(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 111 T2** 2005.04.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 940 409 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 111.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/02483**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 930 823.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/003529**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.07.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.01.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.09.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.05.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.04.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07H 15/04**
C07F 9/09, C12P 13/02, C12P 19/44

(30) Unionspriorität:
20760696 19.07.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
TAKARA BIO INC., Otsu, Shiga, JP

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539 München

(72) Erfinder:
ITO, Makoto, Fukuoka-shi, Fukuoka 819, JP; KURITA, Toyohisa, Otsu-shi, Shiga 520-21, JP; MITSUTAKE, Susumu, Maebaru-shi, Fukuoka 819-11, JP; KITA, Katsuhiro, Nagasaki-shi, Nagasaki 852, JP

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SPHINGOLIPIDEN UND SPHINGOLIPIDDERIVATEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten, welche in den Gebieten der Medizin, Kohlenhydrattechnik, Zelltechnik und ähnlichen Gebieten nützlich sind, und auf Sphingolipide oder Sphingolipidderivate, die mittels eines solchen Herstellungsverfahrens erhalten werden.

STAND DER TECHNIK

[0002] "Sphingolipid" ist ein generischer Name für Lipide, die ein Sphingoid mit langkettigem Gerüst aufweisen, wie beispsielsweise Glykosphingolipide, Sphingophospholipide und Ceramide, und sie sind von niederen Tieren bis zu höheren Tieren weit verbreitet. Kürzlich wurde klargestellt, dass diese Sphingolipide in biologischen Aktivitäten der Zellproliferation, Induktion der Differenzierung, Apoptose und ähnlichen Prozessen, wichtige Rollen einnehmen. Es wurden außerdem Versuche unternommen, diese Sphingolipide in Kosmetika und ähnlichen Produkten zu verwenden, da sie Bestandteile der Zelloberflächenschicht sind.

[0003] Als gemeinsame Struktur weisen Sphingolipide eine Ceramidstruktur auf, in der eine langkettige Fettsäure mit nicht-einheitlicher Kettenlänge über eine Säureamidbindung an die Aminogruppe des Sphingoids gebunden ist. Bezogen auf das Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten durch Modifikation oder Substituieren der langkettigen Fettsäure von Sphingolipiden sind Verfahren bekannt, bei denen sie chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden, und zwar unter Verwendung eines Lysosphingolipids als Ausgangsmaterial, dem die Fettsäure, die in dem Sphingolipid durch die Säureamidbindung an die Aminogruppe des Sphingoids gebunden ist, fehlt.

[0004] Als chemisches Verfahren gibt es Verfahren, in welchen eine Fettsäure oder ein Fettsäurederivat mittels der folgenden Techniken mit der Lyso-Form-Aminogruppe kondensiert wird. Z.B. sind bekannt ein Verfahren, bei welchem ein aktiver Fettsäureester (z.B. ein N-Hydroxysuccinimid-Ester einer Fetttsäure) verwendet wird, ein Verfahren, bei welchem eine Fettsäure und ein Verbindungsmittel (z.B. Carbonyldiimidazol, Dicyclohexylcarbodiimid oder ähnliche) verwendet werden, ein Verfahren, bei welchem ein Fettsäureanhydrid verwendet wird, ein Verfahren, bei welchem ein Fettsäurechlorid verwendet wird, und ähnliche.

[0005] Über Verfahren, in welchen ein Lysogangliosid in der Lyso-Form eines sauren Glykolipids verwendet wird, wird in Methods in Enzymology, 138: 319–341 (1987), in dem europäischen Patent 373039 B1 (1994) und in dem europäischen Patent 765883 A1 (1997) berichtet. Es ist auch ein Verfahren, bei welchem ein Sphingosylphosphorylcholin (Lysosphingomyelin) in der Lyso-Form eines Sphingophospholipids verwendet wird, in Journal of Lipid Research, 28: 710–718 (1987), beschrieben.

[0006] Entsprechend dieser Verfahren finden in einigen Fällen Nebenreaktionen statt (z.B. O-Acylierung und ähnliche), so dass es notwendig ist, komplexe Schritte zur Verwendung von Schutzgruppen, Reinigung und ähnlichem, zu benutzen um selektiv ein N-acyliertes Produkt zu erhalten. Auch wenn es erforderlich ist, nur die Aminogruppe des Sphingoids in einem Sphingolipid selektiv zu acylieren, welches eine andere Aminogruppe als die Aminogruppe des Sphingoids aufweist, wie beispielsweise bei de-N-Acetyllysogangliosid, welches durch chemisches Deacylieren eines Ceramidciliatins erhalten wird, welches eines von Sphingophosphonolipiden oder eines Glykosphingolipids, der einen Aminozucker enthält, ist, auch dann sind komplexe Schritte erforderlich, wie beispielsweise ein Schritt zur Einführung von Schutzgruppen, partielle Acylierung, partielle Deacylierung nach der Acylierung, und ein Schritt der selektiven N-Acylierung nach Einbau von de-N-Acetyllysogangliosid in Liposomen, und daher ist es schwierig, die selektive Acylierung durchzuführen.

[0007] Andererseits ist ein enzymatisches Syntheseverfahren in der internationalen Veröffentlichung Nr. WO 94/26919 beschrieben. Bei diesem Verfahren wird eine Kondensationsreaktion durch eine Lipase in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt, so dass ein im wesentlichen wasserfreies organisches Lösungsmittel erforderlich ist und das Substrat, abhängig von seiner Löslichkeit, limitiert ist. Die internationale Veröffentlichung Nr. WO 94/26919 offenbart ein enzymatisches Syntheseverfahren für ein Ceramid und ein Hybridceramid, aber die Reaktion ist nicht spezifisch, so dass man auch die Bildung von O-acylierten Produkten findet. Außerdem ist es schwierig, die spezifische Reaktion nur mit der Aminogruppe des Sphingoids durchzuführen, wenn das Substrat eine Vielzahl von Aminogruppen aufweist, ganz ähnlich zu dem Fall der chemischen Syntheseverfahren.

[0008] Wie oben beschrieben, werden in den vorstehenden Verfahren zur Synthese von Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten durch chemisches oder enzymatisches Modifizieren oder Substituieren der langkettigen Fettsäure im Sphingolipid unerwünschte Nebenprodukte gebildet, und das Substrat ist begrenzt. Zusätzlich wird in den vorstehenden Verfahren das Lysosphingolipid, welchem eine Fettsäure, welche durch eine Säureamidbindung an die 2-Position des Sphingoids im Sphingolipid gebunden ist, fehlt, als Ausgangsmaterial verwendet. wenn daher die beabsichtigten Sphingolipide oder Sphingolipidderivate synthetisiert werden, ist es erforderlich, vor der Synthese ein Lysosphingolipid herzustellen.

[0009] Dementsprechend ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Herstellungsverfahren zum spezifischen Synthetisieren von Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten mit einer modifizierten oder substituierten langkettigen Fettsäure, die an das Sphingoid gebunden ist, nicht nur ausgehend von einem Lysosphingolipid, sondern auch von einem Sphingolipid, zur Verfügung zu stellen.

[0010] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es auch, Sphingolipide oder Sphingolipidderivate bereitzustellen, die durch das Herstellungsverfahren erhalten wurden.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0011] Wenn die vorliegenden Erfindungen zusammengefasst werden, ist die erste Erfindung der vorliegenden Erfindungen ein Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, welches das enzymatische Umsetzen eines Sphingolipids mit einer aliphatischen Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase umfasst, um ein anderes Sphingolipid oder Sphingolipidderivat mit einer anderen Fettsäurekette zu erhalten.

[0012] Die zweite Erfindung der vorliegenden Erfindungen ist ein Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivats, welches das enzymatische Umsetzen eines Lysosphingolipids mit einer aliphatischen Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase umfasst, um ein Sphingolipid oder Sphingolipidderivat zu erhalten.

[0013] Die dritte Erfindung der vorliegenden Erfindungen ist ein Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivats, welches das enzymatische Umsetzen von mindestens zwei unterschiedlichen Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase umfasst, um andere Sphingolipide oder Sphingolipidderivate mit einer ausgetauschten Fettsäurekette zu erhalten.

