(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) 143414 **B**

(21) Ansøgning nr. 1596/78
(22) Indleveringsdag 11. apr. 1978
(24) Løbedag 11. apr. 1978
(41) Alm. tilgængelig 12. okt. 1979
(44) Fremlagt 17. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet -

(51) Int.Cl.³ C 12 P 21/00
C 07 G 7/00

(71) Ansøger HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, 6230 Frankfurt/Main 80, DE.

(72) Opfinder Volker Oeding, DE: Werner Pfaff, DE: Laszlo Vertesy, DE: Hans-Ludwig Weidenmueller, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en glycosidhydrolase-inhibitor.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en hidtil ukendt inhibitor af glycosidhydrolaser i fordøjelsesområdet, især af α-amylase fra pankreas.

Inhibitorer af glycosidhydrolaser ud fra mikroorganismer, især Actinomyceter, er kendte. De hidtil nærmere undersøgte stoffer henhører kemisk til oligo- eller polysaccharid-klassen. Tilsvarende inhibitorer med sandsynlig peptidkarakter er beskrevet som varmelabile, mere eller mindre let inaktiverbare med trypsin og først og fremmest forholdsvis mindre aktive.

Man har nu i dyrkningsblandinger af Streptomyces tendae, stamme 4158, fundet et højaktivt hæmningsstof for α-amylase fra pankreas, hvilket stof kemisk hører til peptiderne.

DK 143414 B

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde til fremstilling af en peptidisk glycosidhydrolase-inhibitor, der har en molekylvægt på 5000-10.000, et absorptionsmaksimum i UV-lys ved 276 nm, et isoelektrisk punkt på 4,4 og en aminosyresammensætning som nedenfor angivet, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man dyrker Streptomyces tendae 4158 (ATCC nr. 31210) i et dyrkningsmedium, der indeholder mindst én carbonkilde, mindst én nitrogenkilde og uorganiske salte, og fra kulturen udvinder inhibitoren.

Den her omhandlede inhibitor har som nævnt en relativ høj molekylvægt. Den diffunderer ikke eller i givet fald kun meget lidt gennem gængse dialyseringsmembraner, såsom "Visking"--slanger. Bestemmelsen af den nøjagtige molekylvægt er følgelig vanskelig, og man når med forskellige bestemmelsesmetoder til divergerende resultater. Anvender man den analytiske ultracentrifuge (jf. Biochemisches Taschenbuch, 2. del, side 746-767) til bestemmelse af molekylvægten, fås der værdier på ca. 10.000. Anvendes der derimod molekyl-sigter, såsom "Sephadex" ® G-50 superfin, konstateres der en molekylvægt på 5000 eller endog derunder. I overensstemmelse hermed må man på basis af de nu foreliggende undersøgelsesresultater antage, at molekylvægten ligger mellem 5000 og 10.000.

Den her omhandlede forbindelse er en farveløs substans. Men den absorberer som nævnt ultraviolet lys med et ved 276 nm liggende maksimum, der ved 281 nm udviser en skulder. $E^{1\%}_{1\ cm} = \underline{16}$. Tegningen viser et absorptionsspektrum.

Inhibitoren er ifølge sin kemiske struktur et peptid. Den kan ved hydrolyse spaltes i aminosyrer. Det er hidtil ikke lykkedes at påvise andre bestanddele foruden aminosyrerne. Bestemmes aminosyresammensætningen med den af St. Moore og W. H. Stein (jf. Methods in Enzymology, bind VI, side 819-831, udgivet af Colovick og Kaplan i Academic Press, New York, London 1963) angivne metode, konstateres følgende sammensætning

Asparaginsyre	5-6
Threonin	5-6
Serin	3-5
Glutaminsyre	5-6
Prolin	2-3
Alanin	5-6

Glycin	5-6
Cystein	3-4
Valin	5-6
Isoleucin	1-2
Leucin	3-4
Tyrosin	4-5
Phenylalanin	0-2
Histidin	1-2
Lysin	0-1
Arginin	2-3
Tryptophan	1-2

Værdien af tryptophan vurderes ud fra absorptionen af ultraviolet lys. Det er naturligt, at resultaterne af aminosyreundersøgelsen ikke altid tyder på et bestemt, heltalligt mængdeforhold, og at sådanne målinger sædvanligvis er behæftet med visse fejl. I overensstemmelse hermed beror de i opstillingen gengivne variationsgrænser ikke på inhibitorens uensartethed, men på analysemetodens uundgåelige måleunøjagtighed. Det er imidlertid kendetegnende for den her omhandlede inhibitor, at aminosyrerne asparaginsyre, glutaminsyre, threonin, glycin, alanin og valin udgør en over gennemsnittet liggende molekylandel af peptidet, og at methionin fuldstændig synes at mangle i det rene stof. Da methionin er en vidt udbredt aminosyre, er dens vidtgående fraværelse et godt kendetegn for den her omhandlede inhibitor og kan især også ved berigelsesmetoder tjene til bestemmelse af produktets renhed.

