



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 98503

(22) Заявено на 21.02.94

(24) Начало на действие
на патента от: 21.02.94

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 30.05.96

(46) Публикувано в бюлетин № 2
на 29.02.96

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

F. Hoffmann - La Roche AG, Basel (CH)

(72) Изобретател(и):

Paul Hadvary, Biel-Benken

Erich Hochull, Arisdorf

Ernst Kupfer, Basel

Hans Lengsfeld, Reinach

Ernst Karl Welbel, Pratteln (CH)

(74) Представител по индустриална
собственост:Снежана Георгиева Виткова,
1404 София, ул. "Н.Каменов"
бл.252, вх.4, ап.76

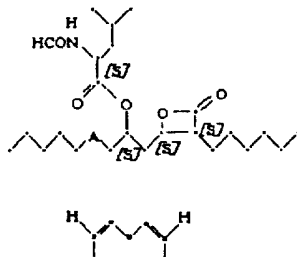
(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

Издава се съгласно §4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на: EP № 0129748 от 30.09.87

(54) ПРОИЗВОДНИ НА ХЕКСАДЕКАНОВА И ХЕКСАДЕКАДИЕНОВА КИСЕЛИНА

(57) Изобретението се отнася до съединения с обща формула



в която А означава групата



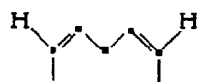
или $-(CH_2)_5-$, които съединения инхибират панкреасната липаза и могат да се прилагат за лечение или предпазване от Obesity и хиперлипемии.

10 претенции

мула

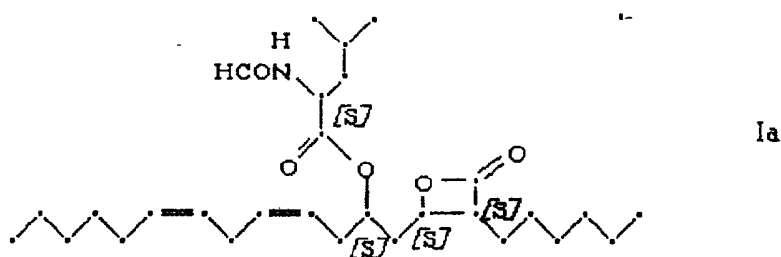


където А означава групата

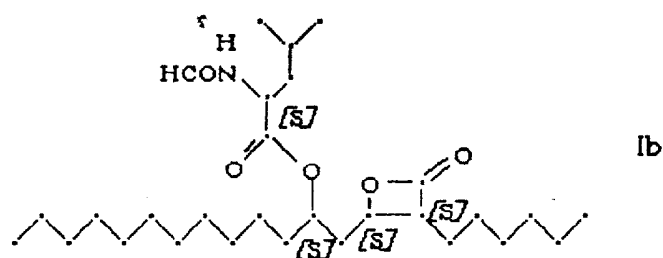


или $-(CH_2)_5-$.

Горната формула I включва лактон на (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-7,10-хексадекадиенова киселина с формула



който по-нататък е означен като липстатин и лактон на (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-хексадеканова киселина с формула



който по-нататък е означен като тетрахидролипстатин.

Тези съединения са нови и притежават ценни фармакологични свойства. Те възпрепятствуват по-специално панкреасната липаза и могат да се прилагат за лечение или предпазване от затлъстяване и хиперлипемии.

Предмет на настоящото изобретение са съединения-

та с горната формула I като такива и като фармацевтичноактивни вещества, получаването на тези съединения, лекарствено средство и промишлено приготвено хранително средство, съдържащи съединения с формула I, тяхното получаване както и използването на тези съединения за лечение или предпазване от заболяване.

Смилането на приетите с храната мазнини (триглицериди) настъпва в червата посредством панкреасната липаза. Панкреасната липаза разкъсва първичните естерни връзки на триглицеридите, при което се отделят като продукти свободни мастни киселини и 2-моноглицериди. Тези продукти след това могат да се резорбират и да се усвоят. Чрез инхибиране на панкреасната липаза споменатото разпадане на хранителните мазнини и по този начин също и на резорбцията и усвояването на тези вещества частично се възпрепятсвува, а триглицеридите се изхвърлят непроменени.

