



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 29.09.73 (P. 165549)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 01.07.75

Opis patentowy opublikowano: 30.04.1977

MKP C12d 9/20

Int. Cl.² C12D 9/20

Twórcy wynalazku: Edward Borowski, Kazimierz Dzięgielewski, Sławomir Ulikowski, Andrzej Schaeffer, Janina Karasińska, Krzysztof Brodowski

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania i rozdzielania mieszaniny edein

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mieszaniny edein oraz jej rozdziału na poszczególne składniki.

Znana metoda otrzymywania mieszaniny edein polega na sorpcji tej mieszaniny z przesączu brzożki fermentacyjnej na kationicie karboksylowym i desorpcji antybiotyku ze złoża jonitowego rozcieńczonym roztworem kwasu mineralnego lub organicznego, a następnie odbarwieniu uzyskanego elutu edeiny i demineralizacji (op. pat. nr 77182). Nieaktywne peptydy towarzyszące mieszaninie edein usuwa się podczas sorpcji na kationicie karboksylowym w formie cynkowej (op. pat. nr 77188).

W wyodrębnionej wcześniej metodami analitycznymi mieszaninie edein stwierdzono obecność edein, A, B, C i D (Borowski E., Chmara H., Jereczek-Morawska E., Biochim. Biophys. Acta, **130**, 560 (1966)). Edeina A składa się z pięciu aminokwasów i alifatycznej dwuaminy sperymidyny, występujących w następującej sekwencji: N-/β-tyrozyl/-izoseryl-/α-α/-2,3-dwuaminopropionyl-/α-α/-2,6-dwuamino-7-hydroksyazelail-/ω-α/-glicyl-NH(CH₂)₃-NH(CH₂)₄NH₂. Edeina B różni się od edeiny A tym, że zamiast aminy sperymidyny zawiera N-/guanylo/-N'-/3-aminopropylo/-1,4-dwuamino-

2

A₁ i B₁ są aktywne, natomiast A₂ i B₂ nie posiadają aktywności biologicznej.

Edeina D jest ścisłym analogiem edeiny A i różni się od niej rodzajem aminokwasu aromatycznego (zamiast β-tyrozyny, β-fenilo-β-alanina), (Wojciechowska H., Ciarkowski J., Chmara H., Borowski E., Experientia, **28**, 1423 (1972)). Budowy edeiny C nie zbadano, gdyż substancja występuje w mieszaninie w tak małych ilościach, że przy zastosowaniu analitycznych metod separacji nie zdołano wyodrębnić jej w ilościach, wystarczających do pełnej analizy. Opisane w literaturze metody rozdziału mieszaniny edein polegają na ekstrakcji przeciwprądowej (Hettinger T.P., Kurylo-Borowska Z., Craig L.C., Biochemistry, **7**, 4153 (1968)) oraz chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej lub kationowymiennej (Borowski E., Chmara H., Jereczek-Morawska E. Chemotherapia **12**, 12(1967). Rozdziału edein A, B, C i D dokonano wyłącznie drogą chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej, pozostałe metody dotyczą wyłącznie rozdziału edein A i B.

Znana metoda izolacji mieszaniny edein wymaga zastosowania szeregu zabiegów, które wydłużają czas izolacji i obniżają wydajność uzyskiwanego produktu. Znane metody rozdziału mieszaniny edein są skomplikowanymi i mało wydajnymi metodami analitycznymi, prowadzącymi do otrzymania edein o ograniczonej czystości.

Przedmiotem wynalazku jest efektywna metoda

otrzymywania czystej mieszaniny edein, pozbawionej zanieczyszczeń mineralnych i organicznych, oraz ilościowego rozdziału tej mieszaniny na poszczególne składniki w dowolnej skali.

Sposobem według wynalazku przeprowadza się sorpcję mieszaniny edein z przesączu brzoćki fermentacyjnej lub dowolnego innego roztworu na kationicie karboksylowym w formie soli, desorbując się antybiotyk ze złoża jonitowego roztworem zasady w wodzie lub mieszaninie wody i rozpuszczalnika organicznego w temperaturze -10 do $+30^{\circ}\text{C}$, korzystnie w temperaturze 0 do $+10^{\circ}\text{C}$. Do desorpcji antybiotyku stosuje się rozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych zasady, charakteryzujące się stałą dysocjacji K_b o wartości 1×10^{-7} do 1×10^{-2} , korzystnie o wartości 1×10^{-6} do 1×10^{-3} . Szczególnie korzystne jest zastosowanie do tego celu roztworów wodorotlenku amonowego i pierwszorzędowych amin alifatycznych, zawierających w cząsteczce 1—4 atomów węgla, jak metyloamina, butyloamina. Do elucji antybiotyku zastosować można również aminy heterocykliczne, dwuaminy oraz aminy alifatyczne II i III-rzędowe.