Den her omhandlede inhibitor reagerer positivt på peptidreagenser, men negativt på phenol-svovlsyre.

Den her omhandlede α-amylase-inhibitor indeholder ingen sukkerandel. Derved, samt ved dens aminosyresammensætning, dens molekylvægt og dens isoelektriske punkt, adskiller den sig fra alle kendte α-amylase-inhibitorer. Rene præparater af inhibitoren udviser en aktivitet på 2-3 x 10^6 AIE/g.

Af et stof af peptidnatur at være udviser den omhandlede amylaseinhibitor en bemærkelsesværdig termisk stabilitet. Selv kogning i et neutralt eller svagt surt medium (pH-værdi ca. 4-8) i ét minut er uden nævneværdig indflydelse på dens glycosidhydrolase--hæmmende egenskaber.

Inhibitoren inaktiveres kun meget langsomt proteolytisk med pepsin, trypsin eller chrymotrypsin i sammenligning med andre proteiner. Under den terapeutiske virketid kan man derfor ikke regne med en nævneværdig aktivitetsformindskelse i fordøjelsesområdet.

Inhibitoren udviser en høj virkningsspecifitet. α-Amylasen fra pankreas hæmmes overordentlig stærkt, hvorimod bakterielle α-amylaser, f.eks. sådanne af Bacillus subtilis, ikke inhiberes måleligt. På samme måde er der ikke iagttaget nogen virkning mod β-amylaser.

Selv ringe doseringer af den her omhandlede amylaseinhibitor fører til en fuldstændig hæmning af pankreasamylases enzymatiske aktivitet. Dette undersøgelsesresultat kan ikke forklares med de klassiske hæmningsmekanismer, ved hvilke hæmningen af den enzymatiske katalyse afhænger af det relative mængdeforhold mellem inhibitor og substrat (stivelse). Man må snarere antage, at den her omhandlede inhibitor bevirker en irreversibel inaktivering af pankreasamylase.

Til fremstilling af amylaseinhibitoren anvender man ifølge opfindelsen stammen Streptomyces tendae 4158. Denne stamme adskiller sig fra originalstammen S. tendae (jf. Ettlinger et al., Arch. Mikrobiol. 31, 351 (1959)) hvad angår dens spore-morfologi. Sporerne er kugleformede og har en diameter på 1 µ. Stammens egenskaber er som følger:

Substratmyceliets farve:	gulbrun, ingen farveændring ved pH-forskydning
Det sporebesatte luft-myceliums farve:	gråbrun (light greyish reddish brown ifølge: ISCC methods of designating colors)
Sporekædernes morfologi:	Retinaculum apertum (RA)
Sporemorfologi:	kugleformede sporer med en gennemsnitsdiameter på 1 µ. Glat til let vortet overflade.
Melanindannelse på pepton-medium:	positiv
Nitratreduktion:	positiv
Substratudnyttelses-spektrum:	Glucose ++ Arabinose + Saccharose + Xylose + Inositol ++ Mannitol ++ Fructose + Rhamnose ++ Raffinose +- Cellulose -

Stammen Streptomyces tendae 4158 er deponeret hos American Type Culture Collection (ATTC) under registreringsnummeret 31210.

Fermenteringen kan gennemføres ved 25-35°C, fortrinsvis ved 28-30°C, enten submers i rystekultur eller i fermentationsbeholdere af forskellig størrelse under omrøring og beluftning.

Dyrkningsmediet indeholder foruden de ved dyrkning af mikroorganismer sædvanligvis anvendte uorganiske salte mindst én carbonkilde, såsom stivelse, glucose, rørsukker, fructose, lactose, glycerol eller melasse samt mindst én nitrogenkilde, såsom sojamel, majsstøbevand, gærekstrakt, bomuldsfrømel, jordnøddemel, peptoner, mælkepulvere, nitrater eller ammoniumsalte.

Den optimale sammensætning har vist sig at være (vægt-% i opløsning) 3-5% opløselig stivelse, 0,2-0,6% majsstøbevand, 0,5-1,5% glucose, 0,5-1% $(NH_4)_2HPO_4$, 0,3-0,6% sojamel og 0,5-1,5% caseinpepton. Også på andre stivelsesholdige næringsmedier, f.eks. bestående af 2-6% jordnøddemel, 1-3% kartoffelstivelse, 3-5% havremel, 3-5% vallepulver, 1-2% vallesirup og 1-2% mælkesukker, fås amylaseinhibitoren i godt udbytte, idet valget af nitrogenkilden og pufferandelen, for så vidt man er i fysiologiske områder, ikke er så afgørende. Hvis man imidlertid formindsker eller helt stryger indholdet af stivelse, går inhibitorudbyttet drastisk tilbage. Forøger man på den anden side stivelseskoncentrationen væsentligt over 7%, bliver mikroorganismernes oxygenforsyning suboptimal på grund af den høje viskositet. I overensstemmelse hermed synker inhibitorudbyttet.