[0014] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, welches die Verwendung eines Mikroorganismus umfasst, welcher in der Lage ist, das Enzym herzustellen, anstelle des Enzyms der obigen ersten bis zur dritten Erfindung der vorliegenden Erfindungen, und dass es außerdem umfasst, diesen mit dem Ausgangsmaterial in Kontakt zu bringen um ein Zielmaterial zu erhalten.

[0015] Die Erfinder haben Untersuchungen über das Syntheseverfahren eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivats durchgeführt. Sie haben als Ergebnis herausgefunden, dass die Rekombination einer Fettsäure an der Aminogruppe des Sphingoids eines Lysosphingolipids oder die Substitution einer Fettsäure, die über eine Säureamidbindung an das Sphingoid in einem Sphingolipid gebunden ist, mit einer anderen Fettsäure ein Sphingolipid oder Sphingolipidderivat hervorbringt, und zwar unter Verwendung der Sphingoid-Ceramid-Deacylase, und die es in ein Lysosphingolipid und eine Fettsäure hydrolysiert.

[0016] Zuvor musste eine Rückreaktion oder Transferreaktion eines Enzyms durch Zugabe eines Donors in einer großen Überschussmenge für einen Akzeptor in einem organischen Lösungsmittelsystem durchgeführt werden um eine gleichzeitig ablaufende Hydrolysereaktion zu verhindern. Die Erfinder haben jedoch herausgefunden, dass ein Sphingolipid oder Sphingolipidderivat unter milden Bedingungen in einer wässrigen Lösung synthetisiert werden kann ohne Zugabe eines Donors in einer großen Überschussmenge für einen Akzeptor, indem eine Sphingoid-Ceramid-Deacylase verwendet wird, und haben dadurch die vorliegende Erfindung vervollständigt.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0017] **Fig.** 1 ist ein Diagramm, welches die Spezifität der Rückreaktion einer SCDase für verschiedene Fettsäuremolekültypen zeigt.

[0018] **Fig.** 2 ist ein Diagramm, welches den Optimum-pH-Wert der Rückreaktion einer SCDase zeigt.

[0019] **Fig.** 3 ist ein Diagramm, welches die Reaktionsverhältnisse einer Hydrolysereaktion, einer Rückreaktion und einer Fettsäure-Austauschreaktion durch eine SCDase zeigt.

[0020] **Fig.** 4 ist ein Diagramm, welches Ceramidase-Aktivitäten in B16-Zellen vergleicht.

BESTE ART DER AUSFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die vorliegende Erfindung wird im Detail unten beschrieben.

[0022] Der Ausdruck "Sphingolipid", wie er hier verwendet wird, meint natürliche und synthetische Substanzen, die ein Sphingoid mit langkettigem Gerüst aufweisen und Gemische daraus, und umfasst Glykosphingolipide, Sphingophospholipide und Ceramide. Der Ausdruck "Lysosphingolipid", wie er hier verwendet wird, meint die N-deacylierte Form eines Sphingolipids, bei der die Fettsäure, die über eine Säureamidbindung an die Aminogruppe des Sphingoids gebunden ist, eliminiert wurde.

[0023] Die "aliphatische Carbonsäure" umfasst, wie hier verwendet, Carbonsäuren mit aliphatischen Eigenschaften, wie beispielsweise Säuren, bei denen eine Kohlenwasserstoffkette in einer Fettsäure mit Halogen oder einer funktionellen Gruppe (z.B. einer substituierten oder unsubstituierten Aminogruppe, einer Oxogruppe, einer Hydroxylgruppe oder ähnlichen) substituiert ist, Säuren mit Sauerstoff, Schwefel oder einer Aminogruppe in der Kohlenwasserstoffkette, sowie gesättigte Fettsäuren und ungesättigte Fettsäuren.

[0024] Der Ausdruck "Sphingolipid-Ceramid-Deacylase" meint, wie er hier verwendet wird, ein Enzym, welches auf die Amidbindung des Sphingoids in einem Sphingolipid einwirkt, und spezifisch das Sphingolipid in ein Lysosphingolipid und eine Fettsäure hydrolysiert, nämlich ein Enzym, welches spezifisch die Säureamidbindung zwischen einem Sphingoid und einer Fettsäure in einem Sphingolipid hydrolysiert.

[0025] Beispiele davon umfassen Sphingolipid-Ceramid-Deacylasen, die von einem Mikroorganismus hergestellt werden, der zur Gattung Pseudomonas gehört, wie Enzyme, welche breit auf ein Sphingolipid einwirken, einschließlich eines Glykosphingolipids (Gangliosid, neutrales Glykolipid) und eines Sphingophospholipids (Sphingomyelin) [SCDase, Journal of Biological Chemistry, 270: 24370–24374 (1995), europäisches Patent 707063 A1 (1996)], Gangliosidceramidasen, die von einem Mikroorganismus hergestellt werden, der zur Gattung Nocardia gehört, wie Enzyme, die nur auf Ganglioside einwirken [Journal of Biochemistry, 103: 1–4 (1988), US-Patent 4 997 760, US-Patent 5 143 841], Enzyme, welche von einem Mikroorganismus hergestellt werden, der zur Gattung Rhodococcus gehört, und die ausschließlich auf neutrales Glykolipid unter Herstellung der Lyso-Form einwirken (JP-A-6-78782), Glykosphingolipid-Ceramid-Deacylasen, die von einem Mikroorganismus hergestellt werden, der zur Gattung Streptomyces gehört, wie ein Enzym, welches auf ein Glykosphingolipid einwirkt [Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59: 2028–2032 (1995), JP-A-7-107988], und Ceramidasen, welche auf ein Ceramid einwirken (Acylsphingosin-Deacylase, EC 3.5.1.23) [Journal of Biological Chemistry, 241: 3731–3737 (1966), Biochemistry, 8: 1692–1698 (1969), Biochimica Biophysica Acta, 176: 339–347 (1969), Science, 178: 1100–1102 (1972)]. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht darauf beschränkt.

[0026] Zusätzlich sind rekombinante Enzyme, die unter Verwendung von Genen, welche diese Enzyme codieren, erhalten wurden, und rekombinante Enzyme, welche unter Verwendung von Genen erhalten wurden, welche diese Enzyme codieren und durch Deletion, Addition, Insertion oder Substitution modifiziert worden sind, ebenfalls von den Sphingolipid-Ceramid-Deacylasen der vorliegenden Erfindung umfasst, vorausgesetzt, dass diese Enzyme sind, welche spezifisch eine Säureamidbindung zwischen einem Sphingoid und einer Fettsäure in einem Sphingolipid hydrolysieren können.

[0027] Bei der Verwendung des Enzyms kann ein gereinigtes Produkt des Enzyms oder eine Kulturnährlösung oder ein Rohextrakt, die/das das Enzym enthält, verwendet werden.

[0028] Zusätzlich, wie oben beschrieben, kann ein Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym herzustellen, anstelle des Enzyms verwendet werden.

[0029] Der "Mikroorganismus, der in der Lage ist, eine Sphingoid-Ceramid-Deacylase herzustellen", wie hier verwendet, ist nicht eingeschränkt, solange der Mikroorganismus in der Lage ist, eine Sphingolipid-Ceramid-Deacylase herzustellen. Sie umfassen Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Actinomyceten, Hypho-

myceten, Basidiomycotina und ähnliche, und Zellen, die von Pflanzen, Insekten, Tieren und ähnlichen stammen.

[0030] Die Sphingoid-Ceramid-Deacylase oder Mikroorganismen, die in der Lage sind, das Enzym herzustellen, können auf einem wohlbekannten, festen Trägerstoff immobilisiert sein oder in Liposomen oder umgekehrten Micellen eingebettet sein. Ein Enzym, das mit einer hochmolekularen Substanz modifiziert ist, kann ebenfalls verwendet werden.