Uzyskany eluat edein zobojętnia się roztworem kwasu mineralnego lub organicznego do pH o wartości $4,0$ do $7,0$, korzystnie do wartości $5,5$ do $6,5$, a następnie przeprowadza się kolumnową chromatografię jonowymienną otrzymanej mieszaniny edein wprost z roztworu lub po wyodrębnieniu w znany sposób.

Do chromatografii stosuje się materiały anionowymienne w formie wodorotlenowej, np. takie, jak celulozy anionowymienne, usieciowane dekstrany anionowymienne sephadex'y oraz konwencjonalne anionity o różnym stopniu zasadowości. Rozwijanie kolumny prowadzi się przy pomocy wody.

Wyciek z kolumny zbiera się frakcjami przy pomocy automatycznego kolektora frakcji, zobojętnia się rozcieńczonym roztworem kwasu, korzystnie roztworem kwasu organicznego, a następnie identyfikuje się poszczególne składniki i kolekcjonuje frakcje jednorodne (np. przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej). Proces chromatografii jonowymiennej przeprowadza się w temperaturze 0 — $+30^{\circ}\text{C}$, korzystnie w temperaturze $+5$ — $+15^{\circ}\text{C}$. Frakcje, zawierające dane składniki zagęszcza się do sucha w próżni lub liofilizuje. Otrzymane preparaty oczyszcza się metodą filtracji molekularnej na nośniku sephadex LH-20 w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w metanolu. Proces prowadzi się w kolumnie w temperaturze pokojowej. Z frakcji zawierających daną edeinę usuwa się częściowo rozpuszczalnik, a następnie wytrąca się sól edein z kwasem mineralnym przy pomocy odpowiedniej soli aminy takiej, jak trójetyloamina. Można również usunąć rozpuszczalnik całkowicie, uzyskując sól edein z kwasem organicznym.

W wyniku zastosowania procedury rozdziału mieszaniny edein według wynalazku uzyskuje się rozdział tej mieszaniny na co najmniej pięć składników, spośród których zidentyfikowano edein A, B, C, D i nową substancję nazwaną edeiną E. Skład mieszaniny edein i ilościowe proporcje między poszczególnymi składnikami zależą od sposobu prowadzenia fermentacji edein.

Przykładowy rozdział edein sposobem według wynalazku przedstawiono na chromatografii (fig.). Chromatogram wykonano metodą chromatografii występującej na cienkiej warstwie DC-Alufolien Kieselgel 60F254 firmy Merck w układzie rozpuszczalników n-propanol : woda amoniakalna : woda = $6 : 4 : 3$. Czas wykonania chromatogramu 3 godziny w temperaturze 20°C .

Niżej przytoczone przykłady ilustrują sposób według wynalazku:

Przykład I. 150 l roztworu edein o aktywności 244 j/ml i $\text{pH} = 6,8$ przepuszcza się przez szeregowo połączony układ kolumn (2 sztuki) z płaszczem wodnym, zawierających po 900 ml kationitu karboksylowego Wofatit CP w formie sodowej. W momencie zakończenia sorpcji aktywność antybiotyku w wyciekach wynosi odpowiednio: 98 j/ml po pierwszej kolumnie i 0 j/ml po drugiej kolumnie. Kolumnę pierwszą przemywa się wodą demineralizowaną, a następnie włącza chłodzenie wodą (temperatura $+12^{\circ}\text{C}$) i eluuje się $0,5$ N wodą amoniakalną, oziębioną do temperatury $+10^{\circ}\text{C}$.

Zebrany eluat (2725 ml, aktywność 9850 j/ml) umieszcza się w wyparce obrotowej i usuwa pod zmniejszonym ciśnieniem nadmiar eluenta w temperaturze 20°C , a następnie zobojętnia się 25% -wym H_2SO_4 do $\text{pH} = 6,2$ i odbarwia węglem aktywowanym. Otrzymany roztwór siarczanu edein liofilizuje się do otrzymania 133 g preparatu o aktywności 198 j/mg, nie zawierającego zanieczyszczeń mineralnych. Chromatografia cienkowarstwowa (układ rozpuszczalników n-propanol : woda amoniakalna : woda = $6 : 4 : 3$, cienka warstwa DC-Alufolie Kieselgel 60F254) oraz bibułowa (bibuła Whatman 3, układ rozpuszczalników n-propanol : woda amoniakalna : woda = $60 : 35 : 5$) w połączeniu z wywołaniem biologicznym (*B. subtilis* ATCC6633) wskazują na obecność w preparacie siarczanu edein dużych ilości edein A, B i D oraz śladów edein C, E.

Przykład II. 4 g siarczanu edein, uzyskanego w przykładzie I rozpuszcza się w 12 ml wody destylowanej i wprowadza się na kolumnę chromatograficzną, zawierającą 250 g dwuetyloaminoetylocelulozy DE-32 (firma Whatman), zregenerowanej na formę wodorotlenową. Rozwijanie kolumny prowadzi się wodą destylowaną o $\text{pH} = 6,85$ w temperaturze $+8^{\circ}\text{C}$. Wyciek z kolumny zbiera się przy pomocy automatycznego kolektora frakcji z przystawką czasową (firma Premed, typ 301B) we frakcjach 15-minutowych. Frakcje zobojętnia się $0,1$ N roztworem kwasu siarkowego do $\text{pH} = 6,0$, a następnie bada się chromatograficznie w układach rozpuszczalników, przytoczonych w przykładzie I. Edein znajdują się w następujących frakcjach: nr 37—48 edein A, nr 61—72 edein C, nr 85—107 edein D, nr 120—138 edein B, nr 166—280 edein A. Wymienione frakcje łączy się grupami, zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem 20-krotnie i liofilizuje. Otrzymuje się $7,5$ mg edein E, 40 mg edein C, 150 mg edein D, 320 mg edein B i $1,6$ g edein A.

Przykład III. 100 mg p-toluenosulfonianu edein A, zawierającego niewielkie ilości zanieczyszczeń organicznych, rozpuszcza się w 2 ml metanolu i wprowadza się na kolumnę chromatografi-

czną, zawierającą 25 g sephadex'u LH—20, spęcznia-
łego w metanolu. Kolumnę rozwija się metanolem,
zbierając wyciek frakcjami. Frakcje, zawierające
edeinę A, identyfikuje się chromatograficznie, łą-
czy, podgęszcza 10-krotnie i wytrąca siarczan ede-
iny przez dodanie nadmiaru siarczanu trójetylo-
aminy w 50% roztworze wodnym. Osad sący się,
przemywa kolejno metanolem i acetonem, i suszy.
Otrzymuje się 38 mg siarczanu edeiny A o akty-
wności 240 j/mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania i rozdzielania miesza-
niny edein drogą sorpcji z roztworu na kationicie
karboksylowym w formie soli, **znamienny tym**, że
mieszaninę edein A, B, C, D i E desorbuje się z ka-
tionitu karboksylowego roztworem zasady, charak-
teryzującej się stałą dysocjacji K_b w zakresie
 1×10^{-7} do 1×10^{-2} , korzystnie 1×10^{-6} do
 1×10^{-3} , w temperaturze -10 — $+30^\circ\text{C}$, korzystnie
w temperaturze 0 — $+10^\circ\text{C}$, odpędza się z eluatu
nadmiar eluenta, zobojętnia się eluat do wartości
pH równej 4,0—7,0, korzystnie do wartości pH rów-
nej 5,5—6,5, roztworem kwasu mineralnego lub or-
ganicznego, przeprowadza się chromatografię otrzy-

manej mieszaniny edein przy zastosowaniu nośnika
anionowymiennego w formie wodorotlenowej i wo-
dy jako eluenta w temperaturze 0 — $+30^\circ$, korzyst-
nie w temperaturze $+5$ — $+15^\circ\text{C}$, wydziela się frakcje,
zawierające poszczególne składniki mieszaniny edein
i w końcu przeprowadza się kolumnową filtrację
molekularną soli dowolnej z uzyskanych edein w
rozpuszczalniku organicznym i wyodrębnia się
czyste edeiny w postaci soli.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że
do elucji mieszaniny edein z kationitu karboksylo-
wego stosuje się roztwory wodorotlenku amono-
wego, amin alifatycznych lub heterocyklicznych.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że
do chromatografii jonowymiennej stosuje się celu-
lozy anionowymienne, usieciowane dekstrany anio-
nowymienne oraz syntetyczne anionity o różnym
stopniu zasadowości.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że
do neutralizacji frakcji, uzyskanych w procesie chro-
matografii jonowymiennej, stosuje się roztwór kwa-
su organicznego.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że
do rozwijania kolumny w procesie filtracji moleku-
larnej stosuje się usieciowane dekstrany przysto-
sowane do pracy w rozpuszczalnikach organicznych.

Rozdział edein

