

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149587 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4963/78

(51) Int.Cl.⁴: C 07 D 211/46

(22) Indleveringsdag: 08 nov 1978

(41) Alm. tilgængelig: 11 maj 1979

(44) Fremlagt: 04 aug 1986

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: 10 nov 1977 JP 52/135505

(71) Ansøger: *NIPPON SHINYAKU CO. LTD.; Kyoto, JP.

(72) Opfinder: Shingo *Matsumura; JP, Hiroshi *Enomoto; JP, Yoshiaki *Aoyagi; JP, Yoji *Ezure; JP, Yoshiaki

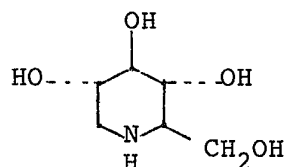
*Yoshikuni; JP, Masahiro *Yagi; JP.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af moranolin

LN 149587 B

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af moranolin (2-hydroxymetyl-3,4,5-trihydroxypiperidin) med formlen

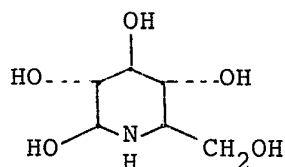


I

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i patentkravets kendetegnende del anførte.

Nærværende opfindere har tidligere som de første isoleret et stof med formel I ud fra morbærplanter (*Morus*) og en kinesisk medicin, en urtemedicin der går under betegnelsen "Soh-hakuhi" (rodbarken af morbær) som et naturligt forekommende stof, og de gav stoffet navnet "moranolin" (Yagi et al, *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*: vol 50, side 571 (1976)), og de viste at moranolin har en meget nyttig virkning som medicinsk produkt med hensyn til at inhibere forøgelse af blodsukker hos sukkerbelastede dyr. Der er senere foretaget yderligere undersøgelser med henblik på at finde frem til en fremgangsmåde til kommerciel fremstilling af stoffet moranolin, og som resultat heraf er det nu lykkedes at finde en meget fordelagtig fremgangsmåde til fremstilling af moranolin, hvilket er udtrykt ved den foreliggende opfindelse.

Som fremgangsmåde til fremstilling af moranolin kendes der ud over ekstraktion fra *Morus* og andre planter kun reduktion af nojirimycin, der har formlen



II

et antibiotikum der frembringes af en slags actinomycet, ved hjælp af en platinkatalysator eller natriumborhydrid (Inoue et al, *Tetrahedron*, 23, 2125 (1968)).

Fremstilling af nojirimycin ved gæring og rensning af dette stof er beskrevet i de japanske patentpublikationer nr. 760/1968 og 5033/1970, offentliggjort henholdsvis 11/1 1968 og 19/2 1970, og herfra er det kendt af nojirimycin er et yderst ustabilt stof og at sønderdeling indtræder selv under neutrale betingelser, samt at stoffet også let sønderdeles under sure betingelser. Det er derfor yderst vanskeligt at isolere nojirimycin fra en kulturopløsning deraf, og de ovennævnte patentbeskrivelser angiver også at der hertil behøves mange besværlige operationer, herunder først og fremmest ionbytter-søjle-kromatografi, og at den største omhu udkræves herved; det anføres desuden at selv om der anvendes en rensningsmetode over et svovlsyrling-addukt, der har været anset for fordelagtigt, indtræder der dog tab på 50% eller derover i rensningstrinnet. Hvad angår fremstilling af moranolin med formel I ud fra det resulterende rensede nojirimycin er udbyttet deraf yderligere kun 50% eller derunder, selv når der bruges en kostbar platin-katalysator. Som samlet resultat af disse kendsgerninger gælder det at hvis moranolin med formel I skal fremstilles ud fra nojirimycin med formel II fra en kulturopløsning, vil en sådan produktion kræve mange besværlige operationer og trin, og ikke desto mindre andrager det samlede udbytte kun 15-20%; det har derfor ikke været muligt at gennemføre en sådan fremgangsmåde som en kommerciel produktionsmetode.