[0031] Die erfindungsgemäße Reaktion findet in einer Pufferlösung statt, die das zu verwendende Sphingolipid oder Lysosphingolipid als Material, eine aliphatische Carbonsäure mit oder ohne Marker und ein gereinigtes Enzym, ein Rohextrakt oder eine Kulturnährlösung und einen Mikroorganismus enthält. Im Falle eines Mikroorganismus kann das zu verwendende Sphingolipid oder Lysosphingolipid als Material und die aliphatische Carbonsäure zu einer Kulturnährlösung des Mikroorganismus hinzugefügt werden. Die Menge dieser zu verwendenden Materialien ist nicht besonders beschränkt, und sie können bis zu ihrer Sättigungsmenge verwendet werden. Im Allgemeinen ist es bevorzugt, dass die aliphatische Carbonsäure im Überschuss vorliegt; entsprechend der vorliegenden Erfindung findet die Reaktion des Sphingolipids oder Lysosphingolipids mit der aliphatischen Carbonsäure jedoch sogar bei einem molaren Verhältnis von 1:1 statt, und das Sphingolipid oder Lysosphingolipid kann sogar im Überschuss vorliegen.

[0032] Ebenso ist die Menge eines Enzyms oder eines Mikroorganismus, welcher das Enzym produziert, nicht besonders beschränkt und kann je nach Wunsch innerhalb eines breiten Bereichs ausgewählt werden. Es kann z.B. in einer geeigneten Menge von 0,1 mE oder mehr verwendet werden, bevorzugt von 3 mE bis 10 E, pro 1 ml der Startlösung. Als Pufferlösung kann jede geeignete Pufferlösung mit einem pH-Wert von 5 bis 9 verwendet werden, aber es ist bevorzugt, die Reaktion in einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von ungefähr 6 bis 7 durchzuführen. Außerdem ist es bevorzugt, ein oberflächenaktives Mittel zu der Pufferlösung hinzuzugeben um das Enzym zu aktivieren oder das Substrat zu solubilisieren. Als oberflächenaktives Mittel kann ein oberflächenaktives Gallensäuremittel, ein nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel oder ähnliches, verwendet werden. Obwohl die Menge des oberflächenaktiven Mittels, das hinzuzugeben ist, nicht besonders beschränkt ist, kann es in solch einer Menge verwendet werden, dass seine Enzymaktivierende und Substrat-solubilisierende Wirkung erhalten wird oder das Produkt effizient erhalten wird, so dass es bevorzugt ist, das Mittel bevorzugt innerhalb des Bereichs von 0,01% bis 2% hinzuzugeben. Ebenso kann ein organisches Lösungsmittel zur Reaktionslösung hinzugegeben werden, und wenn solch ein organisches Lösungsmittel verwendet wird, kann die Reaktion unter Verwendung eines wasserlöslichen organischen Lösungsmittels oder seines zweiphasigen Systems mit einem unlöslichen organischen Lösungsmittel durchgeführt werden. Die Menge des zuzugebenden organischen Lösungsmittels ist nicht besonders beschränkt, mit der Maßgabe, dass es solch eine Menge ist, dass das Enzym nicht inaktiviert wird und das Produkt effizient erhalten werden kann.

[0033] Das so erhaltene Sphingolipid oder Sphingolipidderivat kann mittels Dünnschichtchromatographie bestätigt werden.

[0034] Das erfindungsgemäß erhaltene Sphingolipid kann isoliert werden und durch für organische Verbindungen konventionelle Chromatographie gereinigt werden.

BEISPIELE

[0035] Die vorliegende Erfindung wird mittels der folgenden Beispiele im Detail beschrieben. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht darauf beschränkt.

BEISPIEL 1

[0036] Ein 50 µl-Teil eines 50 mM Acetatpuffers (pH 6,0), enthaltend 5 nmol Galactosylsphingosin (hergestellt von Sigma), 5 nmol [1-^{14}C]-Stearinsäure (hergestellt von Amersham), 0,8% Triton X-100 und 150 µU SCDase, abgeleitet von der Gattung Pseudomonas [Journal of Biological Chemistry, 270: 24370–24374 (1995), europäisches Patent 707063 A1 (1996)] ließ man über Nacht bei 37°C reagieren.

[0037] Die Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt (Entwicklungslösungsmittel: Chloroform/Methanol/0,25% wässrige Magnesiumchloridlösung = 65/25/4) und einer bildgebenden Platte ausgesetzt um mittels des BAS 1000 Imaging Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) ein Chromatogramm zu erhalten. In diesem Fall wurden nur Banden von [1-^{14}C]-Stearinsäure und einem neu gebildeten Galactosyl-Ceramid detektiert.

[0038] Der Teil, der dem Galactosyl-Ceramid entsprach, wurde von der Dünnschichtplatte abgenommen und mit Chloroform/Methanol (2/1 Volumen/Volumen) extrahiert. Das Extrakt wurde bis zur Trocknung abgedampft und in 10 µl eines 50 mM Acetatpuffers (pH 6,0), enthaltend 16 mE (β-Galactosidase (abgeleitet von Jackbohnen) und 0,4% Taurodesoxycholinsäure, gelöst um einen Enzymverdau über Nacht bei 37°C durchzuführen. Die Reaktionslösung wurde wieder mit einer Dünnschichtchromatographie entwickelt (Entwicklerlösungsmittel: Chloroform/Methanol/flüssiger Ammoniak = 90/10/1) und mittels des BAS 1000 Imaging Analyzer (hergestellt von Fuji Photo Film) analysiert, wobei eine Bande identifiziert wurde, die denselben Rf-Wert wie Ceramid besaß. Auch wenn dieselbe Reaktion, Dünnschichtchromatographie und Extraktionsschritte unter Verwendung von unmarkierter Stearinsäure durchgeführt wurden und das so erhaltene Produkt mittels Massenspektrometrie mit schnellem Atombeschuss (FAB-Massenspektroskopie = "fast atom bombardment mass spectrometry", FAB-MS) analysiert wurde, wurde ein Peak mit m/z = 462 detektiert, welcher mit dem Ursprungsion von Galactosyl-Ceramid übereinstimmte, und ein Fragment-Ion-Peak mit m/z = 548 detektiert, welcher mit dem molekularen Ionenpeak von Ceramid übereinstimmte.

[0039] Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde dargelegt, dass die Fettsäure zur Aminogruppe mittels einer umgekehrten Reaktion auf die Sphingosingruppierung übertragen worden war.

BEISPIEL 2

[0040] Ein 50 µl-Teil eines 50 mM Acetatpuffers (pH 6,0), enthaltend 50 nmol Sphingosylphosphorylcholin (Lysosphingomyelin, hergestellt von Sigma), 5 nmol [1-^{14}C]-Stearinsäure, 0,8% Triton X-100 und 150 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, ließ man über Nacht bei 37°C reagieren.

[0041] Die Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt (Entwicklungslösungsmittel: Chloroform/Methanol/0,02% wässrige Calciumchloridlösung = 5/4/1) und mittels eines BAS 1000 Imaging Analyzer (hergestellt von Fuji Photo Film) analysiert. In diesem Fall wurden nur Banden von [1-^{14}C]-Stearinsäure und ein neu gebildetes Sphingomyelin detektiert.

[0042] Der Teil, der dem Sphingomyelin entsprach, wurde von der Dünnschichtplatte abgenommen, extrahiert und dann bis zur Trocknung abgedampft um ein Produkt der Rückreaktion zu erhalten. Das Produkt wurde in 20 µl 25 mM Phosphatpuffer (pH 7,5), enthaltend 35,7 µE Sphingomyelinase, die von Staphylococcus aureus (hergestellt von Sigma) stammte, gelöst um über Nacht einen Enzymverdau bei 37°C durchzuführen.

[0043] Die Reaktionslösung wurde wieder mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt (Entwicklerlösungsmittel: Chloroform/Methanol/flüssiger Ammoniak = 90/10/1) und mittels eines BAS 1000 Imaging Analyzers analysiert, wobei eine Bande gefunden wurde, die denselben Rf-Wert wie Ceramid aufwies. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde aufgedeckt, dass die Fettsäure mittels einer Rückreaktion auf die Aminogruppe der Sphingosingruppierung übertragen worden war.

BEISPIEL 3

Rückreaktion bei verschiedenen Akzeptoren mittels SCDase –1

[0044] Ein 10 µl-Teil 50 mM Acetatpuffer (pH 6,0), enthaltend 1 nmol [1-^{14}C]-Stearinsäure, 1 nmol Lysosphingolipid, 0,8% Triton X-100 und 30 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, wurden über Nacht einer Reaktion bei 37°C unterzogen. Die so erhaltene Reaktionslösung wurde auf Dünnschichtchromatographie entwickelt und einer bildgebenden Platte ausgesetzt um das Reaktionsprodukt mittels eines BAS 1000 Imaging Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

[0045] Wie in Tabelle 1 gezeigt, kann das Enzym nicht nur breit auf verschiedene Mitglieder von Lysoglykosphingolipiden wirken, sondern auch auf Lysosphingophospholipid und Sphingosin, wobei diese als Akzeptoren verwendet werden.

TABELLE 1

Lysosphingolipid	Relative Aktivität (%)
Galactosylsphingosin	100,0
Lysosulfatid	59,6
Lysolactosyl-Ceramid	37,2
Lysoglobosid	34,1
Lysogangliosid GM1a	15,4
Lysosphingomyelin	5,7
Sphingosin	11,5

BEISPIEL 4

Rückreaktion mit verschiedenen Akzeptoren mittels SCDase – 2

[0046] Ein 41,6 µl-Teil 25 mM Glycin-Natriumhydroxid-Puffer (pH 11), enthaltend 66,6 nmol N-Trifluor-acetylierte Aminododecansäure, 33,3 nmol Lysosphingolipid, 0,3% Triton X-100 und 148 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, wurde 48 Stunden der Reaktion bei 37°C ausgesetzt.

[0047] Die so erhaltene Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt, ein Glykosphingolipid wurde mit Orcinol-Schwefelsäure gefärbt und andere Sphingolipide mit Coomassie Brilliant Blue, und dann wurde die Bestimmung des Reaktionsproduktes mittels eines bildgebenden Densitometers (hergestellt von Bio-Rad) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

[0048] Wie in Tabelle 2 gezeigt, ähnlich zu Beispiel 3, kann das Enzym nicht nur auf verschiedene Mitglieder der Lysosphingolipide breit wirken, sondern auch auf Sphingosin, indem es dieses als Rezeptor verwendet.

TABELLE 2

Lysosphingolipid	Reaktionseffizienz (%)
Sphingosin	69
Lysogangliosid GM3	24
Lysogangliosid GD3	13
Lysogangliosid GM1a	29
Lysogangliosid GD1a	32

BEISPIEL 5

Spezifität der SCDase-Rückreaktion für Fettsäuremolekültypen

[0049] Ein 50 µl-Teil 50 mM Acetatpuffer (pH 6,0), enthaltend 5 nmol Galactosylsphingosin (hergestellt von Sigma), 5 nmol verschiedene, nicht-markierte Fettsäuren, 0,8% Triton X-100 und 150 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, ließ man über Nacht bei 37°C reagieren.

[0050] Die so erhaltene Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt, und die Reaktionsprodukte wurden mittels des Orcinol-Schwefelsäure-Verfahrens gefärbt und unter Verwendung eines Chromatoscanner CS 9000 (hergestellt von Shimadzu Corporation) bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 1 gezeigt. D.h., **Fig.** 1 ist ein Diagramm, welches die Spezifität der SCDase-Rückreaktion für Fettsäuremolekültypen zeigt, bei denen die Fettsäure auf der Ordinate und der Ertrag (%) auf der Abszisse aufgetragen ist.

BEISPIEL 6

Optimums-pH-Wert der Rückreaktion von SCDase

[0051] Ein 10 µl-Teil von jeder der verschiedenen Pufferlösungen, von denen jede 1 nmol Galactosylsphingosin, 1 nmol [1-^{14}C]-Stearinsäure, 0,8% Triton X-100 und 30 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, ließ man über 3 Stunden bei 37°C reagieren. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 2 gezeigt. D.h., **Fig.** 2 ist ein Diagramm, welches den Optimums-pH-Wert der Rückreaktion zeigt, in welchem die Abbaurate (%) auf der Ordinate und der pH-Wert auf der Abszisse aufgetragen ist. In **Fig.** 3 steht □ für Acetatpuffer, ▲ für Phosphatpuffer und • steht für Glycin-NaOH-Puffer.

BEISPIEL 7

Fettsäure-Austauschreaktion bei verschiedenen Akzeptoren mittels SCDase

[0052] Ein 10 µl-Teil 50 mM Acetatpuffer (pH 6,0), enthaltend 1 nmol [1-^{14}C]-Stearinsäure, 1 nmol Sphingolipid, 0,8% Triton X-100 und 30 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, ließ man über Nacht bei 37°C reagieren.

[0053] Die so erhaltene Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt und einer bildgebenden Platte ausgesetzt um die Bestimmung des Reaktionsproduktes mittels eines BAS 1000 Imaging Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) durchzuführen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

[0054] Wie in Tabelle 3 gezeigt, kann das Enzym eine breite Fettsäure-Austauschreaktion bei Sphingolipiden durchführen.

TABELLE 3

Sphingolipid	Relative Aktivität (%)
Galactosyl-Ceramid	100,0
Glucosyl-Ceramid	129,0
Sulfatid	31,7
Lactosyl-Ceramid	112,0
Asialo GM1	164,0
Globosid	141,0
Gangliosid GM3	54,4
Gangliosid GM2	5,5
Gangliosid GM1a	2,4
Gangliosid GD1a	6,2
Gangliosid GD1b	1,2
Sphingomyelin	2,9
Ceramid	77,5

BEISPIEL 8

Untersuchung der Reaktionsbedingungen

[0055] Um Bedingungen für die Hydrolysereaktion zu untersuchen, wurden die Rückreaktion und die Fettsäure-Austauschreaktion unter den folgenden Bedingungen (A) und (B) durchgeführt.

Reaktionsbedingungen (A)

[0056] Ein 200 µl-Teil 25 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), enthaltend 120 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, und 0,8% Triton X-100 als Substrat wird mit 100 µM ^{14}C-Galactosyl-Ceramid zum Zeitpunkt

der Hydrolysereaktion, 100 µM [1-^{14}C]-Stearinsäure und 100 µM Galactosylsphingosin zum Zeitpunkt der Rückreaktion oder 100 µM [1-^{14}C]-Stearinsäure und 100 µM Galactosyl-Ceramid zum Zeitpunkt der Fettsäure-Austauschreaktion ergänzt.

Reaktionsbedingungen (B)

[0057] Ein 200 µl-Teil 25 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), enthaltend 120 µE SCDase, die von der Gattung Pseudomonas stammte, und 0,1% Triton X-100 als Substrat wird mit 100 µM ^{14}C-Galactosyl-Ceramid, zum Zeitpunkt der Hydrolysereaktion, 100 µM [1-^{14}C]-Stearinsäure und 100 µM Galactosylsphingosin zum Zeitpunkt der Rückreaktion oder 100 µM [1-^{14}C]-Stearinsäure und 100 µM Galactosyl-Ceramid zum Zeitpunkt der Fettsäure-Austauschreaktion ergänzt.

[0058] Unter den obigen Bedingungen wurde jede Reaktion bei 37°C durchgeführt, und ein 20 µl-Teil der Probe wurde von jeder Reaktionslösung nach 0,25, 0,5, 1, 3, 7 oder 21 Stunden der Reaktion entnommen und für 5 Minuten auf 100°C erhitzt um die Reaktion abzustoppen.

[0059] Jede der so erhaltenen Reaktionslösungen wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Entwicklerlösungsmittel: Chloroform/Methanol/0,02% wässrige Calciumchloridlösung = 5/4/1) entwickelt, und das Reaktionsprodukt und die nichtreagierte Substanz wurden mittels eines BAS 1000 Imaging Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) bestimmt um die Reaktionseffizienz zu errechnen. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 3 gezeigt. D.h., **Fig.** 3 ist ein Diagramm, welches die Reaktionseffizienzen der Hydrolysereaktion, der Rückreaktion und der Fettsäure-Austauschreaktion von SCDase unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen (A) und (B) zeigt, wobei das Reaktionsverhältnis (%) auf der Ordinate und die Reaktionszeit (h) auf der Abszisse aufgetragen sind. In **Fig.** 3 steht ○ für die Hydrolysereaktion, □ steht für die Rückreaktion und Δ steht für die Fettsäure-Austauschreaktion, jeweils als Reaktionsverhältnis.