I fermentationsblandingen begynder dannelsen af inhibitor som regel mellem den 10. og den 30. time efter fermentationens start. I løbet af de næste 20 timer afsluttes den i vid udstrækning. Længere fermentationstider har ingen uheldig indflydelse på inhibitorudbyttet, men dette forhøjes heller ikke mere nævneværdigt. Deraf fremgår det, at fermentationsblandingerne bør holdes i drift i ca. 30-70 timer.

Til isolering af inhibitoren fjerner man ved centrifugering, filtrering eller fraskillelse gennem sugefilter cellemassen fra fermentationsopløsningen, da størstedelen af det aktive stof som regel befinder sig i den klare dyrkningsvæske.

I tilfælde af at en del af inhibitoren forbliver i cellematerialet på grund af specielle fermentationsbetingelser, volder det ingen vanskeligheder ved hjælp af egnede metoder at ekstrahere det aktive stof derfra, f.eks. ved udrøring med et med vand blandbart, organisk opløsningsmiddel, såsom methanol, hvorved en yderligere macerering af cellematerialet er fordelagtig. Det i ekstraktionsmidlet opløste aktive stof kan ved hjælp af centrifugering eller filtrering befries for de uopløste cellebestanddele og videreforarbejdes som den klare dyrkningsvæske.

Inhibitoren kan på i og for sig kendt måde inden for protein- og peptidkemien isoleres fra dyrkningsvæsken. Dertil egner sig fældninger med vandblandbare, organiske opløsningsmidler, såsom

acetone, isopropanol eller andre lavere alkoholer, eller også med salte, såsom ammoniumsulfat.

Det er endvidere muligt at adsorbere inhibitoren på tilsvarende bærestoffer, f.eks. på aktivt kul, og skille dette fra den vandige opløsning ved filtrering eller centrifugering. Dette kan ske inden for et bredt pH-værdi-område mellem 2 og 10, men fortrinsvis benyttes området mellem 4 og 6. Til fraskillelse af den her omhandlede α-amylase-inhibitor kan der ligeledes anvendes ionbyttere. Da det her omhandlede stof har både sure og basiske egenskaber, altså er amfotert, kan det reagere både med kation- og anionbyttere og ved hjælp af disse fjernes fra fermentationsopløsningen. Herved kan der anvendes de teknikker, der i princippet er beskrevet i kapitlet om ionbyttere i Biochemisches Taschenbuch, udgivet af H. M. Rauen i Springer-Verlag 1964, 2. del, side 808-824.

Ved oparbejdelsen af fermentationsblandinger, der indeholder det her omhandlede stof i dyrkningsvæsken, er det ofte hensigtsmæssigt at koncentrere disse. Hertil kan der anvendes de kendte metoder til destillation, ultrafiltrering, sprøjte- og frysetørring eller andre kendte metoder. Fra det således fremstillede koncentrat kan inhibitoren atter skilles ved hjælp af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder. Af koncentrater, som f.eks. de inddampede dyrkningsfiltrater, kan inhibitoren også beriges ved, at man fjerner de væsentligste urenheder. Således er ekstraktion med organiske opløsningsmidler til fraskillelse af fedtagtige stoffer fordelagtig. Ved dialyse eller eventuelt ultrafiltrering (jf. C. J. O. R. og P. Morris, "Separation Methods in Biochemistry", Ditman Publishing, London 1976, side 944-950) kan opløsningen befries for lavmolekylære stoffer. Højmolekylære stoffer, såsom nucleinsyrer, polysaccarider eller mange æggehvidestoffer kan fjernes ved hjælp af fraktioneret fældning ved udsaltning eller ved tilsætning af et med vand blandbart opløsningsmiddel, såsom acetone eller en lavere alkohol. Tilsætningen af fældningsmidlet doseres i disse tilfælde således, at de let udskillelige stoffer med molekylvægte over 100.000 udfældes, medens α-amylase-inhibitoren forbliver i opløsning. De beskrevne berigelsestrin kan kombineres og varieres i vilkårlig rækkefølge. På denne måde fås opløsninger, der er stærkt beriget med inhibitor.

Den endelige rensning kan gennemføres med forskellige formålstjenlige fremgangsmåder, såsom gel- og ionbytterchromatografi, eller med beslægtede fremgangsmåder, hvis adskillelsesprincip ikke udelukkende beror på ionbytning, som f.eks. adskillelse ved hydroxylapatit.