Инхибирането на панкреасната липаза от съединенията с формула I може да се докаже експериментално, при което титриметрично се определя освободената олеинова киселина при разпадането на триолеин от свинска панкреаза. Към емулсия, която съдържа 1 mM тауродеокихолат, 9 mM тауродеолеат, 0,1 mM холестерин, 1 mM яйчен лецитин, 15 mg/ml BSA, 2 mM трис-HCl, 100 mM натриев хлорид, 1 mM калциев хлорид и субстрат триолеин, се прибавя разтвореното в етанол или диметилсулфоксид (10% от емулсионния обем) съединение с формула I и реакцията се стартира чрез прибавяне на 100 μ l (175 U) свинска панкреасна липаза. През време на реакцията pH се поддържа при 8 чрез добавяне на натриев хидроксид. Определя се изконсумираният в продължение на 10 минути натриев

хидроксид и се изчислява IC_{50} . IC_{50} е тази концентрация, при която липазната активност се инхибира наполовина от максимума. Следващата таблица I съдържа определените за съединенията с формула I IC_{50} стойности и данни за острата токсичност (DL_{50} след еднократен орален прием от мишки).

Таблица I

изпитвано съединение	IC_{50} в $\mu g/ml$	DL_{50} в mg/kg р.о.
Липстатин	0,07	>4000
Тетрахидро- липстатин	0,18	-

Потискането на резорбцията на приетата с храната мазнина, което се причинява от инхибирането на панкреасната липаза, може да бъде показано в двойно маркиран експеримент върху мишки. За тази цел на опитните животни се дава изпитвана храна, която съдържа 3H -триолеин и ^{14}C -олеинова киселина и съединение с формула I. Чрез измерване на радиоктивността след това се определя излъченото с фекалиите количество от 3H -триолеин и ^{14}C -олеинова киселина (в % от приетото количество). Приведените в следващата таблица II резултати показват, че в сравнение с нетретираните контролни животни, изхвърлянето на непроменен триглицерид силно се повишава и отделянето на олеинова киселина е непроменено.

Таблица II

Изпитвано съединение	Брой опитни животни	Доза	Отделени в % от приетите количества	
			триолеин	олеинова к-на
Контрола	12	-	$3,5 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,6$
Липстатин	6	$40 mg/kg^*$	$56,8 \pm 13$	$13,8 \pm 5,6$

* Опитите са проведени с препарат, който съдържа около 10% липстатин. Дадената доза е приетото количество липстатин.

Съединенията с формула I могат да се получат съгласно изобретението като:

а) за получаване на съединението с формула Ia се култивира аеробно продуциращ това съединение микроорганизъм от вида *Streptomyces toxytricini* във водна културална среда, която съдържа подходящи източници на въглерод и азот и неорганични соли и продуцираното съединение с формула Ia се изолира от културалната среда или

б) за получаване на съединето с формула Ib, се хидрира съединението с формула Ia.

От почвени проби от различни места се изолират щамове *Streptomyces*, които продуцират липстатин, съединението с формула Ia. Като пример може да се посочи намерен в почвена проба от Mallorca Испания и изолиран микроорганизъм, който е получил лабораторно означение *Streptomyces* sp. 85-13 и е идентифициран от CBS, Baarn (Холандия), като *Streptomyces toxytricini* Preobrazhenskaya & Sveshnikova (фиж Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, с. 811). След това той получава новото означение *Streptomyces toxytricini* 85-13. Лиофилизирана проба от този щам е депозирана на 14.06.83 в Agricultural Research Culture Collection, Peoria, Illinois, с означение NRRL 15443.

Следва описание на идентифицирането на *Streptomyces* sp. 85-13:

Среди

Съставът на използваните среди е описан в Int. J.Syst. Bacteriol., 1966,16,3; 313-321.