[0060] Als Ergebnisse wurde entdeckt, dass die Hydrolysereaktion der SCDase bevorzugt stattfindet, wenn die Reaktionslösung einen sauren pH besitzt und ein oberflächenaktives Mittel in einer hohen Konzentration enthält, und die Rückreaktion und die Fettsäure-Austauschreaktion der SCDase jeweils bevorzugt abläuft, wenn die Reaktionslösung neutral ist und wenn die Konzentration des oberflächenaktiven Mittels vermindert ist.

BEISPIEL 9

Synthese von ^{14}C-Ceramid

[0061] Ein 100 nmol (5,0 µCi) -Teil von [1-^{14}C] -Palmitinsäure (hergestellt von Amersham) und 200 nmol Sphingosin, das in Ethanol gelöst war, wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Stickstoffgas vollständig getrocknet. Ein 0,5 ml-Teil 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), enthaltend 0,6% Triton X-100, wurde in das Reaktionsgefäß gegeben, gründlich gerührt und dann durch Ultraschallbehandlung homogenisiert.

[0062] Die so erhaltene homogenisierte Lösung wurde mit 0,5 ml SCDase, die von der Gattung Pseudomonas (1 mE/ml) stammte, vermischt, und man lieft sie bei 37°C für 20 Stunden umsetzen.

[0063] Nach Vollendung der Reaktion wurde die so erhaltene Reaktionslösung unter Verwendung eines Zentrifugationsevaporators getrocknet, das so getrocknete Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Hexan/Ether/Essigsäure (50/50/1 Volumen/Volumen/ Volumen) gelöst und auf eine Sep-Pak®-Silicasäule aufgebracht, welche mit derselben Lösung äquilibriert worden war, nicht-umgesetzte [1-^{14}C]-Palmitinsäure wurde mit 10 ml derselben Lösung herausgewaschen, und dann wurde ^{14}C-Ceramid mit 10 ml Chloroform/Methanol (2/1 Volumen/Volumen) eluiert.

[0064] Das Eluat wurde mit Stickstoffgas getrocknet, in destilliertem Wasser suspendiert und dann mittels Ultraschallbehandlung homogenisiert. Die so homogenisierte Lösung wurde auf eine Sep-Pak® C18-Patrone aufgebracht. Die Patrone wurde mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen und ^{14}C-Ceramid wurde mit 3 ml Methanol und 10 ml Chloroform/Methanol (2/1, Volumen/Volumen) eluiert.

[0065] Als nächstes wurde das so erhaltene Eluat mit Stickstoffgas getrocknet, in Chloroform/Methanol/destilliertem Wasser (90/10/1, Volumen/Volumen/Volumen) gelöst und dann auf eine Sep-Pak® CM-Patrone aufgebracht, welche mit derselben Lösung wie die für das Absorbieren der nicht-umgesetzten Sphingosine äquilibriert worden war. In diesem Fall wurde die durchgelassene Fraktion mit Stickstoffgas getrocknet, unter Erhalt

von 66 nmol (3,3 µCi) gereinigtem ^{14}C-Ceramid, das Fettsäuren und Sphingosine zu 1% oder weniger enthielt.

BEISPIEL 10

[0066] Synthese von Amino-Ceramid und seinem fluoreszierenden Derivat.

[0067] Ein 41,6 ml-Teil 25 mM Glycin-Natriumhydroxid-Puffer (pH 11), enthaltend 66,6 µmol N-Trifluor-acetylierte Aminododecansäure, 33,3 µmol Sphingosin (hergestellt von Sigma), 0,3% Triton x-100 und 148 mE Pseudomonas-SCDase ließ man bei 37°C für 48 Stunden reagieren.

[0068] Nach Vollendung der Reaktion wurde die Reaktionslösung auf eine C18-Umkehrphasen-Silicagelsäule aufgebracht, die Säule wurde mit Wasser zum Entsalzen gewaschen, und dann wurde N-Trifluor-acetyliertes Amino-Ceramid mit Chloroform/Methanol (2/1, Volumen/Volumen) eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der daraus hervorgehende Rest in Chloroform/Methanol/Wasser (90/10/1, Volumen/Volumen/ Volumen) gelöst und auf eine Sep-Pak® CM-Patrone (hergestellt von Waters) zum Adsorbieren von nicht-umgesetzten Sphingosinen aufgebracht um eine nicht-adsorbierte Fraktion, die N-Trifluor-acetyliertes Amino-Ceramid enthielt, zu erhalten. Die nicht-adsorbierte Fraktion wurde auf eine Sep-Pak® QMA-Patrone (hergestellt von Waters) zum Adsorbieren von nicht-umgesetzter N-Trifluor-acetylierter Aminododecansäure aufgebracht um eine nicht-adsorbierte Fraktion, die N-Trifluor-acetyliertes Amino-Ceramid enthielt, zu erhalten.

[0069] Ein 20 ml-Teil Chloroform/Methanol (2/1, Volumen/Volumen), der das so erhaltene N-Trifluor-acetylierte Amino-Ceramid enthielt, und 1% Natriummethoxid ließ man über Nacht bei Raumtemperatur reagieren. Nach Vollendung der Reaktion wurde das Lösungsmittel abgedampft, der dabei hervorgehende Rest wurde in Wasser suspendiert und auf eine Sep-Pak® C18-Patrone (hergestellt von Waters) aufgebracht, die Säule wurde mit Wasser gewaschen um ein Entsalzen zu bewirken, und dann wurde Amino-Ceramid mit Chloroform/Methanol (2/1, Volumen/Volumen) eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der daraus hervorgehende Rest in Chloroform/Methanol/Wasser (60/30/5) gelöst, auf eine Sep-Pak® CM-Patrone aufgebracht und mit Chloroform/Methanol/1 N HCl (60/30/5) eluiert, und dann wurde das Eluat unter Erhalt von 5,6 µmol gereinigtem Amino-Ceramid getrocknet.

[0070] Ein 70 µl-Teil 100 nmol Amino-Ceramid, gelöst in Methanol, 20 µl 50 mM NBD-Fluorid (hergestellt von Sigma) in ethanolischer Lösung und 10 µl Triethylamin ließ man 1 Stunde bei 60°C reagieren. Nach Vollendung der Reaktion wurde das Lösungsmittel abgedampft, der daraus hervorgehende Rest wurde in Hexan/Ether/Essigsäure (50/50/1) gelöst und auf Sep-Pak® Silicapatronen (hergestellt von Waters) aufgebracht und mit Chloroform/Methanol (2/1, Volumen/Volumen) eluiert. Dann wurde das Eluat getrocknet unter Erhalt von 30 nmol gereinigtem NBD-Ceramid.

BEISPIEL 11

[0071] Limulus polyphemus-Ceramidase-Durchmustern unter Verwendung des fluoreszierenden Sphingolipidderivates NBD-Ceramid: 10 µl Serum, erhalten durch Zentrifugation von Limulus polyphemus-Blut, ließ man bei 37°C 18 Stunden mit 10 µl 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0), enthaltend 1 nmol NBD-Ceramid, hergestellt in Beispiel 10, und 0,5% Triton X-100 reagieren. Nach Vollendung der Reaktion wurde die Reaktionslösung mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt (Entwicklerlösungsmittel: Chloroform/Methanol/25% flüssiger Ammoniak = 90/20/0,5) und unter einer Lampe mit ultravioletter Strahlung detektiert. In diesem Fall wurde eine neu gebildete NBD-Aminododecansäure detektiert, so dass eine Ceramidase-Aktivität im Limulus polyphemus-Serum detektiert wurde.

[0072] Um zu bestätigen, dass die Ceramidase-Aktivität, die in dem Limulus polyphemus-Serum gefunden wurde, wirklich eine Ceramidase-abgeleitete Aktivität ist, wurde die Ceramidase gereinigt, wobei herausgefunden wurde, dass es sich um eine saure Ceramidase mit einem Optimums-pH-Wert von 4,5 und einem Molekulargewicht von ungefähr 205 kDa, gemessen durch ein Gel-Filtrations-Verfahen, handelte. Man fand außerdem heraus, dass diese Limulus polyphemus-Ceramidase N-Stearoylsphingosin (C18:0, d18:1) äußerst effizient hydrolysiert, und auch eine Aktivität auf ein Ceramid besitzt, welches Sphinganin oder Phytosphingosin als langkettiges Gerüst enthält.

[0073] Somit wurde das Vorhandensein einer Invertebraten-Ceramidase, welche nicht bekannt war, zum ersten Mal durch Verwendung des fluoreszierenden Sphingolipidderivats NBD-Ceramid, welches durch das Herstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, aufgedeckt, und es wurde bestätigt, dass das fluoreszierende Sphingolipidderivat NBD-Ceramid als Substrat zur Verwendung bei der Messung von Cerami-

dase-Aktivität nützlich ist.

BEISPIEL 12

[0074] Messung von Ceramidase-Aktivität in B16-Zellen unter Verwendung von radioaktiv markiertem ^{14}C-Ceramid (C12-^{14}C-Cer) und fluoreszierendem Sphingolipidderivat NBD-Ceramid (C12-NBD-Cer) als Substrat:

[0075] Es wurde durch Suspendieren von 6 × 10^6 B16-Zellen in 200 µl 10 mM Phosphatpuffer eine Zellsuspension hergestellt. Die Menge des Proteins wurde unter Verwendung von Micro-BCA™ Protein-Assay-Reagens (hergestellt von Pierce) bestimmt.

Reaktionsbedingungen 1

[0076] Unter sauren Bedingungen in 10 µl 50 mM Acetatpuffer (pH 4,0), enthaltend 10 µl der Zellsuspension (verdünnt auf einen Proteingehalt von 50 µg), 200 pmol C12-NBD-Cer, erhalten in Beispiel 10, oder 100 pmol C12-^{14}C-Cer, erhalten unter Verwendung von Laurylsäure anstelle von Palmitinsäure, die in Beispiel 9 verwendet wurde, als Substrat, und 0,5% Triton X-100.

Reaktionsbedingungen 2

[0077] Unter neutralen Bedingungen in 10 µl 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), enthaltend 10 µl der Zellsuspension (verdünnt auf einen Proteingehalt von 50 µl, 200 pmol C12-NBD-Cer oder 100 pmol C12-^{14}C-Cer, als Substrat, und 0,5% Triton X-100.

Reaktionsbedingungen 3

[0078] Unter basischen Bedingungen in 10 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5), enthaltend 10 µl der Zellsuspension (verdünnt auf einen Proteingehalt von 50 µl), 200 pmol C12-NBD-Cer oder 100 pmol C12-^{14}C-Cer, als Substrat, und 0,5% Triton X-100.

[0079] Unter jeder der obigen Bedingungen wurde die Reaktion bei 37°C für 3 oder 6 Stunden durchgeführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Chloroform/Methanol (2/1) zur Reaktionslösung abgestoppt. Die so erhaltene Reaktionslösung wurde getrocknet und dann in Chloroform/Methanol (2/1) gelöst um als Probe verwendet zu werden.

[0080] Jede der Proben wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Entwicklerlösungsmittel: Chloroform/Methanol/25% flüssiger Ammoniak = 90/20/0,5) entwickelt, und die freigesetzte ^{14}C-Fettsäure wurde unter Verwendung eines BAS 1000 Imaging Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) bestimmt um das Reaktionsverhältnis zu errechnen. Ebenso wurde die freigesetzte NBD-Fettsäure unter Verwendung eines Chromatoscanners CS 9000 (hergestellt von Shimadzu Corporation) bestimmt, und das Reaktionsverhältnis wurde errechnet. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 4 gezeigt. D.h., **Fig.** 4 ist ein Diagramm, welches einen Vergleich der Messungen der Ceramidase-Aktivitäten in B16-Zellen zeigt, indem die Reaktionen über 3 Stunden (3 Std.) und 6 Stunden (6 Std.) unter Verwendung von C12-NBD-Cer als Substrat und Reaktionen über 3 Stunden und 6 Stunden unter Verwendung von C12-^{14}C-Cer als Substrat in absteigender Reihenfolge auf der Ordinate und die Abbauverhältnisse (%) auf der Abszisse aufgetragen sind.

[0081] Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird angenommen, dass es eine alkalische Ceramidase gibt, welche gut bei C12-NBD-Cer arbeitet, aber kaum bei C12-^{14}C-Cer, und eine saure Ceramidase, welche gut bei C12-^{14}C-Cer arbeitet, aber kaum bei C12-NBD-Cer.

INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0082] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von Sphingolipidderivaten zur Verfügung, was durch Modifizieren oder Substituieren von einer langkettigen Fettsäure der Ceramidgruppierung als gemeinsamer Teil eines Sphingolipids bewirkt wird. Die Verwendung des Herstellungsverfahrens macht auch die industriell vorteilhafte Herstellung von beliebigen Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten möglich. Da natürlich vorkommende Sphingolipide im Allgemeinen eine Diversität aufweisen in Bezug auf Kettenlänge der langkettigen Fettsäure, war es schwierig, Sphingolipide zu erhalten, die eine gleichförmige Kettenlänge der langkettigen Fettsäure aufweisen. Mit der Substitution der langkettigen Fettsäure gemäß der vorliegenden Er-

findung können jedoch Sphingolipide erhalten werden, deren langkettige Fettsäure gleichförmig ist. Da es auch möglich ist, markierte Sphingolipide herzustellen, indem eine Chromophor-bildende Substanz, eine fluoreszierende Substanz, Biotin, ein radioaktives Isotop oder ähnliches, in die Fettsäuregruppierung eines Sphingolipids eingeführt wird, kann das markierte Sphingolipid verwendet werden zur Klärung eines intrazellulären Metabolismus, eines Transportweges von Sphingolipiden oder ähnlichem. Zusätzlich können durch die Umwandlung der Ceramidgruppierung im Sphingolipid, z.B. durch Einführung von funktionellen hoch-ungesättigten Fettsäuren, wie Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexaensäure (DHA) oder ähnlichen, neue Sphingolipidderivate mit modifizierter Zellpermeabilität, modifiziertem Zellmetabolismus oder modifizierter biologischer Aktivität gebildet werden, welche für Medikamente, Kosmetika, Zelltechnologie und ähnliches, verwendet werden können.

[0083] Das Herstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung hat die effiziente und kostengünstige Herstellung von beliebigen Sphingolipiden oder Sphingolipidderivaten, welche für Medikamente, für die Zuckertechnologie, die Zelltechnologie und ähnliches, nützlich sind, möglich gemacht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, welches den Schritt umfasst, ein Sphingolipid mit einer aliphatischen Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase unter Erhalt eines anderen Sphingolipids oder Sphingolipidderivates mit einer anderen Fettsäurekette, enzymatisch umzusetzen.

2. Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, welches den Schritt umfasst, ein Lysosphingolipid mit einer aliphatischen Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase unter Erhalt eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, enzymatisch umzusetzen.

3. Verfahren zur Herstellung eines Sphingolipids oder eines Sphingolipidderivates, welches den Schritt umfasst, mindestens zwei unterschiedliche Sphingolipide oder Sphingolipidderivate unter Verwendung einer Sphingolipid-Ceramid-Deacylase unter Erhalt eines anderen Sphingolipids oder Sphingolipidderivates mit einer ausgetauschten Fettsäurekette, enzymatisch umzusetzen.

4. Verfahren nach Anspruch 1, welches den Schritt umfasst, ein Sphingolipid und eine aliphatische Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, mit einem Mikroorganismus, der in der Lage ist, eine Sphingolipid-Ceramid-Deacylase herzustellen, unter Erhalt eines anderen Sphingolipids oder Sphingolipidderivates mit einer anderen Fettsäurekette, in Kontakt zu bringen.

5. Verfahren nach Anspruch 2, welches den Schritt umfasst, ein Lysosphingolipid und eine aliphatische Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, mit einem Mikroorganismus, der in der Lage ist, eine Sphingolipid-Ceramid-Deacylase herzustellen, unter Erhalt eines Sphingolipids oder Sphingolipidderivates, in Kontakt zu bringen.

6. Verfahren nach Anspruch 3, welches den Schritt umfasst, mindestens zwei unterschiedliche Sphingolipide oder Sphingolipidderivate mit einem Mikroorganismus, der in der Lage ist, eine Sphingolipid-Ceramid-Deacylase herzustellen, unter Erhalt eines anderen Sphingolipids oder Sphingolipidderivates mit einer ausgetauschten Fettsäurekette, in Kontakt zu bringen.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–6, wobei die Sphingolipid-Ceramid-Deacylase von einem Bakterium hergestellt wird, dass zur Gattung Pseudomonas gehört.

8. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Mikroorganismus in einem Medium kultiviert wird, das das Sphingolipid und die aliphatische Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Mikroorganismus in einem Medium kultiviert wird, das das Lysosphingolipid und die aliphatische Carbonsäure, die wahlweise eine Markersubstanz umfasst, enthält.

10. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Mikroorganismus in einem Medium kultiviert wird, das die mindestens zwei unterschiedlichen Sphingolipide oder Sphingolipidderivate enthält.

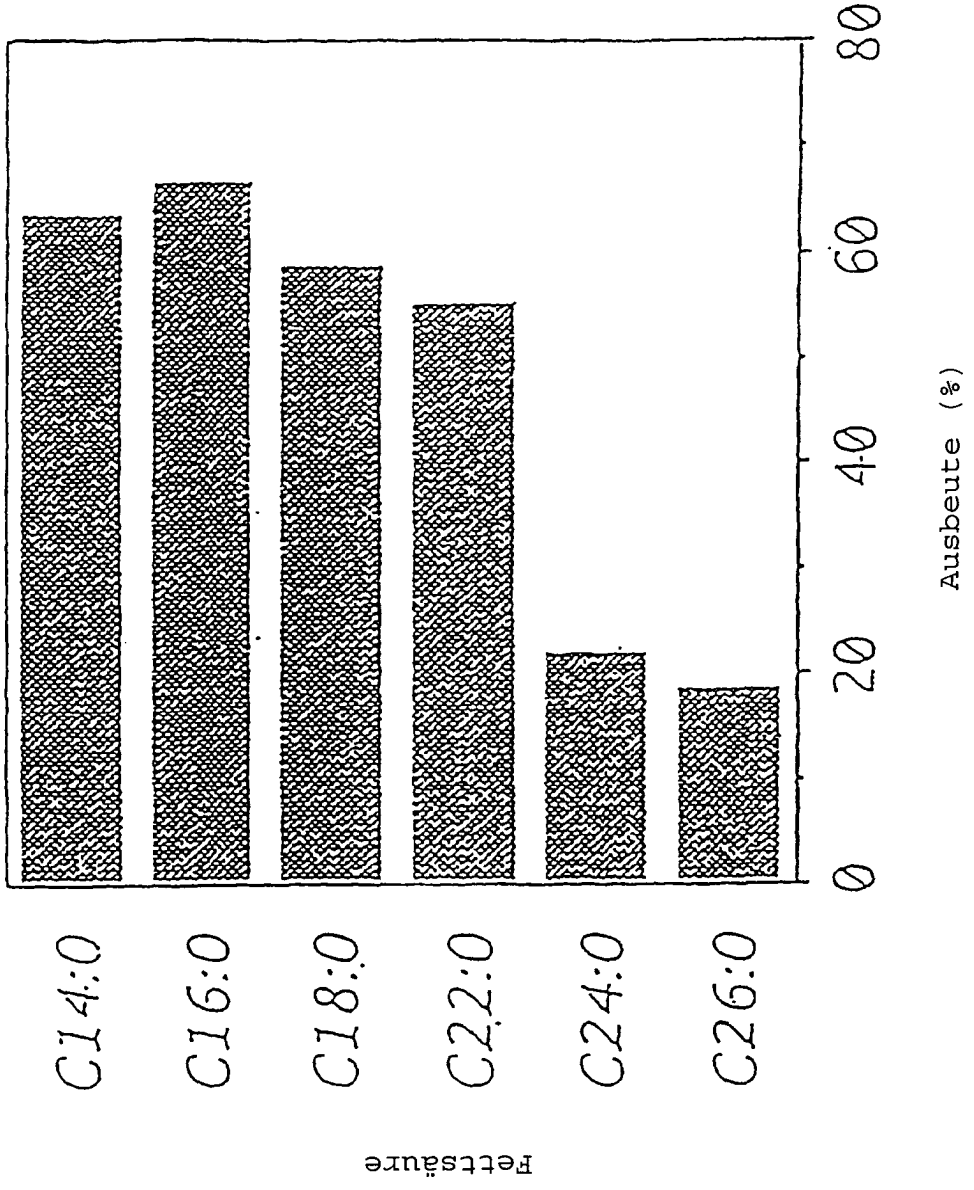
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur

Gattung Pseudomonas gehört.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1



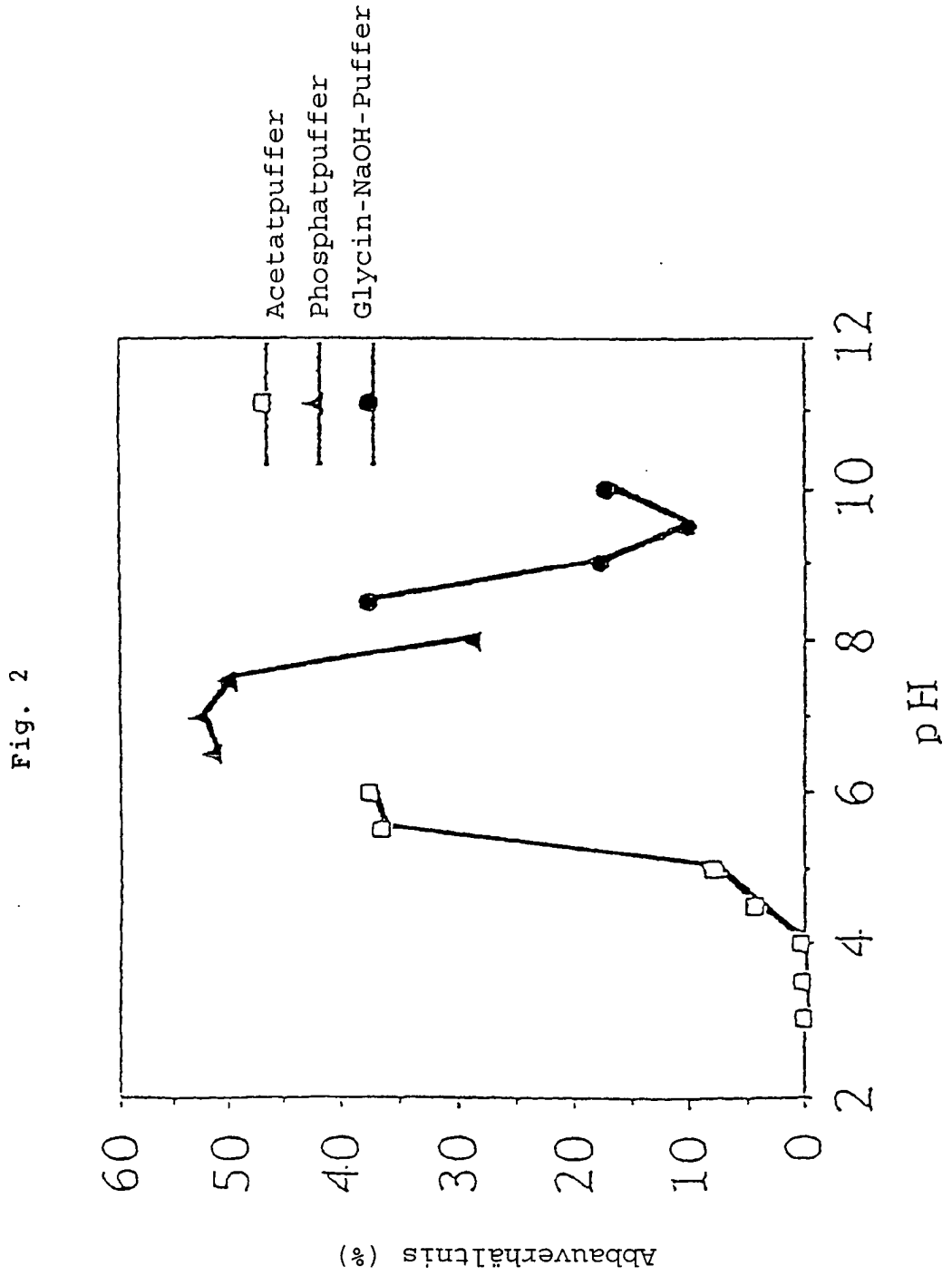

Acetatpuffer
Phosphatpuffer
Glycin-NaOH-Puffer
Abbauverhältnis (%)
0
10
20
30
40
50
60
2
4
6
8
10
12
pH

