

POLSKA  
RZECZPOSPOLITA  
LUDOWA



URZĄD  
PATENTOWY  
PRL

# OPIS PATENTOWY

95385

Patent dodatkowy  
do patentu nr \_\_\_\_\_

Zgłoszono: 10.12.74 (P. 176310)

Pierwszeństwo: \_\_\_\_\_

Zgłoszenie ogłoszono: 03.07.76

Opis patentowy opublikowano: 31.03.1978

MKP C07g 11/00  
A61k 21/00

Int. Cl.<sup>2</sup> C07G 11/00  
A61K 21/00

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego

Twórcy wynalazku: Hanna Wojciechowska, Małgorzata Gumieniak, Ry-  
szard Andruszkiewicz, Aleksandra Andruszkiewicz,  
Maciej Smulkowski, Jerzy Gumieniak, Jadwiga  
Wolf, Edward Borowski

Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska, Gdańsk (Polska)

## Spóśób otrzymywania dezalanilotetainy

1

Przedmiotem wynalazku jest spóśób otrzymy-  
wania dezalanilotetainy.

Dotychczas znany spóśób otrzymywania deza-  
lanilotetainy polega na enzymatycznej degrada-  
cji czystej tetainy przy pomocy lipazy i wyodręb-  
nieniu otrzymanego produktu przez rozdział prze-  
ciwprądowy.

Niedogodnością znanego sposobu są wysokie ko-  
szty procesu związane z ceną lipazy. Ponadto,  
opisanym sposobem można otrzymywać dezalanilo-  
tetainę jedynie na skalę laboratoryjną ze wzglę-  
du na stosowanie rozdziału przeciwpładowego do  
jej izolacji.

Sposób otrzymywania dezalanilotetainy na dro-  
dze enzymatycznej degradacji według wynalazku  
polega na tym, że na tetainę lub na jej ekstra-  
kty butanolowe, otrzymywane w wyniku wstępnej  
izolacji z brzożki, działa się preparatami enzy-  
matycznymi zawierającymi egzopeptydazy, korzy-  
stnie nieoczyszczonymi preparatami lipaz bakte-  
ryjnych, zwierzęcych lub roślinnych, w środowi-  
sku o pH od 7 do 8,5 zwłaszcza w buforze fosfo-  
ranowym, w temperaturze poniżej 30°C. Uzyskany  
produkt wydziela się z mieszaniny reakcyjnej  
znanymi sposobami, poczym oczyszcza, korzystnie  
przy pomocy chromatografii jonowymiennej, fil-  
tracji molekularnej i/lub chromatografii podziało-  
wej.

Tetaina jej mieszaniną dwóch izomerycznych

2

dwupeptydów L-alanylo-L-β-(2,3-epoksycykloheksa-  
nono-4)-alaniny, zwanych tetainą A i B. Obydwie  
substancje wykazują podobne działanie przeciw-  
drobnoustrojowe, obejmujące bakterie gramdo-  
datnie i gramujemne oraz niektóre gatunki grzy-  
bów.

Szczególnie cenną cechą tetainy jest niska toksy-  
czność dla organizmów zwierzęcych, wynikające  
z mechanizmu jej działania, który polega na ha-  
mowaniu syntezy mureiny ściany komórkowej  
drobnoustroju poprzez zahamowanie inkorporacji  
L-alaniny do reszty kwasu N-acetylmuraminowe-  
go. Ponieważ dotychczas nie są znane antybiotyki  
hamujące ten proces enzymatyczny, zbadanie me-  
chanizmu hamowania syntezy mureiny otwiera  
nowe możliwości uzyskiwania nietoksycznych che-  
moterapeutyków na drodze syntezy analogów stru-  
kturalnych tetainy. Otrzymanie tych analogów jest  
celowe również ze względu na to, że tetaina jest  
podatna na działanie szeregu enzymów, zwłaszcza  
egzopeptydaz, łatwo powodujących jej unieczyn-  
nienie w organizmach żywych.

Egzopeptydazy dezaktywują tetainę, powodując  
degradację łańcucha peptydowego na aminokwasy  
alaninę i dezalanilotetainę A i B. Dezalaniloteta-  
ina jest dogodnym substratem do syntez pochod-  
nych tetainy różnego typu.