Диаграма на Nonomura

Nonomura използва за класифициране на видове Streptomyces резултатите от международен проект по Streptomyces (ISP) (J. Ferment. Technol. 1974, 52,2).

Цвят

Названията и кодовите наименования на цветовете на въздушния мицел произлизат от Tresner & Backus, "System of color wheels for streptomycete taxonomy". Цветовете на обратната страна на колонията се определят по H. Pr  user's Selection aus Baumann's "Farbtonkarte Atlas I".

Методи

Процедира се съобразно ISP-методите (виж Int.J.Syst. Bacteriol. 1966,16,3 313-340).

I. Агарови култури след 16 дни при 28°C (двойно определяне)

а) Агар с овесено брашно

Растеж: много добър; колонии: редки, разширяващи се; въздушен мицел: кадифен, розовокафяв (Light Brown 57); обратна страна на колонията: жълтеникава (Pg. Соо-3-m) с широки пурпурносиви краища (Pg. Ос-6-с); разтворими пигменти: неясни.

б) Агар с нишесте и соли

Растеж: добър; колонии: редки, разширяващи се; въздушен мицел: кадифен, розовокафяв (Light Brown 57) с бял сектор; обратна страна на колонията: тъмен сламен цвят (Pg. Соо (Сг) 5а), краища и други зони розови (Pg. Ос-5-b) с няколко тъмночервенокафяви пункта (Pg. 0-5-5(г)) , разтворими пигменти: неясни. Активността към разграждане на нишестето е силно изразена.

с) Глицерин-аспарагинов агар

Растеж: добър; колонии: редки, разширяващи се; въз-

душен мицел: кадифен, светло розовокафяв (R4ec: Grayish Yellowish Pink); обратна страна на колонията: оранжева (Pg. Oc-3-m/r); разтворими пигменти: бледо розовокафяви.

d) Дрождевомалцов агар

Растеж: добър; колонии : редки, големи; въздушен мицел: кадифян, червеникавокафяв (4ge: Light Grayish Reddish Brown 45); обратна страна на колонии: жълта (Pg. Соо-4-5) и тъмнокафява (Pg. Oc-5-r); разтворими пигменти: много бледо жълтокафяви.

II. Агарови култури след 62 дни при 28°C (двойно определяне)

a) агар с овесено брашно

Растеж: добър; колонии: редки, разширяващи се; въздушен мицел: прашно кадифян, с канелен цвят (R-4ie: Light Brown (57)- Cork Tan) с широк светъл край (R.5gc: Light Reddish Brown (4.2)-Peach Tan); обратна страна на колонията: жълтеникавокафява с охрено жълт край (Pg. Соо-3-a), светлосив към светлия център (Pg. Oc-4-r); разтворими пигменти: светлокафява охра;

b) Агар с нишесте и соли

Както при агар с овесено брашно, но с по-силно сивокафява обратна страна (Pg. Oc-6-c) и с тъмнокафяви петна, и пръстени на края на кръстосана посевка.

c) Глицерин-аспарагинов агар

Както при агар с нишесте и соли, обаче по-бледо, светло бежово (5ec& Grayish Yellowish Pink 32-dusty Peads). Обратна страна: охра (Pg.: Соо (=Cr)-4-b), по-светла в центъра; няма разтворими пигменти.

d) Дрождевомалцов агар

Растеж: масивен; колонии: почти както при агар с овесено брашно, но с твърде тесен бледосив край; обратна страна:

тъмножълта (Pg. Соо-4-b) тъмнокафява в близост до краищата; разтворими пигменти: неясни.

III. Меланоидни пигменти

Агар с пептон и дрождев екстракт: след 24 часа отрицателни, след 48 часа положителни; тирозинов агар: след 24 часа положителни, след 48 часа отрицателни.

IV. Морфология на спорообразувания въздушен мицел

Секция: Spira-Retinaculum Apertum. Вид на разклоненията: симподиално. Спиралите често неправилни, с до 5 извивки и различен диаметър.