I forbindelse med den foreliggende opfindelse er der gjort undersøgelser for at finde en kommercielt fordelagtig produktionsmetode for moranolin, der er et nyttigt medicinsk produkt, og som følge heraf har det nu overraskende vist sig at det er muligt at fremstille moranolin i næsten kvantitativt udbytte, hvis man katalytisk reducerer en kulturopløsning fra dyrkning af en actinomyces og indeholdende nojirimycin som den er, hvorefter man behandler den resulterende reducerede kulturopløsning med en ionbytterharpiks. Som katalysator kan der fx anvendes en raneynikkel-katalysator. Som eksempler på andre egnede metalkatalysatorer kan der nævnes mangan, zink, kobolt, kobber og lignende metaller, men først og fremmest foretrækkes det at bruge raneynikkel. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ikke blot fordelagtig ved at udbyttet af mora-

nolin (I), regnet ud fra den mængde nojirimycin (II) der findes i mediet, med et slag forbedres til det femdobbelte af det der fås ved den konventionelle metode eller mere, men også at et antal besværlige trin til ekstraktion og isolation af nojirimycin undervejs bliver helt overflødige, og alligevel er det også muligt at forenkle operationerne til ekstraktion og rensning af slutproduktet i betydelig grad. Hvis nemlig nojirimycin ekstraheres fra dyrkningsopløsningen som det sker ved den konventionelle fremgangsmåde, vil næringsstoffer og stofskifteprodukter eller nedbrydningsprodukter af nojirimycin i mediet delvis gå med over i ekstrakten, hvorved isolering og rensning af nojirimycin vanskeliggøres, vanskeligheder der skal lægges til selve nojirimycinets ustabilitet. I modsætning hertil har det uventet vist sig at de inhiberende stoffer denatureres under reduktionsprocessen ifølge den foreliggende opfindelse, og når man udfører operationen med at ekstrahere og isolere moranolin fra den reducerede dyrkningsopløsning ved en ionbytterbehandling, indgår disse biprodukter næsten ikke i den resulterende ekstrakt. Selv om der skulle blive indblandet en ganske lille mængde biprodukter i ekstrakten, er det muligt let at udføre rensning ved saltdannelse med en almindelig mineralsyre eller en passende organisk syre på sædvanlig måde. I kraft af denne iagttagelse er der opnået en forenkling af fremgangsmåden til fremstilling af moranolin langt ud over hvad der kunne ventes, og i kombination med den kendsgerning at der opnås næsten kvantitativt udbytte af det ønskede stof er den foreliggende fremgangsmåde til fremstilling af moranolin kommercielt meget værdifuld.

Renheden af de omhandlede stoffer belyses nærmere ved tegningen, på hvilken

fig. 1 viser et tyndlagskromatografi af rå moranolin vundet ved den fremgangsmåde der er beskrevet i omstående eksempel 1, mens

fig. 2 viser et tyndlagskromatografi af rå nojirimycin vundet fra samme medium.

I begge tilfælde var asorbenten silikagel, fremkalderopløsningsmidlet ætanol/vand/kloroform 4:2:1 og bestemmelsen

skete ved hjælp af en hydrogenflamme-ioniseringsdetektor (synkrograf fremstillet af Yatoron).

Fig. 1 og 2 viser altså henholdsvis et tyndlagskromatogram af moranolin vundet ved behandling på en ionbytterharpiks som beskrevet i eksempel 1, og af rått nojirimycin vundet ved ekstraktion fra samme kulturopløsning ved den fremgangsmåde der er beskrevet i ovennævnte japanske patentpublikation nr. 760/1968. Fig. 2 viser at nojirimycin, der er prekursor for reduktionen til moranolin, er til stede i blanding med forskellige urenheder i betydelig mængde, der hæmmer ekstraktionen deraf. Derimod er moranolin vundet ved ekstraktion i henhold til opfindelsen næsten frit for urenheder som det ses af fig. 1.

Hvad angår den metalkatalysator der fortrinsvis anvendes ved fremgangsmåden, kan man med fordel bruge en hvilken som helst slags aktiveret nikkelkatalysator, men i almindelighed er kommercielt tilgængelige, industrielle raneynikkel-katalysatorer tilstrækkelige.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal i det følgende belyses nærmere ved nogle eksempler.

