



**NORGE**

**[NO]**

**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 144637**

**[C] (45) PATENT MEDDELT  
7.OKT. 1981**

(51) Int' Cl.<sup>3</sup> C 12 N 11/10 // C 12 P 37/06

(21) Patentsøknad nr. 792768

(22) Inngitt 27.08.79

(23) Løpedag 27.12.74

(62) Avdelt fra søknad nr. 744705

(41) Alment tilgjengelig fra 01.07.75

(44) Søknaden utlagt, utlegningskrift utgitt 29.06.81

(30) Prioritet begjært 28.12.73, Storbritannia, nr. 59978/73

(54) Oppfinnelsens benevnelse Vann-uoppløselig penicillinacylasepreparat for anvendelse ved fremstilling av 6-aminopenicillansyre.

(71)(73) Søker/Patenthaver BEECHAM GROUP LIMITED,  
Beecham House,  
Great West Road,  
Brentford, Middlesex,  
England.

(72) Oppfinner THOMAS ADRIAN SAVIDGE, Stayning, Sussex,  
LAWSON WILLIAM POWELL, Worthing, Sussex,  
England.

(74) Fullmektig Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll,  
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner BRD (DE) off. skrift nr. 2143062, 2215687

Oppfinnelsen vedrører forbedrede enzympreparater som fremstilles av acylase-enzymmer som er kjent for å spalte amidbindingen i penicilliner. Slike enzymer betegnes her penicillin-acylaser, og de er nyttige ved fremstilling av 6-aminopenicillansyre ut fra penicilliner som er oppnådd ved fermenteringsprosesser av naturlig forekommende materialer, dvs. under anvendelse av enzymet under slike pH-betingelser at deacylering (eller spalting av amidgruppen) av penicillinet finner sted under dannelse av den ønskede 6-aminopenicillansyre (i det følgende kalt "6-APA").

Søknad nr. 74 4705, som foreliggende søknad er avdelt fra, beskriver således fremstilling av 6-aminopenicillansyre ved anvendelse av slike acylase-enzympreparater som her beskrevet.

Selv om slike penicillin-acylase- (eller deacylase-) enzymer enten i cellebundet eller cellefri tilstand er blitt anvendt for det angitte formål siden omkring 1961, opptrer det vanskeligheter under anvendelse av det cellefrie enzym, da dette ikke lett lar seg skille fra reaksjonsblandingen. Videre kan ikke det cellebundne enzym lett brukes om igjen. Videre produserer begge enzymtyper 6-APA som kontamineres med spormengder av bakterielt protein. Det er i britisk patent 1 193 918 foreslått å overvinne disse vanskeligheter ved å binde enzymet til en polymerbærer og derved gjøre det vann-uløselig. Imidlertid har slike polymer/enzympreparater vist seg å ha dårlig mekanisk stabilitet når polymerene som anvendes som bærer, er slike som generelt er tilgjengelige i kommersiell målestokk for andre formål. Disse polymerer må konstrueres spesielt og fremstilles på en spesiell måte for dette formål, hvilket er svært kostbart. Videre, når 6-APA fremstilles ved innvirkning av acylase-enzymmer, er det nødvendig å regulere reaksjonsblandingsens pH-verdi innen et snevert område under hele reaksjonen, og dette krever kontinuerlig tilsetning av et alkali for nøytralisering av karboksylsyren som resulterer fra den frigjorte penicillinsidekjede. Det har vist seg at man, når acylase-enzymet

er direkte bundet ved en kovalent binding til en polymerbærer, må være omhyggelig når man velger alkali som skal anvendes for en slik nøytralisering, og at vanligvis det alkali som velges, natriumhydroksyd, ikke kan anvendes uten at enzymet hurtig denatureres. Følgelig, hvis man må anvende en slik flyktig base som ammoniakk eller trietylamin, kan det være nødvendig med en kostbar modifikasjon av anlegget som for tiden er i anvendelse for fremstilling av 6-APA ved hjelp av acylase-enzymet i sin cellebundne form, på grunn av at det med enzymet i cellebundet form ikke er noen vanskelighet med hensyn til å anvende natriumhydroksyd for nøytralisering av den frigjorte sidekjedesyre.

Det er også foreslått, i BRD-off.skrift 2 143 062, å fremstille et vann-uløselig penicillin-acylasepreparat ved å adsorbere acylasen på en bærer og deretter tverrbinde den ved innvirkning av et vannløselig dialdehyd med og uten dannelse av bindinger mellom polymerbæreren og enzymet. Ved denne fremgangsmåte tverrbindes enzymet hovedsakelig rundt bæreren, snarere enn blir bundet til dette av kovalente bindinger. I ovennevnte off.skrift er det beskrevet forskjellige bærere, f.eks. anionebytteharpiker, dvs. slike som inneholder basiske grupper, f.eks. primære, sekundære eller tertiære aminogruupper eller lignende nitrogen funksjonelle grupper; eller karboksymetylcellulose; eller polymerer med nøytral reaksjon, f.eks. på grunn av at de funksjonelle grupper som er til stede, er estergrupper.

Det er oppdaget at bærere som har negativt ladete funksjonelle grupper, er bærere som har positivt ladete funksjonelle grupper overlegne. For eksempel ble det utført to forsøk for sammenligning av cellulose som har enten positivt eller negativt ladete grupper, nemlig dietylaminøetyl- (DEAE-)cellulose og karboksymetyl- (CM-)cellulose. Betingelsene for kobling av penicillin-acylase til hver bærer ble optimalisert, og den samme enzymløsning ble anvendt for kobling til hver bærer under anvendelse av disse optimale betingelser. Aktiviteten til det endelige, immobiliserte enzympreparat representerte 11 og 42% av den opprinnelige totale aktivitet for enzymløsningen for henholdsvis DEAE- og CM-cellulosene. De lavere aktivitetene for DEAE-cellulosepreparatene skyldtes dårlig adsorpsjon av enzymet. Da forsøket ble gjentatt under anvendelse av en annen enzymløsning, var resultatene 24 og 56% for henholdsvis DEAE- og CM-cellulosene. Imidlertid har enzympreparatene som fremstilles av cellulose, dårlig

mekanisk stabilitet, hvilket er rapportert av D.L. Regan, P. Dunnill og M.D. Lilly "Immobilized Enzyme Reaction Stability: Attrition of the Support Material" i *Biotechnology and Bioengineering*, bind XVI, s. 333-343 (1974).

Videre har de preparater som er fremstilt ved adsorpsjon/tverrbindingsteknikken hvor bæreren er en polymer med nøytral aktivitet, karakteristika med hensyn til reaktivitet og gjenanvendbarhet som også kan betraktes som utilfredsstillende. Eksempelvis var stabiliteten av penicillin-acylase som var adsorbent og tverrbundet på den nøytrale bærer "Amberlite" XAD-7 bestemt ved lagring av det immobiliserte enzympreparat ved en temperatur på 37°C, utilfredsstillende, da aktiviteten falt med 66 % etter 14 dagers lagring.

Det er funnet at hvis teknikken i henhold til ovennevnte off.skrift anvendes på kopolymerer av metakrylsyre, dvs. polymerer som har en karboksylsyrefunksjon av den alifatiske type, er de resulterende enzympreparater overraskende overlegne med hensyn til å ha en enzymaktivitet som opprettholdes etter gjentatt bruk ved produksjon av 6-APA. Bærere som består av makroporøse eller geltypepolymerer av styren, akrylsyre eller fenol/formaldehyd med enten sulfonsyre-, fosforsyre- eller karboksylsyrefunksjonelle grupper, har vist seg å være markert dårligere enn makroporøse kopolymerer av metakrylsyre. Den meget gode stabilitet hos disse preparater kan også vises ved resultatene fra lagring ved 37°C. I ett slikt forsøk tapte aktiviteten til et immobilisert enzympreparat fremstilt ved adsorpsjon og tverrbinding av acylase på en makroporøs polymer av metakrylsyre solgt under handelsbetegnelsen "Amberlite" IRC-50, bare 5 % av sin opprinnelige aktivitet etter 14 dagers lagring ved 37°C.

Slike enzympreparater er også i besittelse av øket mekanisk stabilitet. Dette trekk angående mekanisk stabilitet er viktig i enhver omrørt tankreaktor, da behovet for omrøring av reaksjonsmiljøet på kraftig måte i den hensikt å opprettholde en jevn pH-verdi og å redusere alkalinedbrytningen av penicillin til et minimum, er viktig. Videre i de forbedrede reaktorsystemer som nå er under utvikling, f.eks. hvor det uoppløselige enzympreparat tilbakeholdes inne i reaktoren ved hjelp av en sikt med egnet maskestørrelse og hvor reaksjonsmediet tappes fra ved fullførelsen av en reaksjon for produksjon av 6-APA, forblir det uløselige enzympreparat inne i reaktoren ferdig for fornyet bruk. På denne måte reduseres de

fysiske tap av enzym som normalt erfares når hele blandingen fjernes fra karet og det uløselige enzympreparat gjenvinnes ved filtrering eller sentrifugering og returneres til reaksjonskaret. I tillegg unngås mikrobiell kontaminering av enzympreparatet under håndteringen. Imidlertid må enzympreparatet ikke bli mekanisk nedbrutt slik at det finner sted betydelige tap som et resultat av at det passerer gjennom den tilbakeholdende sikt. Videre, som vist av Regan, Dunnill og Lilly (loc.cit.), har de små partikler som resulterer fra avslitning fra aminoetyl-cellulose som  $\beta$ -galaktosidase var festet til, høyere spesifikke aktiviteter enn de store partikler, og det er sannsynlig at tapet av slike partikler fra reaktoren vil resultere i et tap av total aktivitet som ikke er proporsjonalt med vekten av det tapte materiale.

I et annet reaktorsystem, som er beskrevet i belgisk patent 782 646, tilbakeholdes det uløselige enzympreparat i en kolonne-reaktor gjennom hvilken substrat sirkuleres med stor strømnings-hastighet i den hensikt at de nødvendige pH-justeringer kan utføres i et kar separat fra det uløselige enzympreparat. Bæreren må derfor ha slike egenskaper at den ikke blir mekanisk nedbrutt ved de høye trykk som er nødvendige for å opprettholde den hurtigstrømmende reaksjonsblanding. Hvert av disse reaktorsystemer kan være modifisert til å funksjonere som kontinuerlige reaktorsystemer, og problemene med adekvat mekanisk stabilitet med enzymreaktivitet og gjenanvendelse er fremdeles tilstede.

En videre fordel ved å anvende kopolymerer av metakrylsyre er at disse harpikser selv har god mekanisk stabilitet. I tillegg, når enzympreparater som er dannet av dem, har avtatt med hensyn til aktivitet til en uakseptabel verdi etter gjentatt gjenanvendelse i en reaktor, kan harpiksen bli regenerert ved avdrivning av det gjenværende enzym ved behandling med varmt alkali. Friskt enzym kan så knyttes til samme harpiks.

Det er også funnet at når enzympreparatene fremstilles ved adsorpsjon på de før nevnte metakrylsyre-kopolymerer fulgt av tverrbinding med visse tverrbindingmidler, kan det resulterende vann-uopløselige enzympreparat anvendes ved fremstilling av 6-APA uten at det er nødvendig å ta særlige forsiktighetsregler ved valget av alkali som er nødvendig for å nøytralisere den frigjorte sidekjedesyre. Det er således funnet at, ulik de systemer hvor enzymet er bundet direkte til en polymerbærer ved kovalente bindinger, natriumhydroksyd kan anvendes for dette formål, hvilket for tiden er vanlig ved anvendelse av cellebundne enzymer.

Følgelig unngås modifisering av de eksisterende anlegg for å bli tilpasset flyktige alkalier, hvilket ville være nødvendig hvis ammoniakk eller trietylamin skulle anvendes for nøytralisasjon.

US-patent 3 705 084 beskriver adsorpsjon av enzymer på polymere overflater og den påfølgende tverrbinding av dem. Polymerer og kopolymerer av metakrylsyre angis å være egnet for fremstilling av slike polymere overflater. Patentskriftet spesifiserer imidlertid at de polymere overflater må ha adsorpsjonspåskyndende grupper utvalgt blant nitril( $\equiv\text{N}$ ), syre-amido( $-\text{CONH}_2$ )- og ureido( $-\text{NHCONH}_2$ )-grupper, og før polymerer og kopolymerer av metakrylsyre kan anvendes i henhold til patentet, må derfor karboksylgrupper på polymeren og kopolymeren omvandles til en av disse spesifiserte adsorpsjonspåskyndende grupper. Følgelig kan polymerene og kopolymerene av metakrylsyre som anvendes i henhold til patentet, skjernes fra dem som anvendes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse, ved nærvær av disse spesifikke adsorpsjonspåskyndende grupper. Videre, ved å spesifisere nærværet av disse spesifikke adsorpsjonsgrupper, antyder patentet at modifiserte polymerer og kopolymerer av metakrylsyre utgjør mer nyttige enzymkomplekser enn de umodifiserte polymerer og kopolymerer. Patentet lærer derfor bort fra foreliggende oppfinnelse at når det gjelder acylase-enzymmer, er det de umodifiserte kopolymerer av metakrylsyre som foretrekkes.

For å vise overlegenheten ved kopolymerer av metakrylsyre i acylase-enzympreparater, ble acylase-preparater fremstilt av nylon og polyuretan, to polymerer som er representative for de foretrukne og eksemplifiserte polymerer i henhold til ovennevnte US-patent, under anvendelse av glutaraldehyd som tverrbindingmiddel, og deres aktivitet ble sammenlignet med et acylase-enzympreparat fremstilt av "Amberlite" IRC-50 på lignende måte. Når man tok i betraktning den avvikende partikkelstørrelse på enzympreparatene, fant man at "Amberlite" IRC-50-preparatet var to til tre ganger mer aktivt enn polyuretanpreparatet, og så meget som elleve ganger mer aktivt enn nylonpreparatet. Disse resultater er beskrevet i detalj i de spesifikke eksempler lengre ut i denne beskrivelse.

Idéen med å adsorbere et enzym på en bærer og tverrbinde det in situ, er også beskrevet i GB-patent 1 257 263. Dette refererer imidlertid ikke til penicillin-acylase-enzymmer. Heller ikke beskriver det anvendelse av metakrylsyrepolymerer og -kopoly-

merer som bærere. Det refererer heller ikke til de fordeler som oppnås ved å velge bærere med god mekanisk stabilitet. Ikke desto mindre strekker dets idé seg til tverrbinding av enzymet rundt bæreren ved å anbefale bruken av andre polyfunksjonelle reagenser enn vann-løselige dialdehyder, f.eks. bis-diazo-o-dianisidin. Likeledes antas det at idéen ved foreliggende oppfinnelse kan strekkes til å inkludere glyoksal og formaldehyd som tverrbindingsmidler, i tillegg til glutaraldehyd.

Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen et vann-uoppløselig penicillinacylasepreparat som omfatter et penicillinacylase-enzym adsorbent på en vann-uløselig polymerbærer og tverrbundet med et tverrbindingsmiddel utvalgt blant glutaraldehyd, glyoksal og formaldehyd, idet polymerbæreren er en vann-uløselig makroporøs kopolymer av metakrylsyre og divinylbenzen, og kopolymeren er til stede i form av findelte partikler eller små kuler med partikkelstørrelse i området 2,0-0,01 mm.

Fremstilling av det vann-uløselige enzympreparat omfatter å adsorbere et penicillinacylase-enzym på den vann-uoppløselige kopolymer av metakrylsyre og divinylbenzen fulgt av behandling med et tverrbindingsmiddel utvalgt blant glutaraldehyd, glyoksal og formaldehyd.

Fremstilling av 6-aminopenicillansyre omfatter å behandle benzylpenicillin eller fenoksymetylpenicillin eller et salt derav i vandig løsning ved pH 6,0-9,0 med et vann-uoppløselig enzympreparat i henhold til oppfinnelsen.

Acylase-enzymet for anvendelse i forbindelse med oppfinnelsen oppnås fortrinnsvis av slike bakterier som stammer av *Escherichia coli*, når det anvendes for fremstilling av 6-APA fra benzylpenicillin; eller for eksempel fra sopper og actinomyceter når fenoksymetylpenicillin anvendes som utgangsmateriale.

Enzymaktiviteten av deacylase-enzymet bestemmes passende i forhold til dets evne til å produsere 6-APA fra benzylpenicillin. Således er aktiviteten for deacylase-enzymene her registrert som mengden av 6-APA (gitt i mikromol,  $\mu\text{mol}$ ) produsert fra en løsning av benzylpenicillin ved pH 7,8 og 37°C pr. minutt og pr. milligram proteininnhold i enzymet, idet proteininnholdet er analysert ved standardmetoden til Lowry. Enzymaktiviteten til enzympreparatene i henhold til oppfinnelsen bestemmes likeledes på basis av mengden av 6-APA (i  $\mu\text{mol}$ ) produsert fra benzylpenicillin ved pH 7,8 og 37°C pr. minutt, men på basis av vekten av enzympreparatet i gram.

Det er funnet at både effektiviteten av adsorpsjons-tverrbindings-reaksjonen og den spesifikke aktivitet til det dannede vann-uløselige enzympreparat forbedres etter hvert som renheten til enzymet som innledningsvis anvendes, øker. Imidlertid, utover en viss renhet avtar de forbedringer som er oppnådd for en gitt økning i renhet, markert, og det er således en økonomisk grense for den ønskelige renhet av enzymet. Således ligger aktiviteten til deacylase-enzymet vanligvis i området 0,15-50  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteininnhold og gjerne i området 1,5-30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

Det kan således være ønskelig å forbedre renheten til enzymet før adsorpsjon og tverrbinding. Dette kan oppnås ved oppvarming av enzymløsningen ved ca. 50°C i et kort tidsrom, f.eks. ca. 30 minutter og/eller ved ultrafiltrering. Andre konvensjonelle metoder for enzymrensning, f.eks. fraksjonell utfelling eller behandling med ionebyttecelluloser eller "Sephadex", kan også anvendes.

Bæreren for den aktuelle bruk er kopolymerer av metakrylsyre og divinylbenzen. De inneholder derfor frie karboksylgrupper som gir polymeren syrefunksjon. Makroporøse kopolymerer foretrekkes.

Metakrylsyrepolymerene må være vann-uløselige og er derfor i form av tverrbundne kopolymerer av metakrylsyre med divinylbenzen. En fordel ved foreliggende oppfinnelse er at den tillater bruk av polymerbærere som allerede er kommersielle produkter for andre formål, spesielt som kationebytteharpike av svakt sur natur. Spesielt egnet er den metakrylsyre/divinylbenzenkopolymer som selges under handelsbetegnelsen "Amberlite" IRC-50.

Polymerbærerne for den aktuelle bruk er fortrinnsvis i form av findelte partikler eller perler med en slik partikkelstørrelse at de vil passere en 10 A.S.T.M.-sikt, dvs. med partikeldiameter under 2,0 mm. Imidlertid må det resulterende



enzympreparat ikke være så findelt at det ikke kan separeres fra reaksjonsblandingen ved en filtreringsprosess eller anvendes i en kolonnereaktor. Således må polymeren ha en partikkelstørrelse i overkant av 0,01 mm, dvs. at den i alt vesentlig tilbakeholdes på en 800 A.S.T.M.-sikt. Det spesifikke valg av partikkelstørrelse innen dette område vil være avhengig av typen reaktorsystem som anvendes.

Acylase-enzymet som skal bringes i kontakt med polymeren, bør være en vandig løsning og være blitt dialysert inntil dets ioneledningsevne er blitt senket fra den vanlige verdi på 5-10 m.mhos til innen området 0,1-5 m.mhos, fortrinnsvis ca. 1 m.mhos. pH-verdien til enzymløsningen bør være mellom 4,5 og 7,0, og det kan være nødvendig å gjøre noen empiriske forsøk for å bestemme den optimale pH-verdi innen dette område hvis man skal kunne oppnå maksimal adsorpsjon og bevart enzymaktivitet. Imidlertid er denne optimale verdi vanligvis mellom pH 5,2 og 6,5. Polymeren bør bringes i kontakt med enzymløsningen i et tilstrekkelig langt tidsrom til å sikre maksimal enzymadsorpsjon. Denne oppholdstid er vanligvis mellom 2 og 16 timer.

Etter sin adsorpsjon på bærerens tverrbindes enzymet in situ ved behandling med et tverrbindingsmiddel utvalgt blant glutaraldehyd, glyoksal og formaldehyd. Anvendelsen av glutaraldehyd eller glyoksal foretrekkes, idet glutaraldehyd spesielt resulterer i enzympreparater med de mest fordelaktige egenskaper når de anvendes ved produksjon av 6-APA. Tverrbindingsmidlet anvendes normalt i vandig løsning ved en konsentrasjon mellom 0,1 og 15 vekt%, fortrinnsvis 0,5-5,0 vekt%.

Etter fullføring av tverrbindingsreaksjonen er det ønskelig å sikre at noe av tverrbindingsmidlet som ikke har reagert, fjernes eller gjøres uskadelig. Eksempelvis kan overskuddet av midlet fjernes ved vasking med vann eller med en løsning av en aminforbindelse, og urinstoff har vist seg å være meget effektivt for dette formål.

Før anvendelse i produksjonen av 6-APA bør pH-verdien til enzympreparatet justeres omhyggelig til den verdi som skal anvendes i produksjonsprosessen, vanligvis ved tilsetning av alkali ved slutten av tverrbindingsreaksjonen. En slik pH-verdi er i området 6,0-9,0, men er vanligvis mellom pH 7,0 og 8,5, og en pH-verdi på 7,8 foretrekkes. For en slik anvendelse bringes enzympreparatet i henhold til oppfinnelsen i kontakt med en vandig

løsning av benzylpenicillin eller fenoksymetylpenicillin eller av et salt derav, idet en slik løsning har den ønskede pH-verdi. Reaksjonstemperaturen holdes vanligvis i området 30-50°C, fortrinnsvis 37°C. Under reaksjonen frigjøres fenyleddiksyre fra benzylpenicillin og fenoksyeddiksyre fra fenoksymetylpenicillin, og denne syren nøytraliseres kontinuerlig eller periodevis for regulering av reaksjonsblandingens pH-verdi innen det ønskede område. Som angitt ovenfor, viser valget av alkali for denne nøytralisering seg ikke å være kritisk. Derfor anvendes oftest natriumhydroksydløsning, selv om en flyktig aminbase, f.eks. ammoniakk eller trietylamin, kan brukes om så ønskes.

De vann-uløselige enzympreparater i henhold til oppfinnelsen er ofte tilstrekkelig stabile, både mekanisk og biologisk, til at de kan anvendes for å mulig-gjøre minst 40 suksessive spaltninger av penicillin i en batch-reaktor.

Oppfinnelsen skal illustreres ved hjelp av eksempler, i hvilke det ble anvendt et delvis rensset preparat av acylase-enzym som var fremstilt ved frigjøring av enzymet fra cellene fra en acylaseproduserende stamme av *Escherichia coli* NClB 8734 ad mekanisk vei i en homogenisator.

Cellesedimenter ble deretter fjernet ved filtrering etter justering til pH 5,0, og enzymløsningen ble rensset ytterligere etter behov for frembringelse av det ønskede område av spesifikk aktivitet (dvs. 1,5-30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein). Enzymløsningen ble deretter dialysert til den hadde en ledningsevne på tilnærmet 1 m.mho.

#### Eksempel 1

Alikvoter (20, 25 eller 50 g) av kommersielt tilgjengelige kationiske og anioniske ionebytteharpikser, som angitt nedenunder, ble suspendert i destillert vann (ca. 100-500 ml) og justert til pH-verdier mellom 4,4 og 6,3 for de kationiske harpiksers vedkommende og til pH-verdier mellom 6,5 og 9,0 for de anioniske harpiksers vedkommende, ved tilsetning av natriumhydroksyd eller saltsyre under kraftig omrøring. Harpiksene ble gjenvunnet ved filtrering, godt vasket med destillert vann og ble igjen suspendert i en løsning av delvis rensset penicillin-acylase (60-100, 250 eller 500 ml; spesifikk aktivitet: 3,85-6,75  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein; ledningsevne: <1 m.mho) justert til den rette pH-verdi. Mengden av enzym som behandles med harpiksen, ble variert mellom 71 og 308  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  harpiks. Enzymet ble tillatt

å adsorbere under forsiktig omrøring i ca. 16 timer, idet pH-verdien ble opprettholdt ved tilsetning av en innstilt oppløsning. Harpiksene ble gjenvunnet ved filtrering, resuspendert i en løsning av glutaraldehyd i vann (100 ml, 0,825-3,3 vekt/volum%) og ble tillatt å reagere i ca. 16 timer, idet pH-verdien ble opprettholdt ved tilsetning av en innstilt oppløsning. De resulterende enzym-harpikspreparater ble gjenvunnet, vasket 3 ganger med destillert vann, resuspendert i vann eller 0,2m fosfat-puffer pH 7,8 og justert til pH 7,8, behandlet i 1 time med en vandig oppløsning av urinstoff (100 ml, 0,1m, pH 7,8) og endelig vasket 3 ganger med destillert vann.

Hvert enzympreparat som var fremstilt på denne måte, ble anvendt for fremstilling av 6-APA ut fra benzylpenicillin under standardbetingelser ved pH 7,8 og 37°C. Aktivitetene til enzympreparatene er gjengitt i tabell I. Aktivitetene refererer til preparater som er fremstilt ved den optimale pH-verdi for enzymadsorpsjon og fastholdt enzym-aktivitet.

"Bio-Rex"- og "Chelex"-harpiksene er kommersielle produkter fra Bio-Rad Laboratories, California, U.S.A., "Lewatit"-harpiksene er kommersielle produkter fra Bayer A.G., B.R.D., "Zeokarb"- og "Zerolit"-harpiksene er kommersielle produkter fra The Permutit Co. Ltd. og "Amberlite"-harpiksene er kommersielle produkter fra Rohm & Haas, Philadelphia, U.S.A. Fordelene ved enzympreparatet ifølge oppfinnelsen, hvor bæreren er en kopolymer av metakrylsyre, fremgår av tabell I (forsøk o).

TABELL I

Forsøk	Type grunnmasse og funksjonelle grupper i harpiksen	Harpiks	Harpiksens fysiske form	Spesifikk aktivitet av enzym-harpiks preparat ved optimal pH	
				$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ fuktig vekt	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tørr vekt
a	Styren-kvaternært ammonium	"Amberlite" IRA-938	Makroporøs	10,4	32,4
b	Styren-kvaternært ammonium	"Amberlite" IRA-401	Gel	0	0
c	Akrylat-kvaternært ammonium	"Amberlite" IRA-458	Gel	4,71	10,1
d	Styren-polyamin	"Lewatit" MP62	Makroporøs	15,1	30,7 <sub>0</sub>
e	Styren-polyamin	"Amberlite" IR-45	Gel	2,3	5,8
f	Akrylat-polyamin	"Amberlite" IRA-68	Gel	0	0
g	Styren-SO <sub>3</sub> H	"Lewatit" SPL20	Makroporøs	19,3	39,2
h	Styren-SO <sub>3</sub> H	"Lewatit" S100	Gel	0	0
i	Styren-SO <sub>3</sub> H	"Zerolit" 325	Gel	0	0
j	Styren-SO <sub>3</sub> H	"Amberlite" IR-120	Gel	0	0
k	Fenol-formaldehyd-SO <sub>3</sub> H	"Bio-Rex" 40	Gel	4,01	8,3

TABELL I

144637

Forsøk	Type grunnmasse og funksjonelle grupper i harpiksen	Harpiks	Harpiksens fysiske form	Spesifikk aktivitet av enzym-harpikspreparat ved optimal pH
				$\mu\text{mol/min/g fuktig vekt}$ $\mu\text{mol/min/g tørr vekt}$
l	Styren-SO <sub>3</sub> H	"Bio-Rad" AG/MP/50	Makroporøs	9,9      19,8
m	Styren-PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	"Bio-Rex" 63	Gel	0
n	Styren - CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> -COOH) <sub>2</sub>	"Chelex" 100	Gel	7,16      30,1 $\Delta$
o	Metakrylat-COOH	"Amberlite" IRC-50	Makroporøs	37,0      88,8
p	Akrylat-COOH	"Amberlite" IRC-72	Makroporøs	ca. 8,0      ca. 24,0 $\Delta$
q	Akrylat-COOH	"Amberlite" IRC-84	Gel	7,0      13,9°
r	Akrylat-COOH	"Zerolit" 236	Gel	ca. 8,0      ca. 17,1 $\Delta$
s	+ $\Delta$ -COOH	"Lewatit" CNP-80	Makroporøs	15,2      36,5
t	+ $\Delta$ -COOH	"Lewatit" CNP	Makroporøs	0      0
u	Fenol-formaldehyd-OH-COOH	"Zerolit" 216	Gel	0      0
v	Metakrylat-COOH $\Delta$ -SO <sub>3</sub> H	"Zeokarb" 227	Gel	25,9      57,0

TABELL I

## Fotnoter:

- 1\ Resultatene var meget variable, og de angitte verdier er gjennomsnitt av flere målinger.
- 2\ Polymerstrukturen er ikke kjent.
- 3\ Harpiksen er ikke kommersielt tilgjengelig.
- 4\ Maskestørrelse 100-200, kfr. 14,50 for andre harpikser.

Harpiksene a - c er sterkt anioniske.