V. Оценка на C-източниците

Никакъв растеж или само следи от растеж върху арабиноза, ксилоза, инозит, манит, фруктоза, рамноза, захароза, рафиноза.

VI. Спори

Овални до цилиндрично овални, понякога с неравномерна големина, гладки повърхности. Спорови вериги с повече от 10 спори.

VII. Диаграма на Nonomura

R(Gy) 100 SRA sm(±)(±)(±)-----

За целите на настоящото изобретение са подходящи всички щамове Streptomyces, които продуцират липстатин, особено Streptomyces toxytricini 85-13, NRRL 15443 и неговите субкултури, мутанти и варианти.

Култивирането на тези микроорганизми за получаване на липстатин може да се осъществи по различни ферментационни методи. То може да се извърши например в разклащани колби или в 10 литрови или 200 литрови, или 1000 литрови ферментатори. Известно количество спороносен материал или

мицел от липстатин продуциращ шам се поставя в течна среда, която съдържа подходящи източници на въглерод и азот и необходимите за растежа соли и се култивира при температура от 20° до 37°С в продължение на 1 до 6 дни. Като източници на въглерод са подходящи например декстрин, глюкоза, нишесте, рибоза и глицерин. Подходящи източници на азот са например дрождев екстракт, пептон или соево брашно. Като соли се имат предвид предимно амониева, магнезиева и калциева соли. Ферментацията се провежда при рН 6-8.

Изолирането на липстатина се извършва по обичайни методи, познати на всеки специалист, и може да се осъществи, напр. както следва .

След завършване на ферментацията ферментната суспензия се центрофугира, след което 60 до 90% от активността на клетъчната маса и на остатъка се намира в центрофугата. Клетъчната маса след това може да се обработи с низш алкохол като метанол и етанол и да се екстрахира със същия разтворител. Центрофугатът може да се екстрахира с подходящ органичен разтворител, напр. с метиленхлорид или етилацетат. Полученият от екстрактите материал съдържа желания липстатин и може да бъде обогатен и пречистен с хроматографски методи. Подходящи методи са например многократна екстракция със система хексан/метан/вода (50:40:9), филтрационна хроматография върху кизелгел при елуиране с хлороформ, колонна хроматография върху кизелгел при елуиране с хексан, етилацетат и смеси от същите, хроматография върху неполярни носители при елуиране с полярни разтворители като метанол (хроматография с обърнати фази) и високоефективна течна хроматография.

Съдържащите се в следващите примери подробни данни се отнасят за култивирането на *Streptomyces toxytricini* 85-13 и за изолирането на липстатина.

Тетрахидролипсатинът, съединението с формула Ib, може да се получи като липстатин се хидрира в присъствие на подходящ катализатор. Като катализатори се използват напр. паладий/въглен, платинов оксид, паладий и подобни. Подходящи разтворители са напр. низшите алкохоли като метанол и етанол. Работи се предимно при ниско водородно налягане и при стайна температура.

Съединенията с формула I могат да се използват като лечебни средства, напр. под формата на фармацевтични препарати. Фармацевтичните препарати могат да се приемат орално напр. под формата на таблетки, филмтаблети, дражета, твърди и меки желатинови капсули, разтвори, емулсии или суспензии. За приготвяне на фармацевтичните препарати продуктите съгласно изобретението могат да се преработват с фармацевтично инертни, неорганични или органични носители. Като такива носители за таблетки, филмтаблети, дражета и твърди желатинови капсули могат да се използват напр. лактоза, царевично нишесте или негови производни, талк, стеаринова киселина или нейна сол и подобни. Като носители за меки желатинови капсули са подходящи, напр. растителни масла, восъци, мазнини, полутвърди и течни полиоли и подобни. Според свойствата на действащата съставка при меките желатинови капсули, обаче, изобщо не се изискват никакви носители. За приготвянето на разтвори и сиропи като носители са подходящи, напр. вода, полиоли, захароза, инвертна захар, глюкоза и подобни.

