pigmenter: blegt rosabrune.

d) Gær/maltagar

Vækst: god; kolonier: tynde, store; luftmycelium: fløjlsagtigt, rødligbrunt (4ge: Light Grayish Reddish Brown 45); kolonibagside: gul (Pr. Coo-4-5) og mørkebrun (Pr. Oc-5-r); opløselige pigmenter: meget
5 blegt gulbrune.

II. Agarkultur efter 62 dage ved 28°C (dobbelbestemmelse)

a) Havremelsagar

Vækst: god; kolonier: tynde, udbreder sig; luftmycelium: pulveragtigt/fløjlsagtigt, kanelfarvet (R-4ie: Light Brown (57)-Cork Tan) med
10 en bred, lysere kant (R. 5gc: Light Reddish Brown (4.2)-Peach Tan); kolonibagside: gulligbrun med okkergul (Pr. Coo-3-a) kant, lysegrå hen imod det lysere centrum (Pr. Oc-4-r); opløselige pigmenter: lyst okkerbrune.

b) Stivelse/saltagar

15 Som på havremelsagar, men med en kraftigere gråbrun bagside (Pr. Oc-6-c) og med mørkebrune pletter og ringe for enderne af krydsudstrygningerne.

c) Glycerol/asparaginagar

20 Som på stivelse/saltagar, men blegere, lysbeige (5ec: Grayish Yellowish Pink 32-Dusty Peads). Bagside: okkergul (Pr.: Coo (=Cr)-4-b), lysere i centrum; ingen opløselige pigmenter.

d) Gær/maltagar

Vækst: moderat; kolonier: næsten som på havremelsagar, men med meget
25 smal, bleggrå kant; bagside: mørkegul (Pr. Coo-4-b), mørkebrun i nærheden af kanten; opløselige pigmenter: utydelige.

III. Melanoide pigmenter

Pepton/gærekstraktagar: negativ efter 24 timer, positiv efter 48 timer; tyrosinagar: positiv efter 24 timer, positiv efter 48 timer.

IV. Det sporedannende luftmyceliums morfologi

- 5 Sektion: Spira-retinaculum Apertum. Forgreningsart: sympodial. Spiralerne er ofte uregelmæssige med op til 5 vindinger og forskelligt tværsnit.

V. Udnyttelse af carbonkilder

- 10 Ingen eller kun sporadisk vækst på arabinose, xylose, inositol, manitol, fructose, rhamnose, saccharose og raffinose.

VI. Sporer

Ovale til cylindrisk ovale, ofte af uregelmæssig størrelse, glat overflade. Sporekæder med over 10 sporer.

VII. Nonomuradiogram

- 15 R(Gy) 100 SRA sm(±)(±)(±)-----.

Til den foreliggende opfindelses formål er *Streptomyces toxytricini* 85-13, NRRL 15443 egnet.

- Dyrkningen af mikroorganismen til fremstilling af lipstatin kan udføres ved forskellige fermenteringsmetoder. Dyrkningen kan fx
20 udføres i rystekolber eller i 10 l eller 200 l og 1000 l fermentorer. En vis mængde sporemateriale eller mycelium fra den lipstatindannende stamme anbringes i et flydende medium, som indeholder hensigtsmæssige carbon- og nitrogenkilder og de for væksten nødvendige salte, og der
25 inkuberes aerobt ved en temperatur på 20-37°C i 1-6 dage. Som carbonkilder er fx dextrin, glucose, stivelse, ribose og glycerol egnede. Egnede nitrogenkilder er fx gærekstrakt, pepton eller soja-

mel. Som salte er der fortrinsvis tale om ammonium-, magnesium- og calciumsalte. Fermenteringen udføres ved en pH-værdi på 6-8.

Isoleringen af lipstatin foretages ved metoder, som er kendte for fagfolk, og kan fx udføres som følger.

- 5 Fermenteringsvæsken centrifugeres efter afslutning af fermenteringen, hvorefter 60-90% af aktiviteten findes i cellemassen og resten i supernatanten. Cellemassen kan derefter behandles med en lavere alkohol såsom methanol og ethanol og ekstraheres med det samme opløsningsmiddel. Supernatanten kan ekstraheres med et egnet organisk
- 10 opløsningsmiddel, fx methylenchlorid eller ethylacetat. Det materiale, som udvindes fra ekstrakterne, indeholder det ønskede lipstatin og kan beriges og renses ved chromatografiske metoder. Egnede metoder er fx multipelekstraktion med systemet hexan/methanol/vand (50:40:9), filtreringschromatografi over silicagel ved eluering med chloroform,
- 15 søjlechromatografi på silicagel ved eluering med hexan, ethylacetat og blandinger deraf, chromatografi på upolære bærematerialer under eluering med polære opløsningsmidler såsom methanol, (reversfasechromatografi) og højtryksvæskechromatografi.