Eksempel 1

En nojirimycinproducerende actinomyces af slægten *Streptomyces* podes i 5 liter flydende medium indeholdende 2% stivelse, 1% sojabønnepulver, 0,05% KCl, 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5% NaCl og 0,35% $CaCO_3$, og der udføres rysteinkubering ved 27°C i 3 timer under luftning. Efter fuldførelse af inkubering tilføjes der 500 g filterhjælp ("High-Flow Super-Cell") efterfulgt af filtrering, hvorved der vindes 4,4 liter filtrat. Indholdet af nojirimycin i dette filtrat var 500 µg/ml, bestemt ved en biologisk bestemmelsesmåde under anvendelse af β-glucosidase (Niwa et al, Agr. Biol. Chem. 34, 966, 1970).

Til 500 ml af denne kulturopløsning sættes ca. 10 ml kommercielt tilgængeligt industrielt raneynikkel og der udføres omrøring i en strøm af hydrogen ved stuetemperatur og under atmosfæretryk. På 6 timer absorberes der ca. 200 ml hydrogen, hvorefter absorptionen standses. Katalysatoren fra-

skilles ved filtrering og det resulterende filtrat føres gennem en kolonne indeholdende 300 ml "Dowex" [®] 1 x 2 (OH-formen), og den resulterende effluent føres gennem en kolonne indeholdende 200 ml "Dowex" [®] 50W x 4 (H-formen). Kolonnen vaskes med 2 liter vand efterfulgt af eluering af de adsorberede stoffer med 0,5% ammoniakvand. Det resulterende eluat koncentrerer og inddampes til tørhed under nedsat tryk, og der vindes lyse gulbrune krystaller. Udbytte 280 mg. Tyndlagskromatogrammet for dette produkt er som nævnt vist i fig. 1. Omkrystallisation fra metanol giver 218 mg rensat moranolin. Smp.: 203-205°C, $[\alpha]_D^{24} = 44,6^{\circ}$ (vand). Udbytte 87%.

Eksempel 2

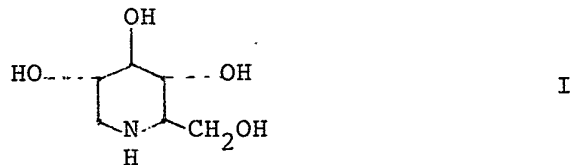
Til 360 ml filtrat, indeholdende 500 µg/ml nojirimycin, fra en kultur af en nojirimycin-producerende actimycet, vundet på samme måde som beskrevet i første afsnit af eksempel 1, sættes der 50 mg 5% Pd/C og blandingen omrøres natten over i en hydrogenstrøm ved stuetemperatur og normaltryk. Katalysatoren fjernes ved filtrering og filtratet behandles som beskrevet i eksempel 1 til frembringelse af 149 mg rent moranolin. Udbytte 83%.

Eksempel 3

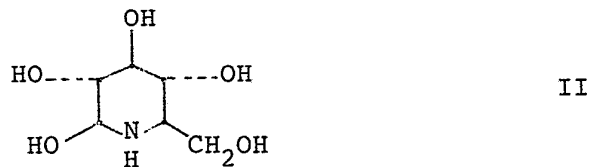
Til 500 ml kulturfiltrat fra dyrkning af en nojirimycin-producerende actinomyces, vundet på den i første afsnit af eksempel 1 beskrevne måde og indeholdende 500 µg/ml nojirimycin, sættes der 10 mg platinsort. Blandingen omrøres natten over i en hydrogenstrøm ved stuetemperatur og normaltryk, hvorpå den behandles som beskrevet i eksempel 1 til frembringelse af 170 mg moranolin.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til fremstilling af moranolin med formlen



ved katalytisk reduktion af nojirimycin med formlen



k e n d e t e g n e t ved at man reducerer en kulturopløsning fra en actinomyceskultur indeholdende nojirimycin ved hjælp af en metalkatalysator, hvorefter man isolerer moranolin fra den resulterende opløsning ved hjælp af en ionbytterharpiks.

Fremdragne publikationer:

