



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 12.06.74 (P. 171889)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 17.01.76

Opis patentowy opublikowano: 31.03.1978

MKP C07c 103/52

Int. Cl.² C07C 103/52

CZYTELNIA

Wzrost Patenta

Twórcy wynalazku: Hanna Wojciechowska, Andrzej Czerwiński, Antoni Konitz, Kazimierz Dzięgielewski, Jolanta Grzybowska, Ryszard Andruszkiewicz, Mirosław Dąbrowski, Edward Borowski

Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska, Gdańsk (Polska)

Sposób otrzymywania produktów degradacji edein

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania produktów degradacji cząsteczek edein A, B, D i F lub ich mieszaniny przez rozszczepienie wiązania amidowego między kwasem 2,3-dwuaminopropionowym i kwasem 2,6-dwuamino-7-hydroksyazelainowym.

Edeiny A, B, D i F są amidami pięciopeptydów wytwarzanymi przez szczep *Bacillus brevis* Vm₄. Ich kompleks wytwarzany na drodze biosyntezy stanowi mieszaninę edein A, B, D i F częściowo różniących się składem aminokwasowym. Mianowicie aminokwasem N-końcowym jest w nich β -tyrozyna lub izofenylalanina, a następnymi aminokwasami w łańcuchu peptydowym: izoseryna, kwas dwuaminopropionowy, dwuaminohydroksyazelainowy oraz glicyna związana amidowo z resztą spermidyny lub guanylospermidyny.

Dotychczas znany jest jedynie sposób otrzymywania produktów degradacji edeiny A przy zastosowaniu karboksypeptydazy B i następnie izolacji produktów przy pomocy elektroforezy, natomiast nie jest znany sposób otrzymywania produktów degradacji pozostałych edein lub ich mieszaniny. Wyniki badań światowych, prowadzonych nad wrażliwością różnych substratów na działanie karboksypeptydazy B wskazują, że rozszczepia ona wiązanie peptydowe utworzone z aminokwasów o konfiguracji S (α).

Niedogodnością opisanego sposobu otrzymywa-

2

nia produktów degradacji jest konieczność stosowania drogich substancji wyjściowych w postaci karboksypeptydazy B i jednorodnej edeiny A, co czyni proces nieekonomicznym, a ponadto sposób wyodrębnienia produktów przy pomocy elektroforezy uniemożliwia stosowanie go na skalę przemysłową.

Sposób otrzymywania produktów degradacji według wynalazku polega na tym, że jednorodną edeiny A, B, D i F lub ich mieszaninę oraz preparat wstępnie oczyszczonej lipazy, względnie pankreatyny zawiesza się w buforze o pH 7,5 do 8,5 lub w roztworze kwaśnego węglanu amonowego, a otrzymane peptydy rozdziela się znanymi sposobami. Uzyskane peptydy rozdziela się przez chromatografię jonowymienną i/lub filtrację molekularną, przez chromatografię podziałową na żelu krzemowym i/lub filtrację molekularną oraz przez chromatografię adsorbcyjną na tlenku glinu i/lub filtrację molekularną. W ten sposób z edeiny A otrzymuje się kwas N³-(β -tyryzylizoseryno-2,3-dwuaminopropionowy (β -Tyr-Iser-Dpr) oraz N-(2,6-dwuamino-7-hydroksy-9-azelainylo-glicylo-3-aminopropyl)-1,4-dwuaminobutan (Daha-Gly-Sper); z edeiny B-(β -Tyr-Iser-Dpr) oraz N-(2,6-dwuamino-7-hydroksy-9-azelainylo-glicylo-3-aminopropyl)-N-guanylo-1,4-dwuaminobutan (Daha-Gly-Gsper); z edeiny D kwas N³-(β -fenylo- β -alanizoseryno-2,3-dwuaminopropionowy (Iphe-Iser-Dpr) oraz (Da-

ha-Gly-Gsper); z edeiny F (Iphe-Iser-Dpr) oraz (Daha-Gly-Sper); zaś z kompleksu: (β -Tyr-Iser, Dpr), (Iphe-Iser-Dpr) oraz (Daha-Gly-Sper) i (Daha-Gly-Gsper).

Stwierdzono również, że karboksypeptydaza B rozszczepia pozostałe elementy B, D i F. Jak wykazały przeprowadzone badania w tworzeniu wiązania peptydowego, ulegającego rozszczepieniu enzymem, uczestniczy grupa aminowa związana z węglem 2 o konfiguracji R (D) kwasu 2,6-dwuamino-7-hydroksyazelainowego, który jest C-końcowym aminokwasem edein. Z tego wynika, że edeina A nie jest substratem dla karboksypeptydazy B. Trawienie enzymem edein A, B, D i F zachodzi więc w sposób niespecyficzny i niekoniecznie musi w nim uczestniczyć karboksypeptydaza B, a np. nie zdefiniowane enzymy ją zanieczyszczające, co jest efektem nieoczekiwanym.

Prowadzone badania udowodniły, że degradację edein można prowadzić enzymami wstępnie oczyszczonej lipazy bądź pankreatyny, przy czym w procesie tym biorą również udział nie zdefiniowane dotąd enzymy zanieczyszczające.