Harpiksene d - f er svakt anioniske.

Harpiksene g - l er sterkt kationiske.

Harpiksene o - u er svakt kationiske.

Eksempler 2 - 5

Disse eksempler illustrerer effekten av å variere renheten til acylase-enzymet under adsorpsjonstrinnet. Den anvendte fremgangsmåte var som beskrevet i eksempel 1. Enzymet ble adsorbent ved pH 5,7, og enzym-harpikspreparatet ble behandlet med 3,3 vekt/volum% glutaraldehyd. Den anvendte harpiks var "Amberlite" IRC-50, som var vasket med alkali og deretter med syre. De spesifikke aktivitetene for enzympreparatene som var oppnådd på denne måte, er som angitt i tabell II nedenunder. Resultatene i tabell II indikerer at økning av renheten til utgangsenzymet innen dette område øker den spesifikke aktivitet for enzympreparatet.

144637

TABELL II

<u>Eksempel</u>	<u>Spesifikk aktivitet for</u> <u>utgangsenzymet</u>	<u>Enzym-aktivitet</u> <u>anvendt</u>	<u>Spesifikk aktivitet for</u> <u>enzym-harpiksen</u>
	<u>μmol/min/mg protein</u>	<u>μmol/min/g harpiks</u>	<u>μmol/min/g fuktig vekt</u>
2	4,64	216	38,1
3	7,87	463	72,0
4	20,5	1160	124,0
5	18,2	586	109,0

Eksempler 6 - 15

Betydningen av pH-verdien ved hvilken enzymet ble adsorbent på harpiksen, ble vist i disse eksempler, hvor:

- (a) Fem alikvoter av "Amberlite" IRC-50-harpiks (50 g) ble justert til henholdsvis pH 4,9, 5,1, 5,3, 5,5 og 5,7, tørket og deretter ble hver av dem tilsatt til en løsning av delvis rensset penicillin-acylase (95 ml; aktivitet: 60,9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , 16,8 mg protein/ml; ledningsevne: 0,55 m.mhos; laget istand til et sluttvolum på 200 ml). Etter adsorpsjon i 16 timer ved den aktuelle pH-verdi ble enzympreparatet behandlet på den måte som er beskrevet i eksempel 1; eller
- (b) fem ytterligere alikvoter av den samme harpiks ble behandlet på samme måte med unntagelse av at adsorpsjonsprosessen ble utført i pH-området 5,7-6,5. Enzymet som ble anvendt for disse harpikser, hadde følgende karakteristika: (105 ml; aktivitet: 54,7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ; 9,03 mg protein/ml; ledningsevne: 0,75 m.mhos).

Resultatene fra disse forsøk er gjengitt i tabell III nedenunder. Disse resultater viser at den optimale pH-verdi for adsorpsjonstrinnet er fra 5,2 til 5,8.

TABELL III

<u>Eksempel</u>	<u>pH</u>	<u>Spesifikk aktivitet for</u> <u>enzympreparatet</u> <u><math>\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}</math> fuktig vekt</u>
6	4,9	30,2
7	5,1	21,2
8	5,3	40,8
9	5,5	49,0
10	5,7	57,2
11	5,7	44,4
12	5,9	13,0
13	6,1	8,4
14	6,3	5,6
15	6,5	5,6



Eksempler 16 og 17

Disse eksempler viser effekten av å anvende den samme harpiks, men med forskjellig partikkelstørrelse. Således ble det anvendt en kromatografikvalitet av harpiksen "Amberlite" IRC-50, dvs. "Amberlite" CG-50 Type I med en partikkelstørrelse som passerte en 100 A.S.T.M.-sikt, men ble holdt tilbake på en 200 A.S.T.M.-sikt (dvs. en partikkelstørrelse på 0,074-0,149 mm).

En alikvot (15 g) av harpiks ble tillatt å adsorbere enzym (200 ml, 23,7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ; 3,86  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) ved pH 6,3 i 3 timer. Enzympreparatet ble gjenvunnet, behandlet med glutaraldehyd (200 ml, 0,825 vekt/volum%) i 16 timer og gjenvunnet og vasket som beskrevet i eksempel 1. Produktet (21 g) hadde en aktivitet på 114,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  fuktig vekt, og denne verdi må sammenlignes med den som er angitt i eksempel 2, hvor "Amberlite" IRC-50 ble anvendt med en partikkelstørrelse som passerte en 14 A.S.T.M.-sikt, men ble holdt tilbake på en 50 A.S.T.M.-sikt (dvs. med en partikkelstørrelsesdiameter på 0,297-1,41 mm). Dette viser at det oppnås forbedrede resultater når harpiksen har den minste størrelse.

Forsøket ble gjentatt under anvendelse av en farmasøytisk kvalitet av "Amberlite", nemlig "Amberlite" IRP-64 med en partikkelstørrelse som passerte en 100 A.S.T.M.-sikt, men ble holdt tilbake på en 500 A.S.T.M.-sikt, dvs. en partikkelstørrelse på <0,037-0,149 mm i diameter. Harpiksen ble tillatt å adsorbere enzym (3920  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  harpiks; spesifikk aktivitet: 17,4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) ved pH 6,3. Enzympreparatet ble så omsatt med glutaraldehyd (3,3 vekt/volum%) og behandlet som beskrevet i eksempel 1. Det resulterende enzym-harpikspreparat hadde en spesifikk aktivitet på 478,4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  fuktig vekt.

Eksempel 18

pH-verdien til "Amberlite" IRC-50-harpiks ble justert til 5,5 enten ved vasking med 0,2M fosfatpuffer med den angitte pH-verdi eller ved oppslemming i destillert vann og tilsetning av natriumhydroksydløsning. Harpiksen ble så ytterligere vasket med destillert vann til det ikke var noen forandring i ledningsevnen til vannet.