Endvidere kan der anvendes opløsningsmiddel- eller saltfældninger, præparativ elektroforese eller andre i og for sig kendte fremgangsmåder. Særligt egnede er adskillelse ved diethylaminoethyl-(DEAE)--gruppebærende ionbyttere samt fraktionerede fældninger med ammoniumsulfat eller ethanol, hvorved der endog kan fås krystallinsk materiale.

Den her omhandlede inhibitors egenskaber er interessante med henblik på dens anvendelse som terapeutikum mod diabetes og prædiabetes samt adipositas og diætunderstøttelse.

Stivelsesholdige nærings- og nydelsesmidler fører hos dyr og mennesker til en stigning af blodsukkeret og derved også til en forøget insulinsekretion i pankreas. Hyperglykæmi fremkommer ved spaltning af stivelsen i fordøjelsesområdet til glucose under indvirkning af amylase og maltase.

Hos diabetikere er denne hyperglykæmi særlig udpræget og langvarig.

Hos adipøse virker den forøgede insulinsekretion på lipogenesen og formindsker lipolysen.

Den alimentære hyperglykæmi samt hyperinsulinæmi efter stivelsesoptagelse kan formindskes ved hjælp af den her omhandlede amylase-inhibitor. Denne virkning er afhængig af doseringen. Den her omhandlede amylase-inhibitor kan derfor anvendes som terapeutikum ved diabetes, prædiabetes og adipositas samt til understøttelse af diæt. Til dette formål anbefales en indgivelse, især til måltiderne. Doseringen, der retter sig efter patientens vægt og det individuelle behov, udgør ca. 10.000-300.000 AIE, men den kan i begrundede enkelttilfælde også ligge derover eller derunder.

Den her omhandlede amylase-inhibitor egner sig især til oral indgift. Den kan anvendes som rent stof men også i form af et farmaceutisk præparat under anvendelse af gængse hjælpe- og bærestoffer. Også en kombineret anvendelse med andre lægemidler, såsom blodsukkersænkende eller lipidsænkende stoffer, kan være fordelagtig. Da højmolekylære peptider som sådanne ikke eller ikke nævneværdigt resorberes fra fordøjelsesområdet, kan der af det her omhandlede stof ikke forventes toksikologisk betænkelige bivirkninger. På grundlag af den ikke usædvanlige aminosyresammensætning må også eventuelle proteolytiske spaltningsprodukter anses for fysiologisk acceptable. Svarende hertil er der ved oral indgift af selv stærke doser af amylaseinhibitoren til forsøgsdyr ikke konstateret påfaldende symptomer. Også ved intravenøs indgift til mus (1 g/kg) tåles den her om-

handlede inhibitor ved en observationstid på 24 timer uden mærkbar toksisk virkning.

Til undersøgelse af amylase-inhibitorens farmakologiske virkning indgives det her omhandlede hæmningsstof oralt til fastende hanrotter af Wistar-typen med en vægt på mellem 200 og 250 g samtidig med 2 g stivelse pr. kg legemsvægt, efter at man umiddelbart før har taget en blodprøve til bestemmelse af udgangsblodsukkerværdien. Yderligere blodprøver tages fra halevenen efter 15 og 30 minutter samt efter 1, 2, 3 og 5 timer. Blodsukkerbestemmelserne gennemføres i en Autoanalyzer ifølge den af Hoffman beskrevne metode (jf. J. Biol. Chem. 120, 51 (1937)).

NZO-mus udviser en forstyrret glucosetolerance. De egner sig derfor særlig godt til undersøgelser, ved hvilke blodglucoseniveauet påvirkes. Forsøgsordenen svarer til den for rotterne beskrevne. Blodprøverne tages fra orbitalvene-plexus. Blodsukkerforløbet følges i 3 timer.

Analogt hermed tilvejebringes påvisningen af aktivt stof hos NMRI-mus. Blodprøverne tages ligeledes fra orbitalvene-plexus, og blodsukkerforløbet følges i 3 timer.

Ved disse forsøgsrækker udviser de med den her omhandlede inhibitor behandlede dyr i forhold til ubehandlede dyr en ringere, protraheret blodsukkerstigning.

Amylaseforsøg

En amylase-inhibitorenhed (AIE) er defineret som den inhibitormængde, der under forsøgsbetingelserne formår at hæmme to amylaseenheder (AE) til 50%. En amylaseenhed er efter international overenskomst den enzymmængde, der på 1 minut spalter 1 µ ækvivalent glucosidiske bindinger i stivelsen. De µval spaltede glucosidiske bindinger bestemmes med dinitrosalicylsyre fotometrisk som µval reducerende sukker. Angivelserne er beregnet som µmol maltose, der konstateres ved hjælp af en maltose-målelinje.