Фармацевтичните препарати освен това могат да съдър-

жат още консерванти, посредници за разтварянето, стабилизатори, омрежващи средства, емулгатори, подсладители, оцветители, ароматизиращи средства, соли за промяна на осмотичното налягане, буфери, обвиващи средства или антиоксиданти. Те могат също да съдържат и други терапевтично ценни вещества.

Както беше споменато в началото, лекарствените средства, съдържащи съединения с формула I, също са предмет на настоящото изобретение, а също и метод за получаването на такива лекарствени средства, който се характеризира с това, че съединение с формула I и в даден случай едно или повече други терапевтично ценни вещества, се привеждат в галенична форма за приложение. Както беше споменато в началото, съединенията с формула I могат да се прилагат за лечение или предотвратяване на заболявания, а именно особено при *Obesitas* и хиперлипемия. Дозировката може да варира в широки граници и естествено, във всеки отделен случай трябва да съответства на индивидуалните дадености. Най-общо при орално приемане дневната доза се определя на около 0,1 mg до 100 mg/kg телесно тегло.

Съединенията с формула I могат да се добавят към промишлено получавани хранителни средства, при което се имат предвид най-вече мазнини, масла, краве масло, маргарин, шоколад и други сладкарски изделия. Такива промишлено приготвяни хранителни средства и тяхното получаване също са предмет на настоящото изобретение.

Следващите примери изясняват по-подробно изобретението, без да го ограничават. Всички температури са дадени в Целзиеви градуси.

ПРИМЕР 1

а) Ферментация

В разклащаща се колба със среда за предварително култивиране 391 се внасят спори от *Streptomyces toxytricini* 85-13 (или вегетативен мицел от него) и се инкубират аеробно 72 часа при 28°C като разклащана култура. Около 2 до 5 обемни % от тази култура се използват за заразяване на предварителна култура във ферментатор от 10 литра с предварителна културална среда 391. Инкубира се в продължение на 3 дни при 28°C, при което се аерира с 1 vvm и се разбърква с 400 оборота за минута. Тази 10 литрова предварителна култура се използва за заразяване на 200 литров производствен ферментатор с производствена среда № 7. Ферментира се в продължение на 124 часа при 28°C, при което се аерира с 1,0 vvm и се разбърква при 150 оборота за минута. Регулярните анализи показват след 124 часа извънклетъчна инхибираща липазата активност 53 IC₅₀/ml.

Предварителната културална среда 391 (pH 7,0) има следния състав: 3% царевично нишесте, 4% декстрин, 3% соево брашно, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,6% CaCO₃ и 0,8% соево масло. pH се довежда до 7. Производствената среда № 7 (pH 7,0) има следния състав: 1% картофено нишесте, 0,5% глюкоза, 1% рибоза, 0,5% глицерин, 0,2% пептон, 2% соево брашно и 0,2% (NH₄)₂SO₄.

б) Обработване

Ферментационната суспензия се центрофугира през тръбна центрофуга, при което се получава 175 литра филтрат от културата и 12 kg мицел. Мицелът се изхвърля, а филтратът от културата се нагрява в продължение на 10 минути при 80°C,

охлажда се и отново се центрофугира, след което се концентрира под вакуум при 30° до 50 литра. Този концентрат се екстрахира с 50 литра хексан посредством непрекъснато действащ екстрактор. Получената емулсия се смесва с 50 литра хексан/етилацетат 1:1 и органичната фаза се отделя. Последната се суши над натриев сулфат и се изпарява. Получават се 199 g суров екстракт I. Водната фаза се разрежда до 100 литра с вода и се екстрахира с 100 литра етилацетат. След изпаряване на етилацетатния разтвор се получава 49 g суров екстракт II. След това водната фаза се екстрахира още един път с 100 литра етилацетат, при което след изпаряване се получава 78 g суров екстракт III.