Zalety sposobu według wynalazku polegają na  
otrzymaniu oczyszczonych produktów z dobry-

mi wydajnościami w prostym procesie technologicznym oraz możliwości prowadzenia procesu na skalę przemysłową. Ponadto, nieoczyszczone preparaty lipaz są tanim i łatwo dostępnym źródłem egzopeptydaz, natomiast w przypadku wykorzystania w procesie preparatów tetainy wstępnie izolowanych z brzoźki eliminuje się żmudne i kosztowne etapy oczyszczania antybiotyku.

Przykład I. 10 mg liofilizatu tetainy rozpuszcza się w 3 ml wody i dodaje 3 mg pronazy, zawieszanej w 3 ml buforu fosforanowego o  $\text{pH} = 8,2$ . Mieszaninę reakcyjną inkubuje się w  $28^\circ\text{C}$  przez 48 godzin, aż do zaniku aktywności biologicznej, oznaczanej metodą krążkową i mikrobiologiczną metodą dyfuzyjną wobec standardu chlorotetracykliny po ustaleniu liniowej zależności w hamowaniu wzrostu *Shigella shigae* przez tetainę i chlorotetracyklinę.

Następnie mieszaninę reakcyjną odsącza się od zawiesiny białka enzymatycznego i uzyskany klarowny roztwór zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 1 ml, po czym izoluje się dezalanilotetainę przy pomocy chromatografii jonowymiennej. Frakcje zawierające chromatograficznie czystą dezalanilotetainę łączy się, zateża pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizuje, uzyskując 5 mg liofilizatu dezalanilotetainy.

Przykład II. 50 mg liofilizatu antybiotyku, zawierającego 60% tetainy, rozpuszcza się w 10 ml wody i dodaje 8 mg pankreatyny, zawieszanej w 10 ml buforu otrzymanego w trój(hydroksymetylo)-aminometanu i kwasu solnego, o  $\text{pH} = 7,8$ . Reakcję degradacji enzymatycznej prowadzi się w  $30^\circ\text{C}$  przez 72 godziny, aż do zaniku aktywności biologicznej antybiotyku.

Następnie mieszaninę reakcyjną sączy się przez ziemię okrzemkową, zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 5 ml, dodaje 50 ml oziębnego metanolu i powstały osad odwirowuje się. Supernatant zateża się do objętości 5 ml i dezalanilotetainę izoluje się przy pomocy chromatografii jonowymiennej i filtracji molekularnej.

Eluat z kolumny, zawierający chromatograficznie jednorodną substancję liofilizuje się, uzyskując 13 mg dezalanilotetainy.

Przykład III. 10 mg liofilizatu tetainy rozpuszcza się w 3 ml wody i dodaje 20 mg preparatu lipazy, otrzymanej z hodowli *Pseudomonas species*, zawieszanej w 5 ml buforu fosforanowego o  $\text{pH} = 8,2$ .

Reakcję degradacji enzymatycznej prowadzi się w  $30^\circ\text{C}$  przez 88 godzin, aż do zaniku aktywności biologicznej antybiotyku. Osad pochodzący z preparatu enzymatycznego odsącza się, a roztwór zateża pod zmniejszonym ciśnieniem i wydziela dezalanilotetainę metodą chromatografii jonowymiennej. Frakcje zawierające dezalanilotetainę zateża się i liofilizuje, uzyskując 4 mg liofilizatu dezalanilotetainy.

Przykład IV. 20 mg liofilizatu tetainy rozpuszcza się w 2 ml wody i dodaje się 20 mg preparatu lipazy otrzymanego z hodowli *Staphylococcus aureus* zawieszanego w 10 ml buforu,

otrzymanego z trój(hydroksymetylo)aminometanu i kwasu solnego, o  $\text{pH} = 8,1$ . Reakcję enzymatyczną prowadzi się w  $30^\circ\text{C}$  przez 80 godzin, aż do zaniku aktywności biologicznej tetainy. Mieszaninę reakcyjną sączy się przez ziemię okrzemkową i otrzymany przesącz zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 2 ml, po czym wydziela się dezalanilotetainę drogą preparatywnej chromatografii bibułowej w fazie górnej układu n-butanol-metanol-woda = 10:1:10. Dezalanilotetainę eluuje się z bibuły wodą i liofilizuje, uzyskując 7 mg czystej substancji.