Den fuktige harpiks (100 g) ble tilsatt til penicillinacylasen med aktivitet 5,25  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein i 500 ml 0,02M fosfatpuffer med pH 5,5 og omrørt i 20 timer ved romtemperatur. Det faste stoff ble gjenvunnet ved filtrering, resuspendert i

500 ml 0,25 vekt/volum% glutaraldehyd oppløst i fosfatløsningen og omrørt i ytterligere 20 timer ved romtemperatur. Det resulterende enzympreparat ble så gjenvunnet ved filtrering og vasket med 0,2m fosfatpufferløsning med pH 7,8 inntil harpiksen ble brakt i likevekt ved denne pH-verdi.

Det således fremstilte enzympreparat (15 g) ble så anvendt for spaltning av 200 ml av en 6,25 vekt/volum% vandig løsning av benzylpenicillin, 0,02m fosfatpuffer ved pH 7,8 i 2 timer ved 37°C. Det viste seg at enzympreparatet lett kunne gjenvinnes for anvendelse på ny og at dets mekaniske og biologiske stabilitet ble bevart slik at preparatet kunne brukes om igjen minst 25 ganger.

#### Eksempel 19

Dette eksempel viser anvendelsen av et enzympreparat i henhold til oppfinnelsen i en produksjon av 6-APA i stor skala, samt den enestående gjenanvendbarhet av **preparatet** under disse betingelser.

Det ble fremstilt et enzympreparat under anvendelse av "Amberlite" IRC-50. Det hadde en aktivitet på 26,3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  og ble anvendt for spaltning av 40 liter benzylpenicillinløsning med konsentrasjon 6,5 vekt/volum% tillaget i 0,02m fosfatpuffer. Enzympreparatet ble holdt i karet ved hjelp av en trådduk. Således ble løsningen av 6-APA produkt filtrert fra da reaksjonen var ferdig, preparatet ble vasket med vann og en reaksjon til ble satt i gang. Den gjennomsnittlige effektivitet for omdannelsen til 6-APA av 50 suksessive, fornyede anvendelser, hver av 6 timers varighet, var 95%.

#### Eksempel 20

Dette eksempel viser den mekaniske stabilitet til et enzympreparat i henhold til oppfinnelsen, fremstilt og beskrevet i eksempel 1, ut fra harpiksen "Amberlite" IRC-50, sammenlignet med et som ble fremstilt på lignende måte, men ut fra en polymerbærer : med nøytral aktivitet, nemlig harpiksen "XAD-7" som er en tverrbundet akrylatester som er kommersielt tilgjengelig fra Rohm & Haas Corp. U.S.A.

Prøver av hvert enzympreparat (1,6 kg) ble suspendert i 8 liter 0,2m fosfatpuffer ved pH 7,8 og 37°C, og hver blanding ble omrørt i 72 timer ved 200 o.p.m. i en "New Brunswick Magnaferm" fermentator med ledeplater. Det ble tatt prøver med 4 timers intervaller, og disse ble visuelt undersøkt med hensyn

på nedbrytning av harpikspesler. Nedbrytning av "XAD-7"-perlene var avgjort større enn for "IRC-50"-perlene, slik at en prøve av sistnevnte etter 64 timer lignet en prøve av "XAD-7"-harpiksen tatt etter 8 timer. Disse resultater viste tydelig "IRC-50"-harpiksens større mekaniske styrke.

#### Eksempel 21

Enzympreparat med "Amberlite" IRC-50 som bærer (235 g, 39,4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ), fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ble anvendt for spaltning av 6,25 vekt/volum% kalium-benzylpenicillin G i en serie på 10 på hverandre følgende forsøk. Hvert forsøk ble utført med 1 liter kalium-benzylpenicillin G i 2,5 timer ved 37°C og pH 7,8. "Amberlite" IRC-50-harpiksen ble fjernet ved filtrering etter hvert forsøk og vasket med destillert vann. Filtratet og vaskevannene ble konsentrert ved roterende vakuum-inndampning, konsentratet ble blandet med like volumdelar metylisobutylketon, avkjølt til 4-10°C og endelig surgjort for utfelling av 6-aminopenicillansyre. 6-aminopenicillansyren ble vasket med litt destillert vann, skyllet med aceton og ovnstørket. Det gjennomsnittlige vektutbytte av 6-aminopenicillansyre fra de 10 forsøk var 91,3%.

#### Eksempel 22 (Sammenligning)

##### Adsorpsjon av acylase-enzym på uretanbelagt polyetylen

LD-polyetylenpartikler (<400  $\mu\text{m}$ ) ble belagt med en uretanpolymer ("Urithane" 641W. Cray Valley Products Limited) og fikk tørke i 10 dager. Materialet ble deretter vasket i 1 time med 20 volum% vandig aceton, skyllet ekstra godt med destillert vann, og alikvoter på 5 g ble tillatt å adsorbere enzym (125 ml, 54,0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , 3,80  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) i 5 timer i området pH 4,8-9,0. De uretanbelagte partikler ble fjernet ved filtrering, behandlet med glutaraldehyd (75 ml, 3,3 vekt/volum%) i 3 timer og deretter brakt i likevekt til pH 7,8 som beskrevet i eksempel 1.

Til tross for at de uretanbelagte partikler i gjennomsnitt har mindre størrelse enn "IRC-50", var de oppnådde spesifikke aktiviteter 2 - 3 ganger mindre enn dem som ble oppnådd under anvendelse av "IRC-50".

<u>pH</u>	<u>Akt. fuktig vekt</u> <u>μmol/min/g</u>
4,8	11,3
5,2	14,0
5,6	16,4
6,0	13,2
6,4	13,6
7,0	12,3
7,5	7,8
8,0	10,0
8,5	9,0
9,0	12,2

Eksempel 23 (Sammenligning)

Adsorpsjon av acylase-enzym på nylon

"Orgolacq" (pulverisert nylon 6, diameter  $< 30\mu\text{m}$ , Ato Chimie (U.K.) Limited) ble vasket i 1 time med 65 vekt/volum% maursyre og deretter skyllet ekstra godt med destillert vann. Alikvoter (10 g) ble tillatt å adsorbere enzym (100 ml, 50,9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ , 4,7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) i 16 timer i pH-området 4,8-9,0. Det pulveriserte nylon ble fjernet ved filtrering, behandlet med glutaraldehyd (100 ml, 3,3 vekt/volum%) i 3 timer og gjenvunnet og vasket som beskrevet i eksempel 1. Den høyeste aktivitet som ble oppnådd (pH 4,8) var 41,7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  fuktig vekt som var sammenlignbar med et typisk preparat av "IRC-50". Når det imidlertid tas hensyn til forskjellen i partikkelstørrelse for nylonet og "IRC-50", viste "IRC-50" seg å være langt overlegen. Således kunne "IRP 64" (farmasøytisk kvalitet "IRC-50", partikkelstørrelse 0,037-0,149 mm) kobles med acylase og gi preparater med spesifikk aktivitet 478  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  fuktig vekt, mer enn 11 ganger større enn nylonpreparatene.