- I de nedenstående eksempler beskrives detaljeret dyrkningen af
- 20 *Streptomyces toxytricini* 85-13 og isoleringen af lipstatin.

- Tetrahydrolipstatin (forbindelsen med formlen Ib) fremstilles ved, at lipstatin hydrogeneres i nærværelse af en hensigtsmæssig katalysator. Som katalysatorer kan der fx anvendes palladium-på-kul, platinoxid, palladium og lignende. Egnede opløsningsmidler er fx lavere alkoholer
- 25 såsom methanol og ethanol. Der arbejdes fortrinsvis ved lavt hydrogentryk og stuetemperatur.

- Forbindelserne med den almene formel I kan anvendes som lægemidler, fx i form af farmaceutiske præparater. De farmaceutiske præparater kan administreres oralt, fx i form af tabletter, overtrukne tabletter,
- 30 dragéer, hårde og bløde gelatinekapsler, opløsninger, emulsioner eller suspensioner.

Til fremstilling af farmaceutiske præparater kan produkterne ifølge opfindelsen forarbejdes sammen med farmaceutisk inerte, uorganiske eller organiske bærere. Som sådanne bærere kan der til tabletter, overtrukne tabletter, dragéer og hårde gelatinekapsler fx anvendes
5 lactose, majsstivelse eller derivater deraf, talkum, stearinsyre eller salte deraf og lignende. Som bærere til bløde gelatinekapsler egner sig fx planteolier, voksarter, fedtstoffer, halvfaste og flydende polyoler og lignende; alt efter aktivstoffets beskaffenhed kræves der dog slet ikke nogen bærer til bløde gelatinekapsler. Til
10 fremstilling af opløsninger og sirupper er fx vand, polyoler, saccharose, invertsukker, glucoser og lignende egnede som bærere.

De farmaceutiske præparater kan desuden indeholde konserveringsmidler, opløsningsformidlende midler, stabiliseringsmidler, befugtningmidler, emulgatorer, sødemidler, farvestoffer, aromastoffer,
15 salte til forandring af det osmotiske tryk, puffere, overtrækksmidler eller antioxidantter. De kan endvidere også indeholde andre terapeutisk værdifulde stoffer.

Som allerede nævnt er lægemidler, som indeholder en forbindelse med den almene formel I, ligeledes omfattet af den foreliggende opfindelse.
20 se. Som allerede nævnt kan forbindelserne med den almene formel I anvendes til bekæmpelse eller forebyggelse af sygdomme, især til bekæmpelse eller forebyggelse af obesitas og hyperlipæmier. Doseringen kan variere inden for vide rammer og skal naturligvis i hvert enkelt tilfælde tilpasses de individuelle forhold. Almindeligvis bør
25 der ved oral administration tilmåles en daglig dosis på fra ca. 0,1 mg til 100 mg pr. kg. legemsvægt.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

a) Fermentering

30 En rystekolbe med fordykningsmedium 391 podes med sporer af *Streptomyces toxytricini* 85-13 (eller vegetativt mycelium deraf) og inku-

beres aerobt i 72 timer ved 28°C som rystekultur. Ca. 2-5 volumenprocent af denne kultur anvendes til podning af en fermentor-forkultur på 10 l med forkulturmedium 391. Der inkuberes i 3 dage ved 28°C under luftning med 1 vvm og ved 400 rpm. Denne 10 liters
5 forkultur anvendes til podning af en 200 liters produktionsfermentor med produktionsmedium N7. Der fermenteres i 124 timer ved 28°C under luftning med 1,0 vvm og omrøring ved 150 rpm. Regelmæssige analyser viser efter 124 timer en ekstracellulær lipasehæmmende aktivitet på 53 IC₅₀/ml.