Zalety sposobu według wynalazku polegają na możliwości uzyskania peptydów, które są substratami w otrzymywaniu analogów naturalnych edein o równie szerokim spektrum działania przedwrotnoustrojowego i zmniejszonej toksyczności, bowiem edeiny naturalne charakteryzujące się wysoką aktywnością przeciwdrotnoustrojową, ze względu na dużą toksyczność nie mogą być stosowane jako leki.

Ponadto proponowane rozwiązanie umożliwia otrzymanie w prosty i tani sposób w skali przemysłowej produktów degradacji edein A, B, D i F w postaci tróipeptydów i amidów dwupeptydów, zbudowanych z aminokwasów niebiałkowych i poliamin, eliminuje stosowanie drogich substratów i pozwala na otrzymanie prostą technologią oczyszczonych produktów z dobrymi wydajnościami.

Sposób otrzymywania produktów degradacji edein według wynalazku ilustrują podane niżej przykłady.

Przykład I. 13 g kompleksu edein w postaci siarczanu i 5,353 g preparatu lipazy zawiesza się w 464 ml 0,1 N kwaśnego węglańa amonowego i inkubuje w 25°C przez 14 dni.

Następnie mieszaninę reakcyjną odsącza się od zawiesiny białka i uzyskany klarowny roztwór odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 35°C do objętości 40 ml, po czym poddaje się procesowi wstępnego rozdziału przy pomocy filtracji molekularnej na kolumnie Sephadex-6-10.

Otrzymuje się I frakcję, zawierającą N-(2,6-dwuamino-7-hydroksy-9-azelainylo-glicylo-3-amino-propylo)-1,4-dwuaminobutan oraz N-(2,6-dwuamino-7-hydroksy-9-azelainylo-glicylo-3-aminopropylo)-N'-guanylo-1,4-dwuaminobutan i II frakcję zawierającą kwas N³-(β -tyrozylo-izoseriolo)-2,3-dwuaminopropionowy oraz kwas N³-(β -fenylo- β -alaniloizoseriolo)-2,3-dwuaminopropionowy.

Frakcję I zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem

do objętości 50 ml i przy silnym mieszaniu wkrapla do 1 l metanolu.

Wytrącony z roztworu osad odwirowuje się, przemycwa acetonem i dwukrotnie suchym eterem, a następnie suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. W ten sposób otrzymuje się 6,17 g surowej mieszaniny peptydów Daha-Gly-Sper i Daha-Gly-Gsper. 200 mg tak otrzymanego proszku oczyszcza się od substancji barwnych i zasadowych przy pomocy filtracji molekularnej na Sephadex LH-20 w układzie woda-metanol 1:1.

Roztwór peptydów wyeluowanych z kolumny zateża się do 4 ml i wkrapla do 100 ml schłodzonego metanolu. Otrzymaną zawiesinę wiruje się, a osad przemycwa acetonem i dwukrotnie suchym eterem. W ten sposób otrzymuje się 120 mg mieszaniny peptydów Daha-Gly-Sper i Daha-Gly-Gsper. Frakcję II, uzyskaną z rozdziału na Sephadex G-10 zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 35°C do objętości 100 ml, a następnie rozdziela na kationicie karboksylowym w formie NH⁺₄ i eluuje najpierw wodą, a potem 0,2 N roztworem aniliny do zaniku substancji ninhydrynoodatnich.

Otrzymany roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C do sucha i pozostałość rozpuszcza się w 25 ml wody, zaś roztwór wodny wkrapla do 25 ml metanolu, a otrzymaną zawiesinę wkrapla z kolei do 700 ml acetonu. Uzyskany osad odwirowuje się i przemycwa kolejno acetonem, eterem i suszy nad pięciotlenkiem fosforu, otrzymując 2,5 g mieszaniny peptydów β -Tyr-Iser-Dpr oraz Iphe-Iser-Dpr.

Przykład II. 0,5 g suszonego proszku pankreatyny, uzyskanego przez odtłuszczenie i odwodnienie trzuski przy pomocy acetonu i eteru, zawiesza się w 20 ml 0,2 N kwaśnego węglańa amonowego i miesza przez pół godziny, a następnie uzyskaną zawiesinę dodaje się do roztworu 1 g kompleksu edein, rozpuszczonego w 18 ml 0,1 N kwaśnego węglańa amonowego i utrzymuje w temperaturze 25°C przez 14 dni przy ciągłym mieszaniu.

Izolację otrzymanych produktów przeprowadza się analogicznie, jak w przykładzie I. Otrzymuje się 0,178 g mieszaniny β -Tyr-Iser-Dpr i Iphe-Iser-Dpr oraz 0,216 g mieszaniny Daha-Gly-Sper i Daha-Gly-Gsper.

Przykład III. 100 mg edeiny D w postaci siarczanu i 40 mg preparatu lipazy zawiesza się w 3,6 ml 0,1 N kwaśnego węglańa amonowego i inkubuje w 25°C przez 14 dni.