Fig. 2

Fig. 3

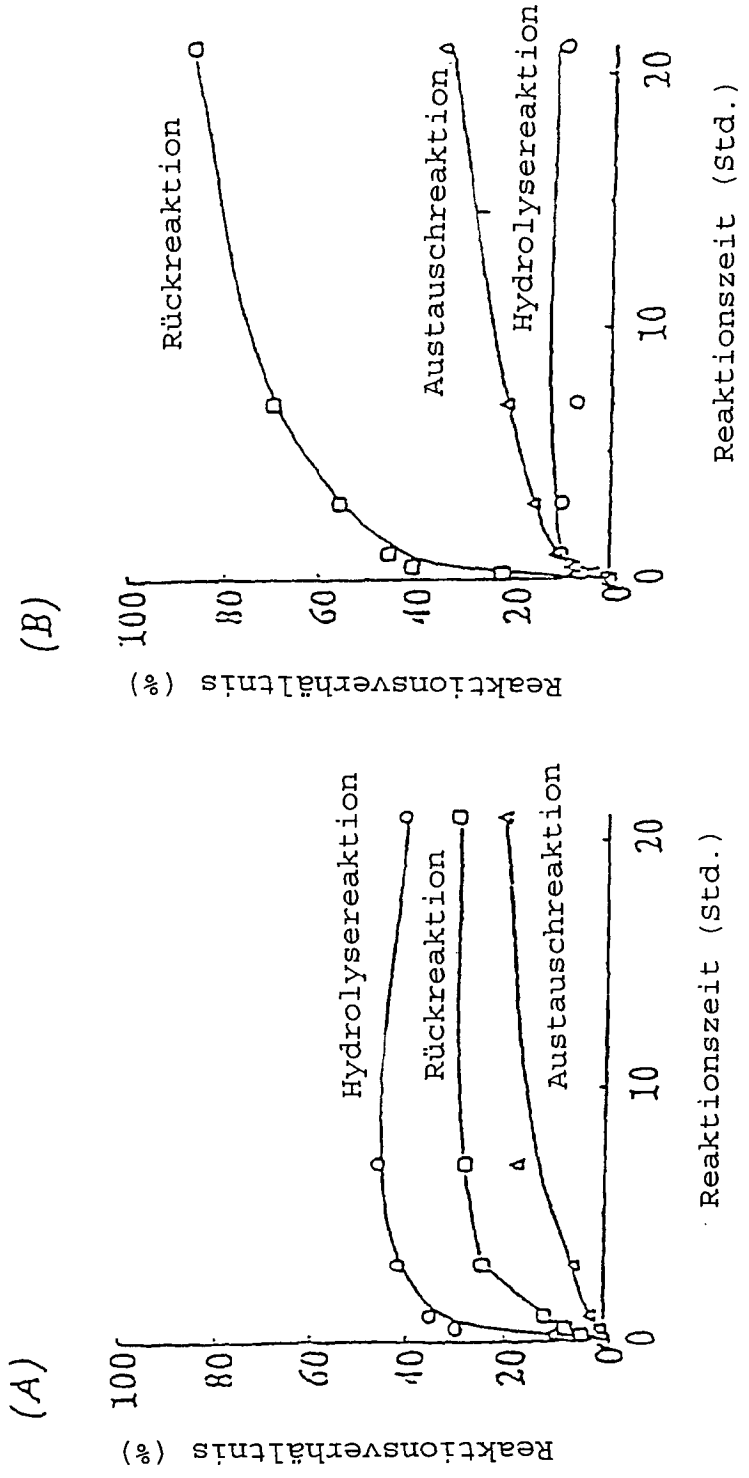
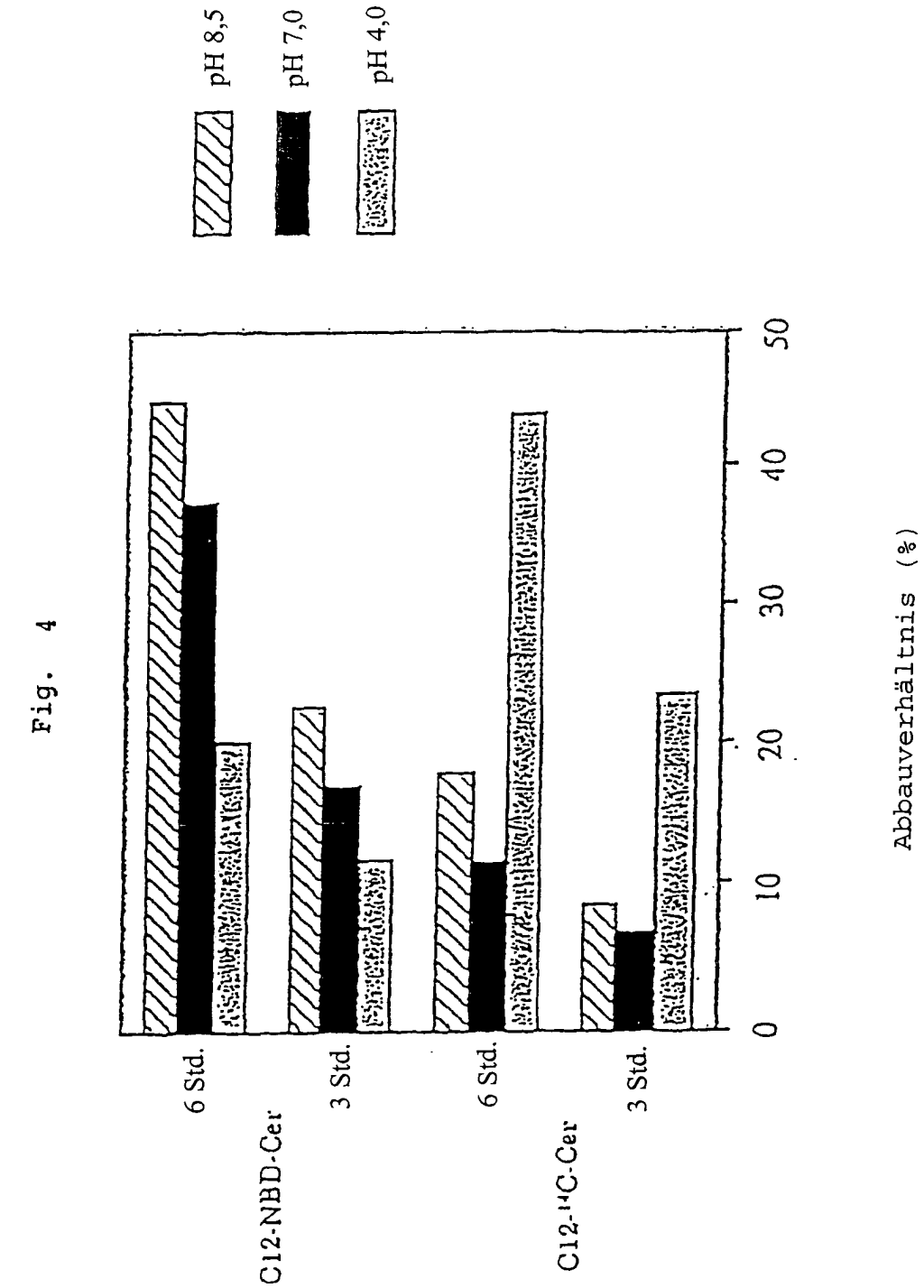

(A)
Reaktionsverhältnis (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
Reaktionszeit (Std.)
Hydrolysereaktion
Rückreaktion
Austauschreaktion
(B)
Reaktionsverhältnis (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
Reaktionszeit (Std.)
Rückreaktion
Austauschreaktion
Hydrolysereaktion

Fig. 4


pH 8,5
pH 7,0
pH 4,0
6 Std.
3 Std.
C12-NBD-Cer
6 Std.
3 Std.
C12-14C-Cer
0
10
20
30
40
50
Abbauverhältnis (%)