10 Forkulturmediet 391 (pH-værdi 7,0) har følgende sammensætning: 3% majsstivelse, 4% dextrin, 3% sojamel, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,6% CaCO₃ og 0,8% sojaolie. pH-Værdien blev indstillet til 7. Produktionsmediet N7 (pH-værdi 7,0) har følgende sammensætning: 1% kartoffelstivelse, 0,5% glucose, 1% ribose, 0,5% glycerol, 0,2% pepton, 2% sojamel og 0,2%
15 (NH₄)₂SO₄.

b) Oparbejdning

Fermenteringsvæsken centrifugeres ved hjælp af en rørcentrifuge, hvorved fås 175 l kulturfiltrat og 12 kg mycelium. Myceliet kasseres, og kulturfiltratet opvarmes i 10 minutter til 80°C, afkøles, centri-
20 fugeres igen og koncentrerer til 50 l ved 30°C i vakuum. Dette koncentrat ekstraheres med 50 l hexan ved hjælp af en kontinuerligt arbejdende ekstraktor, den vundne emulsion blandes med 50 l hexan/ethylacetat (1:1), og den organiske fase skilles fra. Denne tørres over natriumsulfat og inddampes; herved fås 199 g rækstrakt 1. Den
25 vandige fase fortyndes med vand til 100 l og ekstraheres med 100 l ethylacetat. Herved fås efter inddampning af ethylacetatopløsningen 49 g rækstrakt 2. Den vandige fase ekstraheres til slut endnu en gang med 100 l ethylacetat, hvorved der efter inddampning fås 78 g rækstrakt 3.

30 c) Rensning

Rækstrakterne 2 og 3 filtreres i tre portioner over hver gang 1 kg silicagel 60 (0,040-0,063 mm kornstørrelse), idet der elueres med chloroform (søjle: 10 x 100 cm). Herved fås 18,3 g beriget materiale.

178 g af dette stof filtreres på ny under eluering med chloroform over 1 kg silicagel. Herved fås 5,29 g aktivt materiale. 802 mg af dette stof blev rensat ved reversfasechromatografi på en kommerciel Lobar-færdigsøjle (Lichoprep RP-8, størrelse C) under eluering med
 5 methanol. Herved fås 158 mg (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensyrelacton (lipstatin), der ved stuetemperatur er en gullig olie. Ved lavere temperaturer er den voksagtig-krystallinsk.

Mikroanalyse (tørret i 20 timer i højvakuum ved 50°C):

10 Analyse:

Beregnet for $C_{29}H_{49}N_1O_5$ (491.713): C 70,84 H 10,04 N 2,85.

Fundet: C 70,85 H 9,97 N 2,59.

Optisk drejning: $[\alpha]_D^{20} = -19,0^\circ$ (c = 1,0 i chloroform).

Massespektrum (kemisk ionisering med NH_3 som reagensgas): Spidser
 15 bl.a. ved m/z 509 ($M+NH_4^+$) og 492 ($M+H^+$).

IR-Spektrum (film): ν_{max} = bånd bl.a. ved 3318, 3012, 2928, 2558, 2745, 1823, 1740, 1673, 1521, 1382, 1370, 1250 og 1191 cm^{-1} .

Ved kemisk nedbrydning af lipstatinet og sammenligning af de vundne fragmenter med kendte stoffer kunne den absolutte konfiguration
 20 fastslås.

EKSEMPEL 2

a) Fermentering

En 200 liters fermentor med produktionsmedium N16 podes med en i henhold til eksempel 1 fremstillet forkultur af *Streptomyces toxytricini* 85-13 (rystekolbe og derefter 10 liters fermentor). Produktions-
 25 mediet N16 svarer til det i eksempel 1 anvendte produktionsmedium N7, men indeholder endvidere 0,1% svinefedt. Fermenteringen udføres i løbet af 120 timer som beskrevet i eksempel 1. Efter 120 timer

andrer den intracellulære lipasehæmmende aktivitet 71 IC_{50} /ml, og den ekstracellulære aktivitet 4 IC_{50} /ml fermenteringsvæske.

b) Oparbejdning

Efter at fermenteringen er løbet til ende, opvarmes fermenteringsvæsken i 10 minutter ved 80°C og afkøles derefter, og cellemassen
5 skilles fra ved hjælp af en rørcentrifuge. Ved to ganges centrifugering fås 11,4 kg mycelium; kulturfiltratet kastes bort. Myceliet omrøres i 30 minutter i 70 l methanol, hvorefter den vundne suspension sugefiltreres. Filterkagen omrøres på ny med 50 l methanol og
10 sugefiltreres. De samlede methanoliske ekstrakter koncentrerer til 1,8 l. Dette koncentrat ekstraheres tre gange med hver gang 2 l butylacetat. Efter inddampning fås 160 g råekstrakt fra de samlede organiske faser.

c) Rensning

15 Denne råekstrakt renses ved multiplikativ ekstraktion med systemet hexan/methanol/vand (5:4:0,9). Først overføres det aktive stof fra den underste fase til den øverste fase. 160 g råekstrakt opløses i 4 l af den underste fase og omrøres i en omrøringsbeholder med 4 l af den øverste fase. Efter fraskillelse af den øverste fase ekstraheres
20 den underste fase endnu en gang med 4 l frisk øverste fase. Der dannes sig en stabil emulsion, hvortil sættes yderligere 4 l af den underste fase og 4 l af den øverste fase, hvorved der opnås en god faseadskillelse. Efter fraskillelse af den øverste fase ekstraheres den underste fase endnu to gange med 8 l frisk øverste fase. De
25 samlede øverste faser giver efter inddampning 90,3 g ekstrakt. Den ekstraherede underste fase kasseres. Det aktive stof overføres derpå fra den øverste fase til den underste fase. 90,3 g af det ovennævnte ekstrakt opløses i 4 l af den øverste fase og ekstraheres med 4 l af den underste fase. Efter faseadskillelse ekstraheres den øverste fase
30 endnu tre gange med en frisk portion af den underste fase. Derefter kasseres den øverste fase. De samlede underste faser koncentrerer til 0,7 l vandig fase, som ekstraheres otte gange med i alt 0,2 l ethylacetat. Efter inddampning fås 25,8 g produkt. Den ekstraherede vandige fase kasseres. Den videre rensning af dette materiale udføres

ved filtrering over 1 kg silicagel 60 (kornstørrelse på 0,040-0,063 mm; søjle 10 x 100 cm) under eluering med chloroform. Herved fås 649 mg produkt, som chromatograferes på en Lobar-færdigsøjle (Lichoprep RP-8, størrelse C) under eluering med methanol (reversfasechromatografi). Herved fås 204 mg lipstatin, som er rent i henhold til tyndt-

5 lagschromatografi.

EKSEMPEL 3

138 mg lipstatin opløses i 10 ml ethanol, der tilsættes 60 mg 5%'s palladium-på-kul og omrøres ved stuetemperatur i 3 timer i hydrogen-

10 atmosfære (ballon). Derefter centrifugeres katalysatoren fra. Hydrogeneringsproduktet chromatograferes over en kort silicagelsøjle (1 x 5 cm) med chloroform. Herved fås 112 mg (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansyrelacton (tetrahydrolipstatin) som et voksagtigt, svagt gult fast stof.

15 Optisk drejning: $[\alpha]_D^{20} = -32,0^\circ$ (c = 1,0 i chloroform).

Massespektrum (kemisk ionisering med NH_3 som reagensgas): Spidser bl.a. ved m/z 513 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$); 496 ($\text{M}+\text{H}^+$) og 452 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{CO}_2$).

IR-Spektrum (film): ν_{max} = bånd bl.a. ved 3332, 2956, 2921, 2853, 1838, 1731, 1709, 1680, 1665, 1524, 1383, 1249 og 1200 cm^{-1} .

20 ^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0,89 (6H); 0,97 (6H); 1,15-1,5 (27H), 1,5-1,85 (6H); 1,9-2,25 (2H); 3,24 (1H); 4,32 (1H); 4,68 (1H); 5,03 (1H); 6,43 (1H); 8,07 og 8,21 (1H).

EKSEMPEL 4

a) Fermentering

25 En 2 liters rystekulturkolbe med medium 391 podes med sporer fra en skråagarkultur af *Streptomyces toxytricini* 85-13 og inkuberes aerobt i 72 timer ved 28°C. Derefter overføres den 2 liters forkultur til en

50 liters fermentor med produktionsmedium N16 og inkuberes ved 28°C i 77 timer under 0,5 vvm luftning. Denne 50 liters forkultur anvendes til podning af en 1000 liters fermentor med medium N16. Denne produktionsfermentering udføres ved 28°C og 0,5 vvm luftning i 91 timer, hvorved der opnås et lipstatin-titer på 73 IC₅₀/ml intracellulært og 16 IC₅₀/ml ekstracellulært. Hele fermenteringsvæsken afkøles til 2°C og centrifugeres, hvorved fås 41 kg fugtig biomasse, der nedfryses ved -20°C.

b) Oparbejdning

10 37 kg mycelium optøs ved 4°C og homogeniseres med ca. 40 l vand i en blander. Til den vundne tyndtflydende suspension sættes 140 l methanol, og der omrøres i 20 minutter. Derefter sugefiltreres over et filterklæde, hvorefter filterkagen på ny ekstraheres med 140 l methanol. Methanolekstrakterne koncentrerer til ca. 22 l ved 30°C.