Następnie mieszaninę reakcyjną przesącza się, przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 35°C do 1 ml, po czym rozdziela się przy pomocy filtracji molekularnej na kolumnie wypełnionej Sephadex LH-20, otrzymując 30 mg peptydu Daha-Gly-Sper oraz 20 mg peptydu Iphe-Iser-Dpr.

Przykład IV. 200 mg edeiny A w postaci siarczanu i 80 mg preparatu lipazy zawiesza się w 72 ml 0,2 N roztworze octanu N-metylomorfoliny o pH = 8,5 i inkubuje w 25°C przez 14 dni, a następnie izoluje otrzymane produkty, jak w

przykładzie III, otrzymując 54 mg peptydu Daha-Gly-Sper oraz 39 mg peptydu β -Tyr-Iser-Dpr.

Przykład V. 0,5 g edeiny D w postaci siarczanu i 0,2 g preparatu lipazy zawiesza się w 18 ml 0,1 N kwaśnego węgla amonowego i inkubuje w 25°C przez 14 dni, a następnie izoluje otrzymane produkty, jak w przykładzie II, otrzymując 180 mg peptydu Daha-Gly-Gsper i 91 mg peptydu β -Tyr-Iser-Dpr.

Przykład VI. 50 g edeiny F w postaci siarczanu i 20 mg preparatu lipazy zawiesza się w 1,8 ml 0,025 N buforu TRIS o pH = 7,65 zawierającego dodatkowo 0,1 N NaCl i inkubuje w 25°C przez 14 dni, a następnie izoluje otrzymane produkty, jak w przykładzie III, otrzymując 12 mg Daha-Gly-Sper i 9 mg Iphe-Iser-Dpr.

Przykład VII. 2 g mieszaniny zawierającej Daha-Gly-Sper i Daha-Gly-Gsper oraz zanieczyszczenia peptydowe o charakterze zasadowym poddaje się rozdzielowi na celulozie anionowymiennej w formie OH⁻. Jako roztwór eluujący stosuje się wodę.

Uzyskane w wyniku rozdzielu wodne zasady poszczególnych peptydów zobojętnia się przy pomocy rozcieńczonego kwasu siarkowego otrzymując odpowiednie siarczany. Tak otrzymane roztwory zataża się do niewielkiej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem i wkrapla się do schłodzonego metanolu.

Dalszy ciąg postępowania z wytrąconym osadem jest analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I. Otrzymuje się odpowiednie siarczany w następujących ilościach:

1. siarczan Daha-Gly-Sper	1,05 g
2. siarczan Daha-Gly-Gsper	0,16 g
3. siarczany zasadowych peptydów	0,43 g

Przykład VIII. 1 g mieszaniny zawierającej siarczany Tyr-Iser-Dpr i Iphe-Iser-Dpr zanieczyszczone aminokwasami i peptydami oraz szereg aminokwasów i peptydów o charakterze obojętnym i zasadowym poddaje się rozdzielowi na kationicie karboksylowym w formie amonowej.

Jako eluent stosuje się kolejno: wodę i wodny roztwór amoniaku o stężeniach 0,020%, 0,027%,

0,81%, 0,189%. Wolną zasadę peptydu Iphe-Iser-Dpr wykonuje się roztworem amoniaku o stężeniu 0,17%, zaś wolną zasadę peptydu β -Tyr-Iser-Dpr otrzymuje się stosując 0,081% roztwór amoniaku. Tak uzyskane roztwory zagęszczają się przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 3 ml Iphe-Iser-Dpr i 5 ml β -Tyr-Iser-Dpr.

Zatężone roztwory wodne wkrapla się odpowiednio do 4 ml i 6 ml metanolu, a otrzymane zawiesiny z kolei wkrapla się do 100 ml i 120 ml acetonu. Dalszy ciąg postępowania z wytrąconymi osadami jest analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I. Uzyskuje się 408 mg wolnego peptydu β -Tyr-Iser-Dpr oraz 80 mg wolnego peptydu Iphe-Iser-Dpr.

Przebieg reakcji enzymatycznych oraz procesy rozdzielu na kolumnach były kontrolowane przy pomocy elektroforezy wysokonapięciowej w buforze pirydynowo-octanowym o pH 6,4.

Identyfikację uzyskanych produktów przeprowadzano poprzez określenie ich składu aminokwasowego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania produktów degradacji edein, znamienny tym, że jednorodne edeiny A, B, D i F lub ich mieszaninę oraz preparat wstępnie oczyszczonej lipazy, względnie pankreatyny zawieszają się w buforze o pH 7,5 do 8,5 lub w roztworze kwaśnego węgla amonowego, a uzyskane peptydy rozdziela się znanymi sposobami.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że uzyskane peptydy rozdziela się przez chromatografię jonowymienną i/lub filtrację molekularną.

3. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że uzyskane peptydy rozdziela się przez chromatografię na żelu krzemowym i/lub filtrację molekularną.

4. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że uzyskane peptydy rozdziela się przez chromatografię adsorbcyjną na tlenku glinu i/lub filtrację molekularną.