Forsøgene gennemføres på følgende måde:

α-amylase fra svinepankreas og den opløsning, der skal undersøges, forinkuberes sammen i 1,0 ml 20 mM phosphatpuffer, pH-værdi 6,9 + 10 mM NaCl i 10-20 minutter ved 37°C. Den enzymatiske reaktion startes ved tilsætning af 1,0 ml opløselig stivelse ifølge Zulkowski (0,25% i den angivne puffer). Efter nøjagtig 10 minutters

forløb standses reaktionen med 2,0 ml dinitrosalicylsyre-farvereagens (ifølge Boehringer Mannheim: Biochemica-Information II) og opvarmes i 5 minutter i kogende vandbad til farveudvikling. Efter afkøling måles ekstinktionen ved 546 nm i forhold til reagensblindværdien. Hæmningen på 50% bestemmes grafisk ved hjælp af sandsynlighedspapir i forhold til den uhæmmede enzymreaktion under anvendelse af forskellige inhibitormængder.

Eksempel 1

Stammen Streptomyces tendae 4158 podes på skråtstillede rør med et næringssubstrat af følgende sammensætning:

50 g havreflager
ad. 1000 ml H_2O pH_A 7,2

Det podede rør inkuberes i 7 dage ved 30°C og holdes derefter ved 4°C. Sporerne skylles bort fra det skråtstillede rør med 10 ml steriliseret, destilleret vand eller en fysiologisk NaCl--opløsning. 1,0 ml af suspensionen anvendes til podning af en 300 ml Erlenmeyer-kolbe, hvori der er fyldt 35 ml steriliseret næringsopløsning med en pH-værdi på 7,7 og følgende sammensætning:

1 % glucose
1 % sojamel
0,25 % NaCl pH 7,7.

Kolben rystes ved 220 opm og 30°C i 48 timer på en rystemaskine ved en amplitude på 4 cm. Dernæst overføres portioner på 5 ml af denne forkultur i flere Erlenmeyer-kolber, hvori der er anbragt 35 ml steriliseret næringsopløsning med en pH-værdi på 8,3. Denne hovedkulturs sammensætning er som følger:

4 % stivelse
0,4 % majsstøbevand
1,0 % glucose
0,8 % $(NH_4)_2HPO_4$
0,4 % sojamel
1,0 % pepton pH_A 8,3.

Hovedkulturerne rystes ligeledes ved 30°C med 220 opm på en rystemaskine med en amplitude på 4 cm i 2-3 dage. På første,

anden og tredje dyrkningsdag bestemmes indholdet af α-amylase--inhibitor ifølge forsøgsforskrifterne.

Stammen Streptomyces tendae 4158 giver under de beskrevne forsøgs- og dyrkningsbetingelser gennemsnitligt 100 AEI/ml ved en slut-pH-værdi på 5,2.

Eksempel 2

Der anvendes samme fremgangsmåde som i eksempel 1, idet der dog til hovedkulturen vælges en fermentationsbeholder med et samlet volumen på 300 liter, hvori der er fyldt 200 liter af en steriliseret næringsopløsning med følgende sammensætning:

4 % stivelse
0,4 % majsstøbevand
1,0 % glucose
0,8 % $(NH_4)_2HPO_4$
1,0 % caseinpepton
0,1 % "Desmophen® 3600" pH_A 8,3-8,5

Sterilisationstiden for blandingen er 45 minutter ved 121°C og 1 bar, hvorved glucosen steriliseres separat og efter afkøling af fermentationsbeholderen til driftstemperatur tilsættes sterilt.

pH-værdien skal efter sterilisationen være 6,8 og indstilles efter behov til denne værdi med steriliseret syre (2 n H_3PO_4) eller base (2 n NaOH). Hovedkulturen podes med 20 liter svarende til 10% af en forkultur, der er fremstillet som beskrevet i eksempel 1 og i en lille fermentationsbeholder med et totalvolumen på 30 liter.

Der fermenteres i 50-70 timer ved 30°C. Beluftningen er 6 m^3/h ved en omrøring på 250 opm og et overtryk på 0,3 bar.

Ved prøvetagning overvåges og følges fermentationsforløbet med hensyn til kulturopløsningens inhibitoraktivitet, substratnedbrydning, biomasseudvikling og fysisk-tekniske forhold (overfladespænding, viskositet, vægtfylde og osmotisk tryk).

Den maksimale inhibitoraktivitet opnås fra den 60. dyrkningstime med gennemsnitlig 105 AIE/ml. Derefter føres indholdet af fermentationsbeholderen til oparbejdning.

Eksempel 3

Der anvendes en fremgangsmåde som i eksempel 1 og 2, idet der dog som hovedtrin anvendes en bioreaktor med et samlet volumen på 4000 liter, hvori der er fyldt 2500 liter næringsopløsning med følgende sammensætning:

6 % stivelse
1,0 % glucose
0,4 % majsstøbevand
0,8 % $(NH_4)_2HPO_4$
1,0 % sojapepton
0,1 % "Desmophen ^{R} 3600" pH_A 7,0-7,3.