с) Пречистване

Суровите екстракти II и III се филтрират на 3 порции през по 1 kg кизелгел 60 (големина на зърната 0,040-0,063 mm), при което се елуира с хлороформ (колони 10 x 100 cm). По този начин се получава 18,3 g обогатен материал. 17,8 g от тази субстанция отново се филтрира през 1 kg кизелгел при елуиране с хлороформ. Така се получава 5,29 g активен материал. 802 mg от тази субстанция се пречистват посредством хроматография с обърнати фази на търговско достъпна готова колона Lobar (Lichorger RP-8, големина C) при елуиране с метанол. Получава се 158 mg лактон на (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-7,10-хексадекадиенова киселина (липостатин), който при стайна температура е жълтеникаво масло. При ниски температури той е представлява : восъкоподобни кристали.

Микроанализ (сушен 20 часа при висок вакуум при 50°): Изчислено за $C_{29}H_{49}N_1O_5$ (491,713): C 70,84, H 10,04,

N 2,85. Намерено: с 70,85, Н 9,97, N 2,59.

Оптическо въртене: $[\alpha]_D^{20} = -19,0^\circ$ (с = 1, в хлороформ).

Масспектър (химическа йонизация с NH_3 като реактивен газ): пикове между другото при m/z 509 ($M + \text{NH}_4^+$) и 492 ($M + \text{H}^+$).

ИЧ спектър (филм): ивици между другото при 3318, 3012, 2928, 2558, 2745, 1823, 1740, 1673, 1521, 1382, 1370, 1250, 1191 cm^{-1} .

Чрез химическо разграждане на липстатина и сравняване на получените фрагменти с познати вещества се потвърждава абсолютната конфигурация.

ПРИМЕР 2

а) Ферментация

С предварителна култура, получена съгласно пример 1 от *Streptomyces toxytricini* 85-13 (колба за разклащане и след това ферментация в 10 литра), се заразява 200 литра ферментационна производствена среда № 16. Производствената среда № 16 отговаря на използваната в пример 1 производствена среда № 7, която обаче съдържа добавка 0,1% свинска мас. Ферментацията се провежда както в пример 1, в продължение на 120 часа. След 120 часа интрацелуларната инхибираща липазата активност възлиза на 71 IC_{50}/ml , а екстрацелуларната е 4 $\text{IC}_{50} / \text{ml}$ ферментационна маса.

б) Обработване

След завършване на ферментацията ферментационната маса се нагрява 10 минути при 80° , след това се охлажда и клетъчната маса се отделя посредством тръбна центрофуга. Чрез двукратно центрофугиране се получава 11,4 kg мицел; филтратът

от културата се изхвърля. Мицелът се разбърква в продължение на 30 минути в 70 литра метанол, след което получената суспензия се отнучва. Филтърната утайка се разбърква още веднъж с 50 литра метанол и се отнучва. Обединените метанолни екстракти се концентрират до 1,8 литра. Този концентрат се екстрахира три пъти с по 2 литра бутилацетат. От пречистените органични фази след изпаряване се получава 160 g суров екстракт.

с) Пречистване

Този суров екстракт се пречиства чрез многократна екстракция със система хексан/метанол/вода (5:4:0,9). Най-напред активната субстанция се прехвърля от долната фаза (иР) в горната фаза (оР). 160 g суров екстракт се разтваря в 4 литра иР и се разбърква в съд за разбъркване с 4 литра оР. След отделяне на оР иР се екстрахира втори път с 4 литра прясна оР. Образува се стабилна емулсия, към която се добавят още по 4 литра иР и оР, след което се достига добро разделяне на фазите. След отделяне на оР иР се екстрахира още два пъти с 8 литра прясна оР. Обединените оР дават след изпаряване 90,3 g екстракт. Екстрахираната иР се изхвърля. Тогава активната субстанция се прехвърля от оР в иР. 90,3 g от горния екстракт се разтваря в 4 литра оР и се екстрахира с 4 литра иР. След разделяне на фазите оР се екстрахира още 3 пъти с прясна иР. Накрая оР се изхвърля. Обединените иР се концентрират до 0,7 литра водна фаза и последната се екстрахира 8 пъти с общо 0,2 литра етилацетат. След изпаряване се получава 25,8 g продукт. Екстрахираната водна фаза се изхвърля. По-нататъшно пречистване на този материал се постига чрез филтриране върху 1 kg кизелгел 60 (големина на зърната 0,040-0,063 mm; колона 10 x 100 cm) при елуиране с хлороформ. Получава се 649 mg

продукт, който се хроматографира на готова колона Lobar (Lichorger RP-8, големина C) при елуиране с метанол (хроматография с обърнати фази). Получава се 204 mg липстатин, който съгласно тънкослойната хроматограма е чист.

ПРИМЕР 3

138 mg липстатин се разтварят в 10 ml етанол, прибавя се 60 mg 5%-ен паладий/въглен и се разбърква при стайна температура в продължение на 3 часа в атмосфера от водород (балон). След това катализаторът се центрофугира. Продуктът на хидрирането се хроматографира на колона от кизелгел (1 x 5 cm). Получава се 112 mg лактон на (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-формамидо4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-хексадека-нова киселина (тетрахидролипстатин) като восъкоподобна слабожълто твърдо тяло.

Оптическо въртене: $[\alpha]_D^{20} = -32,0^\circ$ (c=1, в хлороформ).

Масспектър (химическа йонизация с NH_3 като реактивен газ): пикове между другото при m/z 513 ($\text{M} + \text{NH}_4^+$); ($\text{M} + \text{H}^+$) и 452 ($\text{M} + \text{H}^+ - \text{CO}_2$).

ИЧ спектър (филм): ивици при 3332, 2956, 2921, 2853, 1838, 1731, 1709, 1680, 1665, 1524, 1383, 1249 и 1200 cm^{-1} .

^1H -ЯМР спектър (270 MHz, CDCl_3) : 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 и 8,21 (1H) ppm.

ПРИМЕР 4

а) Ферментация

Двулитрова разклащана колба със среда 391 се заразява със спори от *Streptomyces toxytricini* 85-13 от култура на кос агар и се инкубира аеробно в продължение на 72 часа при 28°C. След това двулитровата предварителна култура се прехвър-

ля в 50-литров ферментатор с производствена среда № 16 и се инкубира при 28°C в продължение на 77 часа, като се аерира с 0,5 vvm. Тази 50-литрова предварителна култура се прилага за заразяване на 1000-литров ферментатор със среда № 16. Тази производствена ферментация се провежда при 28°C и аериране с 0,5 vvm в продължение на 91 часа, при което се достига титър на липстатина 73 IC₅₀/ml вътреклетъчно и 16 IC₅₀/ml извънклетъчно. Цялата ферментационна течност се охлажда до 2°C и се центрофугира, при което изпада 41 kg влажна биомаса, която се замразява при -20°C.

б) Обработване

37 kg мицел се размразява при 4°C и се хомогенизира в миксер с около 40 литра вода. Получената леснотечлива суспензия се смесва с 140 литра метанол и се разбърква в продължение на 20 минути, след това се отнучва през филтърно платно, след което филтърната утайка се екстрахира с още 140 литра метанол. Метанолните екстракти се концентрират при 30°C до около 22 литра. Полученият концентрат се разрежда с вода до 50 литра и се екстрахира в разбъркван съд 3 пъти с по 50 литра хексан/етилацетат (1:1). При втората и третата екстракция се получават емулсии, които могат да се разрушат чрез прибавяне на около 1,4 kg, съответно 0,5 kg, натриев хлорид. Обединените органични екстракти се концентрират, сушат се над натриев сулфат и се изпаряват до масловиден остатък. Получава се 428 g суров екстракт.

с) Пречистване

Този суров екстракт се филтрира на 4 порции през по 1 kg кизелгел 60 (големина на зърната 0,040-0,063 mm), при което се елуира с хлороформ (колона: 10 x 100 cm). Получава

се 70 г обогатен препарат, който се филтрира на две порции през по 1 kg кизелгел 60 при елуиране с хексан/етилацетат (градиент от 9:1 до 4:1). Получават се 4,2 г активен материал, който се пречиства на 4 порции посредством хроматография с обърнати фази на готова колона Lobar (Lichorper RP-8, големина C), като се елуира с метанол. Получава се 1,77 г липстатин.