15 Det vundne koncentrat fortyndes med vand til 50 l og ekstraheres i en omrøringsbeholder tre gange med hver gang 50 l hexan/ethylacetat (1:1). Ved anden og tredje ekstraktion fås emulsioner, som kan brydes ved tilsætning af ca. 1,4 kg, henholdsvis 0,5 kg natriumchlorid. De samlede organiske ekstrakter koncentrerer, tørres over natriumsulfat

20 og inddampes til en olieagtig remanens. Herved fås 428 g råekstrakt.

c) Rensning

Denne råekstrakt filtreres i fire portioner over hver 1 kg silicagel 60 (kornstørrelse 0,040-0,063 mm), hvorefter der elueres med chloroform (søjle: 10 x 100 cm). Herved fås 70 g beriget præparat, der

25 filtreres i to portioner over hver 1 kg silicagel 60 under eluering med hexan/ethylacetat (gradient fra 9:1 til 4:1). Herved fås 4,2 g aktivt materiale, der renses i fire portioner ved reversfasechromatografi på en Lobar-færdigsøjle (Lichoprep RP-8, størrelse C) under eluering med methanol. Herved fås 1,77 g lipstatin.

EKSEMPEL A

Fremstilling af bløde gelatinekapsler med nedenstående sammensætning:

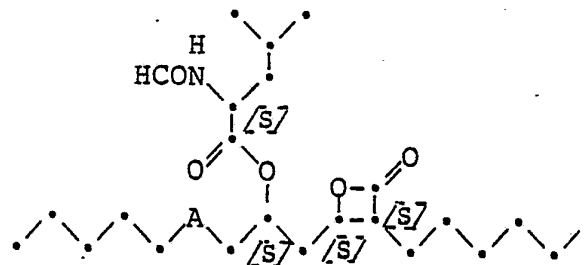
Mængde pr. kapsel

5	Lipstatin	50 mg
	NEOBEE M-5	450 μ l

Opløsningen af aktivstoffet i NEOBEE M-5 fyldes på bløde gelatinekapsler med en egnet størrelse.

PATENTKRAV

1. Leucinderivater med den almene formel I



I

5 hvor A betegner gruppen  eller $-(\text{CH}_2)_5-$.

5

2. (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensyrelacton.

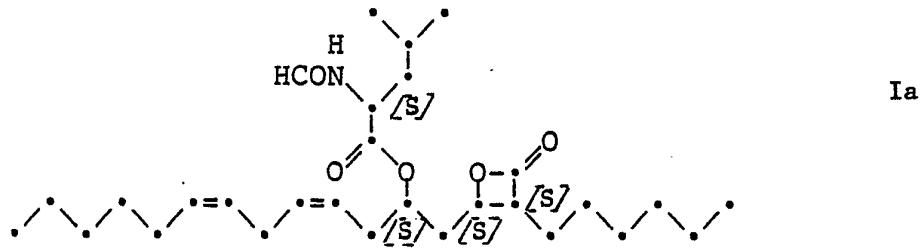
3. (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansyrelacton.

10 4. Forbindelse ifølge krav 1, 2 eller 3 til anvendelse som terapeutisk aktivt stof.

5. Forbindelse ifølge krav 1, 2 eller 3 til anvendelse som et pankreaslipasehæmmende aktivt stof.

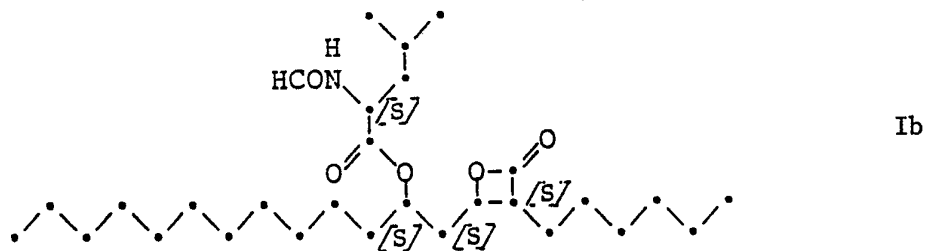
15 6. Fremgangsmåde til fremstilling af en forbindelse ifølge krav 1, 2 eller 3,
k e n d e t e g n e t ved, at

man til fremstilling af (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensyrelacton med formlen Ia



aerobt dyrker mikroorganismen *Streptomyces toxytricini* 85-13 NRRL 15443 i et vandigt dyrkningsmedium, som indeholder egnede carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte, og den dannede forbindelse med

5 formlen Ia udvindes fra dyrkningsvasken, hvorefter om ønsket forbindelse med formlen Ia hydrogeneres til fremstilling af (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansyrelacton med formlen Ib



10 7. Lægemiddel,

k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en forbindelse ifølge krav 1, 2 eller 3 og et terapeutisk inert bæremateriale.

8. Lægemiddel ifølge krav 7,

beregnet til hæmning af pankreaslipase.