Sterilisationstiden for denne blanding er 60 minutter ved 121°C og 1 bar, hvorved glucosen steril-filtreres separat og efter afkøling af fermentationsbeholderen til driftstemperatur pumpes til denne under sterile betingelser.

pH-værdien indstilles - om nødvendigt - med steril syre (H_3PO_4) eller base (NaOH) til en begyndelsesværdi på 7,0-7,3.

Der podes med 200 liter af en forkultur, der er beskrevet og fremstillet under eksempel 2.

Fermentationstiden er 70 timer, hvorved der fermenteres ved en temperatur på 30°C, en beluftning på 60 Nm^3/h, et overtryk på 0,5 bar og ved 180 opm.

Ved prøvetagning - som beskrevet under eksempel 2 - følges alle vigtige proces-, organisme- og aktivitetsdata i hele fermentationstiden.

Efter 70 timers fermentation opnås en gennemsnitlig aktivitetskoncentration på 95 AIE/ml. Fermentationen afbrydes derpå, og kulturopløsningen føres til oparbejdning.

Eksempel 4

10 liter af en filtreret dyrkningsvæske fremstillet ifølge eksempel 1-3 med en aktivitet på 100 AIE/ml tørres i et sprøjtetørringsapparat, og der fås 400 g lysebrunt pulver. Til affedtning røres dette grundigt igennem med en blanding af 1 liter methanol og 1 liter chloroform og fraskilles derefter på sugefilter. Det endnu opløsningsmiddelfugtige, uopløste produkt, hvori det aktive stof er indeholdt, opløses i 3 liter vand og indstilles til en pH-værdi på 6,5, og der tilsættes 4,5 liter methanol. Der dannes herved et lyst, fnugagtigt bundfald, der fjernes ved centrifugering og bortkastes, da det kun indeholder ubetydelige mængder af α-amylase-inhibitoren. Den mørke ovenstående væske fra

methanolfældningen, der indeholder den ønskede inhibitor, befries derpå for methanol i vakuum, og den nu til 2,5 liter opkoncentrerede opløsning dialyseres saltfri mod destilleret vand. Retenatet indeholder 9 g tørstof (specifik virkning 96 AIE/mg). Retenatet bringes derefter ved en pH-værdi på 5,5 til en mætning på 50% med ammoniumsulfat, hvortil det ved 250 ml er nødvendigt at anvende 79 g salt. Ved udsaltningen dannes et bundfald, der indeholder ca. 90% af det aktive stof. Efter centrifugering bortkastes den overstående væske. Bundfaldet opløses på ny i destilleret vand, og ved en pH-værdi på 8 tilsættes der atter ammoniumsulfat, men denne gang først kun til en mætning på 15% og efter fjernelse af bundfaldet yderligere til en mætning på 35%. Bundfaldet fra udsaltningen mellem 15 og 35% indeholder hovedmængden af amylaseinhibitoren. Denne fraktionerede fældning gentages.

Efter dialyse og tørring fås der 360 mg produkt med en specifik aktivitet på 992 AIE/mg. 350 mg af dette rå produkt fordeles derpå i "Sephadex (R) G-50 fine" i en glassøjle, der er 100 cm lang og rummer 1,2 liter, og beriges. Som kvældnings- og elueringsmiddel anvendes en vandig 5 millimolær phosphatpufferopløsning med en pH-værdi på 8, hvortil der er sat 0,02% natriumazid. Det rå produkt opløses i 15 ml af samme puffer og påføres søjlen. Elueringen sker i løbet af to dage, hvorved der udtages fraktioner på 15 ml. De fire mest aktive fraktioner opsamles, dialyseres saltfri og frysetørres. De giver 60 mg hvidt pulver med en aktivitet på 2520 AIE α-amylase-inhibitor/mg.

Eksempel 5

2200 liter dyrkningsvæske fremstillet ifølge eksempel 3 afkøles til 6°C og filtreres via en kammerfilterpresse efter tilsætning af 2% silicagel. Filterkagen (ca. 450 kg, fugtig) bortkastes, det klare filtrat (1750 liter med en aktivitet på 95 AIE/ml) inddampes via en faldstrømsfordamper til 120 liter efter tilsætning af 500 g natriumazid. Det fremkomne koncentrat afkøles til 1°C, og der tilsættes langsomt og under omrøring 120 liter forud afkølet acetone. Til fuldstændig fældning omrøres der yderligere i 1/4 time og efter tilsætning af 1 kg silicagel klares via en filterpresse. Det faste stof med filterhjælpemidlet bortkastes. Det acetoniske filtrat, der indeholder det aktive stof, blandes under omrøring og afkøling med 380 liter acetone, hvorved der fås en ca. 80%'s acetonisk suspension. Det fremkomne (2.) bundfald indeholder

den ønskede amylaseinhibitor.