ПРИМЕР А

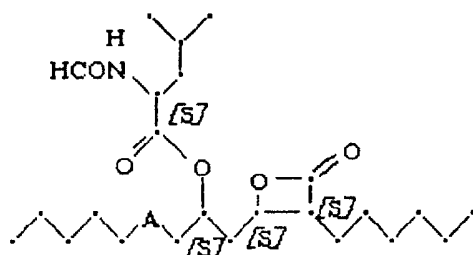
Получаване на меки желатинови капсули със следния състав:

	Количество за капсула
Липстатин	50 mg
НЕОВЕЕ М-5	450 µl

Разтворът на действащата съставка в НЕОВЕЕ М-5 се напълва в меки желатинови капсули с подходящ размер.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Съединение с обща формула



където А означава групата



или $-(CH_2)_5-$

2. Лактон на (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-7,10-хексадекадиенова киселина.

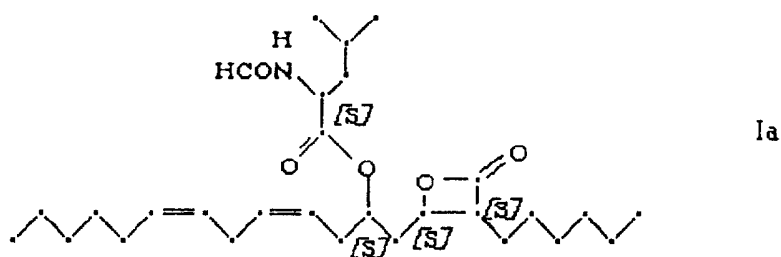
3. Лактон на (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-хексадеканова киселина.

4. Съединение съгласно претенция 1,2 или 3 за използване като терапевтично активно вещество.

5. Съединение съгласно претенция 1,2 или 3 за използване като активно вещество, инхибиращо панкреасната липаза.

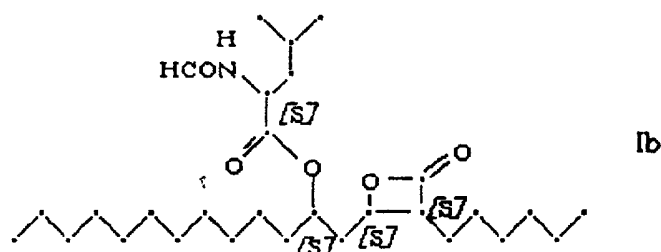
6. Метод за получаване на съединение съгласно претенция 1, 2 или 3, характеризиращ се с това, че:

а) за получаване на лактон на (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-7,10-хексадекадиенова киселина с формула



се култивира аеробно продуциращ това съединение микроорганизъм от вида *Streptomyces toxytricini* във водна културална среда, която съдържа подходящи източници на въглерод и азот и неорганични соли, и продуцираното съединение с формула Ia се изолира от културалната среда или

b) за получаване на лактон на (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-формамидо-4-метил-валерилокси]-2-хексил-3-хидрокси-хексадеканова киселина с формула



се хидрира съединение с формула Ia.

7. Метод съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че като микроорганизъм се използва *Streptomyces toxytricini* 85-13, NRRL 15443 и неговите субкултури, варианти или мутанти, продуциращи съединение с формула Ia.

8. Лекарствено средство, характеризиращо се с това, че съдържа съединение съгласно претенция 1, 2 или 3 и терапевтично инертен носител.

9. Лекарствено средство съгласно претенция 8, характеризизиращо се с това, че инхибира панкреасната липаза.

10. Промислено приготвено хранително средство, характеризизиращо се с това, че съдържа съединение съгласно претенция 1, 2 или 3.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Б. Божков

Пор. 37770

Тираж: 40 ЗС