144637

20

<u>pH</u>	<u>Akt. fuktig vekt</u> <u>μmol/min/g</u>
4,8	41,7
5,2	36,1
5,6	26,9
6,0	22,2
6,4	15,7
7,0	17,6
7,5	17,6
8,0	21,3
8,5	15,7
9,0	9,3

Eksempel 24 (Sammenligning)(a) Kobling

Et enzympreparat ble fremstilt i overensstemmelse med eksempel 4 i henhold til BRD-off.skrift nr. 2 215 687 på følgende måte:

100 g polymer fremstilt i overensstemmelse med eksempel 4a i off.skriftet ble tilsatt til penicillinacylase-enzym-løsning (5 l total aktivitet  $4,992 \times 10^6$  enheter), og blandingen ble omrørt i 20 timer. pH-verdien ble holdt på 6,3 ved tilsetning av natriumhydroksyd. Enzym/polymerpreparatet ble utvunnet ved filtrering og vasket med 0,05M fosfatpuffer pH 7,5 inneholdende 1M natriumklorid (5 l) og til slutt med 0,05M fosfatpuffer pH 7,5 (5 l). Den spesifikke aktivitet for det endelige produkt var 291 000 enheter/g.

Et annet enzym/polymerpreparat ble fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse på følgende måte:

200 g "Amberlite" IRC-50 ble tilsatt til en løsning av penicillinacylase-enzym (3 l, total aktivitet  $2,995 \times 10^6$  enheter) og blandingen ble omrørt i 18 timer ved pH 5,7 som ble opprettholdt ved tilsetning av 1,0M natriumhydroksyd. Enzym/polymerpreparatet ble utvunnet ved filtrering og tilsatt til en 1,25 vekt/vol.% løsning av glutaraldehyd og omrørt i 3 timer. Det tverrbundne enzym/polymerpreparat ble utvunnet ved filtrering og vasket med destillert vann (3 x 2 l) og resuspendert i 0,25M fosfatpuffer pH 7,8, og suspensjonen ble justert tilbake til pH 7,8 ved tilsetning av 1M natriumhydroksydløsning. Det tverrbundne enzym/polymerpreparat ble igjen utvunnet ved filtrering og vasket med destillert vann. Den spesifikke aktivitet for produktet var

307 000 enheter/g.

(b) 6-APA-fremstilling

Til en løsning av 6,25 vekt/vol.% benzylpenicillin (1 liter) ved 37°C og pufret til pH 7,8 i et glasskar utstyrt med en varme/kjølekappe og en padlerør av rustfritt stål ble tilsatt en mengde av enzym/polymerpreparat som hadde en aktivitet på  $50 \times 10^6$  enheter. Blandingen fikk reagere i 2,5 timer. Under reaksjonsperioden ble væskens pH-verdi holdt på 7,8 ved tilsetning av 10 % natriumhydroksyd-løsning, og preparatet ble deretter fjernet ved filtrering og filtratet vasket med vann. Aktiviteten til enzym/polymerpreparatet ble så vurdert under anvendelse av paradimetylaminobenzaldehyd-metoden (PDAB), og preparatet ble tilsatt til en ytterligere mengde av penicillin G-løsning for gjentakelse av prosessen.

RESULTATER

a) Enzympreparat fremstilt  
i henhold til teknikkens stand

<u>Forsøk nr.</u>	<u>Aktivitet Enheter/g</u>	<u>Aktivitet % av startaktivitet</u>
0	291 000	100,0
1	309 000	106,2
2	265 000	91,1
3	226 000	77,7
4	182 000	62,5
5	159 000	54,6
6	102 000	35,1
7	102 000	35,1
8	87 000	29,9
9	100 000	34,4
10	87 000	29,9
11	98 000	33,7
12	84 000	28,9
13	84 000	28,9
14	84 000	28,9
15	82 000	28,2
16	87 000	29,9
17	87 000	29,9
18	85 000	29,2
19	87 000	29,9
20	87 000	29,9

b) IRC-preparat fremstilt  
i henhold til foreliggende oppfinnelse

Forsøk nr.	Aktivitet Enheter/g	Aktivitet % av startaktivitet
0	307 000	100,0
1	305 000	99,3
2	299 000	97,4
3	291 000	94,8
4	298 000	97,1
5	295 000	96,1
6	288 000	93,8
7	309 000	100,7
8	293 000	95,4
9	293 000	95,4
10	296 000	96,4
11	285 000	92,8
12	294 000	95,8
13	280 000	91,2
14	292 000	95,1
15	271 000	88,3
16	271 000	88,3
17	266 000	86,6
18	293 000	95,4
19	289 000	94,1
20	274 000	89,3

P a t e n t k r a v

Vann-uoppløselig penicillinacylasepreparat for anvendelse ved deacylering av penicilliner til 6-aminopenicillansyre, bestående av et penicillinacylase-enzym som er adsorbent på en vann-uoppløselig polymerbærer og tverrbundet med glutaraldehyd, glyoksal eller formaldehyd, karakterisert ved at polymerbæreren er en vann-uoppløselig makroporøs kopolymer av metakrylsyre og divinylbenzen, idet kopolymeren er til stede i form av findelte partikler eller små kuler med partikkelstørrelse i området 2,0-0,01 mm.