Den udvindes ved, at man lader fældningsvæsken henstå uden omrøring. Herved synker bundfaldet ned, og den ovenstående væske kan skummes af. Fra den ovenstående væske fra denne anden acetonefældning kan der ved centrifugering skilles ringe mængder bundfald. Dette faste stof opløses ved en pH-værdi på 7 og sættes til bundfaldsopløsningen (se nedenfor). Det i fældningsbeholderen tilbageblevne hovedbundfald opløses i 120 liter vand ved en pH-værdi på 7, og den fremkomne opløsning klares med en gennemløbscentrifuge (Cepa, 1700 opm). Derved fjernes 90 g inaktive svævepartikler. Den klare vandfase koncentreres nu op til 15 liter med et DDS-ultrafiltreringsanlæg (membran nr. 800) og dialyseres. Til komplettering af afsaltningen fortyndes retenatet med destilleret vand og koncentreres på ny. Efter gentagning to til tre gange er retenatet, hvori amylase-inhibitoren er indeholdt, praktisk talt saltfrit. Ved tilsætning af 19,5 kg amminiumsulfat fældes derpå hæmningsstoffet ved en pH-værdi på 5,5 fra 50 liter retenatopløsning og fracentrifugeres, og den ovenstående væske bortkastes. Bundfaldet opløses på ny i 40 liter vand og udfældes denne gang ved en pH-værdi på 7,5 med 12,5 kg ammoniumsulfat. Efter fraskillelse af den klare fase i en rørcentrifuge fældes bundfaldet fraktioneret som i eksempel 4: Fra 40 liter af det atter opløste stof fældes ved en pH-værdi på 5,5 under tilsætning af 3,2 kg ammoniumsulfat først et inaktivt bundfald, der fraskilles og bortkastes. Dernæst skilles hoveddelen af det aktive stof fra væsken ved yderligere opkoncentrering af den flydende fase med 7,4 kg ammoniumsulfat. Dette bundfald opsamles, dialyseres mod destilleret vand og frysetørres. Der fås 114 g brunt pulver med en aktivitet på 1100 AIE/mg.

Til yderligere opdeling fyldes en glassøjle med en diameter på 5 cm og en højde på 50 cm (rummer ca. 1 liter) med DEAE-"Sephadex"® A-25, der i forvejen er bragt i ligevægt med $\frac{1}{30}$ molær phosphorpuffer til en pH-værdi på 7,5 og 0,02%'s natriumazid. Nu opløses 10 g stof i 100 ml af den samme puffer og påføres søjlen. Dernæst vaskes søjlen med 1 liter af den samme puffer, hvorpå der til dette elueringsmiddel efterhånden sættes kogsalt i en sådan mængde, at der tilvejebringes en kontinuerlig gradient. Opfanges søjleeluatet fraktioneret, befinder amylase-inhibitoren sig i de fraktioner, hvori NaCl-koncentrationen er ca. 0,5 molær.

Disse fraktioner opsamles og dialyseres mod destilleret vand. Ved frysetørring fås 5,6 g lysebrunt stof med en aktivitet på 2200 AIE/mg.

I tilslutning hertil gennemføres desuden en gelchromatografisk rensning, som beskrevet i eksempel 4. Af materialet på 5,6 g fås 4,1 g farveløst pulver, hvis aktivitet udgør 2800 AIE/mg. Ved aminosyreanalyse af produktet fås efter en 20-timers saltsyrehydrolyse ved hjælp af en Beckman-multichromanalysator følgende sammensætning:

Asparaginsyre	7,72 %
Threonin	7,66 %
Serin	5,35 %
Glutaminsyre	10,05 %
Prolin	3,43 %
Glycin	4,93 %
Alanin	5,84 %
1/2 cystein	4,26 %
Valin	7,72 %
Methionin	0,41 %
Isoleucin	2,30 %
Leucin	5,18 %
Tyrosin	10,24 %
Phenylalanin	3,35 %
Histidin	3,01 %
Lysin	1,45 %
Arginin	5,16 %

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en peptidisk glycosidhydrolase-inhibitor, der har en molekylvægt på 5000-10.000, et absorptionsmaksimum i UV-lys ved 276 nm, et isoelektrisk punkt på 4,4 og følgende aminosyresammensætning:

Asparaginsyre	5-6	Isoleucin	1-2
Threonin	5-6	Leucin	3-4
Serin	3-5	Tyrosin	4-5
Glutaminsyre	5-6	Phenylalanin	0-2
Prolin	2-3	Histidin	1-2
Glycin	5-6	Lysin	0-1
Alanin	5-6	Arginin	2-3
Cystein	3-4	Tryptophan	1-2
Valin	5-6		