Przykład V. 40 mg liofilizatu tetainy rozpuszcza się w 10 ml wody i dodaje 20 mg preparatu lipazy otrzymanego z hodowli *Candida albicans* zawieszanego w 10 ml buforu, zawierającego roztwór kwasu cytrynowego i fosforanu dwusodowego o  $\text{pH} = 7,2$ . Reakcję prowadzi się w  $30^\circ\text{C}$  przez 72 godziny. Następnie odsącza się białko enzymatyczne, a przesącz zateża do objętości 5 ml pod zmniejszonym ciśnieniem. Dezalanilotetainę izoluje się przy pomocy chromatografii jonowymiennej i filtracji molekularnej. Eluat z kolumny zateża się i liofilizuje, uzyskując 15 mg chromatograficznie jednorodnej dezalanilotetainy.

Przykład VI. 100 ml ekstraktu butanolego surowego antybiotyku o zawartości tetainy 2,5 mg/ml dodaje się 80 mg preparatu lipazy trzustkowej zawieszanej w 100 ml buforu fosforanowego o  $\text{pH} = 8,2$ . Reakcję prowadzi się w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  z jednoczesnym mieszanieniem przez 72 godziny, aż do zaniku aktywności biologicznej tetainy. Mieszaninę reakcyjną przesącza się przez ziemię okrzemkową, po czym przesącz zateża się do objętości 25 ml, dodaje 150 ml oziębnego metanolu, a powstały osad odwirowuje.

Supernatant zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 25 ml i izoluje dezalanilotetainę przy pomocy chromatografii jonowymiennej, po czym oczyszcza uzyskany produkt metodą chromatografii podziałowej na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-metanol-woda = 16:8:0,5. Frakcje zawierające wyłącznie dezalanilotetainę liofilizuje się, uzyskując 75 mg preparatu czystej dezalanilotetainy.

Przykład VII. 30 mg liofilizatu antybiotyku, zawierającego 80% tetainy, rozpuszcza się w 10 ml wody i dodaje 5 mg preparatu lipazy z kielków zbożowych, zawieszanego w 10 ml buforu otrzymanego z trój(hydroksymetylo)aminometanu i kwasu solnego o  $\text{pH} = 7,8$ .

Reakcję prowadzi się w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  przez 60 godzin. Zawiesinę białka enzymatycznego odsącza się na ziemi okrzemkowej, po czym otrzymany przesącz zateża się do objętości 4 ml i poddaje filtracji molekularnej.

Izolację czystego produktu przeprowadza się metodą chromatografii podziałowej na żelu krzemionkowym w układzie octan etylu-metanol-woda = 5:1:0,75. Po liofilizacji otrzymuje się 15 mg dezalanilotetainy.

Przykład VIII. Do 100 ml ekstraktu butanolego jak w przykładzie VI, dodaje się 0,5

g surowej lipazy uzyskanej przez odtłuszczenie i odwodnienie świeżej trzuski za pomocą acetonu i eteru, zawieszanej w 100 ml buforu otrzymanego z trój(hydroksymetylo)aminometanu i kwasu solnego, o  $\text{pH} = 7,8$ . Reakcję prowadzi się przy ciągłym mieszaniu przez 2 doby w temperaturze  $28^{\circ}\text{C}$ .

Następnie mieszaninę reakcyjną zateża się do objętości 30 ml i dodaje 200 ml oziębionego metanolu, a powstały osad odwirowuje się. Supernatant zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 25 ml, po czym izoluje dezałanylotetainę za pomocą chromatografii jonowymiennej, filtracji molekularnej i chromatografii podziałowej na żelu krzemionkowym, w układzie chloroform-metanol-woda = 16:8:0,5 i liofilizuje, uzyskując 60 mg czystej dezałanylotetainy.

# Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania dezałanylotetainy na drodze enzymatycznej degradacji, **znamienny tym**, że na tetainę lub na jej ekstrakty butanolowe otrzymane w wyniku wstępnej izolacji z brzoźki działa się preparatami enzymatycznymi zawierającymi egzoptydazy, korzystnie nieoczyszczonymi preparatami lipaz bakteryjnych, zwierzęcych lub roślinnych, w środowisku o  $\text{pH}$  od 7 do 8,5, zwłaszcza w buforze fosforanowym, w temperaturze poniżej  $30^{\circ}\text{C}$ , a uzyskany produkt wydziela się z mieszaniny reakcyjnej znanymi sposobami, po czym oczyszcza, korzystnie przy pomocy chromatografii jonowymiennej, filtracji molekularnej i/lub chromatografii podziałowej na żelu krzemowym.