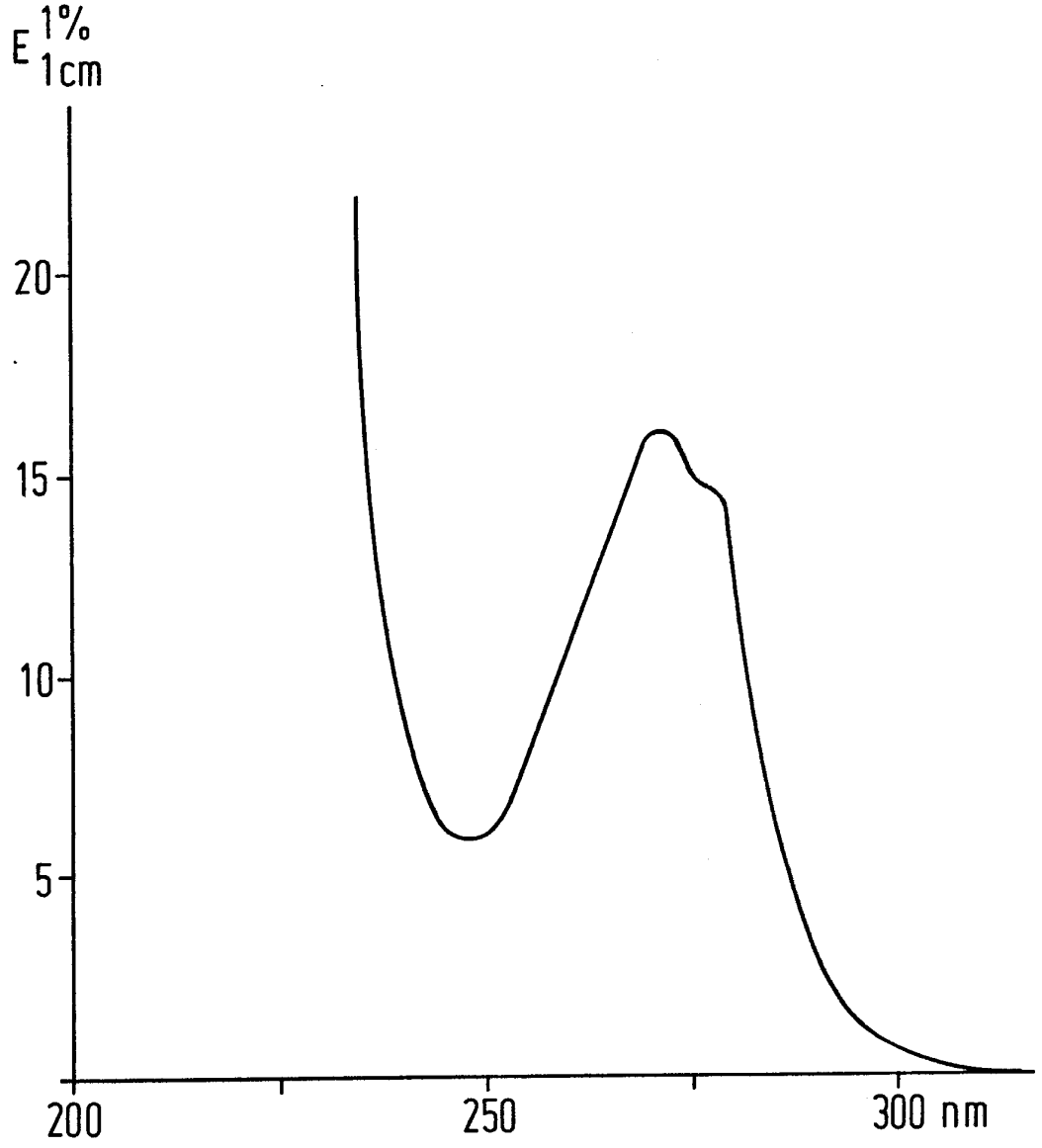
k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker Streptomyces tendae 4158 (ATCC nr. 31210) i et dyrkningsmedium, der indeholder mindst én carbonkilde, mindst én nitrogenkilde og uorganiske salte, og fra kulturen udvinder inhibitoren.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet indeholder 3-5% opløselig stivelse, 0,2-0,6% majsstøbevand, 0,5-1,5% glucose, 0,5-1% $(NH_4)_2HPO_4$, 0,3-0,6% sojamel og 0,5-1,5% caseinpepton.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet indeholder 2-6% jordnøddemel, 1-3% kartoffelstivelse, 3-5% havremel, 3-5% vallepulver, 1-2% vallesirup og 1-2% mælkesukker.

Fremdragne publikationer:

———


E 1% 1cm
20
15
10
5
200
250
300 nm