

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1007076

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1007076

22 Ingediend: 19.09.97

51 Int.Cl.⁶
C07D499/18, C07D501/12,
C12P37/04, C12P35/04

41 Ingeschreven:
22.03.99

47 Dagtekening:
22.03.99

45 Uitgegeven:
01.06.99 I.E. 99/06

73 Octrooihouder(s):
DSM N.V. te Heerlen.

72 Uitvinder(s):
Harold Monro Moody te Maastricht
Wilhelmus Hubertus Joseph Boesten te Sittard
Hubertus Maria Jozef Grooten te Stein

74 Gemachtigde:
Drs. W.C.R. Hoogstraten c.s. te 6160 MA
Geleen.

54 **Werkwijze voor de winning van een β -lactam antibioticum.**

57 Werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum uit een mengsel dat het β -lactam antibioticum en D-fenyglycine (FG) in oplossing bevat, waarbij het mengsel bij een temperatuur tussen -5 en 20° en bij een concentratie zodanig dat FG in oplossing blijft, op een pH tussen 3 en 8 wordt gebracht, het verkregen vaste β -lactam antibioticum wordt gewonnen en de resterende vloeistof wordt onderworpen aan een temperatuurverhoging tot een temperatuur tussen 10 en 60°C waarbij vast FG ontstaat, FG als vaste stof wordt afgescheiden, en de moederloog althans ten dele wordt gerecirculeerd. Bij voorkeur wordt een uitgangsmengsel toegepast dat in hoofdzaak β -lactam antibioticum en FG bevat, afkomstig uit een enzymatische acyleringsreactie waarbij de overeenkomstige β -lactamkern, in het bijzonder 6-aminopenicillaanzuur, 7-aminodesacetoxycefalosporaanzuur, en 7-amino-3-chloor-cef-3-em-4-carbonzuur, wordt geacyleerd met een D-fenyglycine derivaat.

NL C 1007076

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

WERKWIJZE VOOR DE WINNING VAN EEN β -LACTAM ANTIBIOTICUM

5

De uitvinding betreft een werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum uit een mengsel dat in hoofdzaak β -lactam antibioticum en D-fenylglycine (FG) in
10 oplossing bevat, waarbij het mengsel bij een temperatuur tussen -5 en 20°C en bij een concentratie zodanig dat FG in oplossing blijft, op een pH tussen 3 en 8 wordt gebracht, het verkregen vaste β -lactam antibioticum wordt gewonnen en de resterende vloeistof wordt onderworpen aan een
15 temperatuurverhoging tot een temperatuur tussen 10 en 60°C , waarbij vast FG ontstaat, FG als vaste stof wordt afgescheiden, en de moederloog wordt gerecirculeerd.

Bij de bereiding van β -lactam antibiotica waarbij een β -lactamkern wordt geacyleerd met een D-
20 fenylglycinederivaat, is de winning van het β -lactam antibioticum en de opwerking van het reactiemengsel in het algemeen moeilijk. Vaak gaat de opwerking met aanzienlijke verliezen van waardevolle componenten, in het bijzonder het β -lactam antibioticum, gepaard, deels als
25 oplosbaarheidsverliezen en deels als gevolg van afbraak vanwege de beperkte stabiliteit van β -lactam antibiotica.

De uitvinding voorziet nu in een nieuw concept voor de winning van β -lactam antibiotica waarbij in een eenvoudige, op industriële schaal toepasbare, werkwijze de
30 verliezen aan β -lactam antibioticum sterk worden beperkt en tevens waardevol D-fenylglycine wordt teruggewonnen. De uitvinding is gebaseerd op het feit dat gebleken is dat bij relatief lage temperatuur FG in sterke oververzadiging aanwezig kan zijn in de oplossing die FG en het antibioticum
35 bevat, en dat ook lang kan blijven zonder dat FG neerslaat of uitkristalliseert. Bijgevolg is het mogelijk om het β -lactam antibioticum bij lage temperatuur selectief te winnen door

het af te scheiden na kristallisatie met behulp van een pH-shift waarbij FG niet uitkristalliseert. Verder is gebleken dat door de temperatuur van de moederloog te verhogen FG snel uitkristalliseert terwijl het β -lactam antibioticum niet
5 uitkristalliseert. Op deze wijze kan selectief FG worden gewonnen. Op bovengenoemde wijze kan een volledige scheiding tussen β -lactam antibioticum en FG bewerkstelligd worden.

Tijdens de acyleringsreactie van de β -lactamkern met een geschikt acyleringsmiddel, in het bijzonder een
10 enzymatische acyleringsreactie met bijvoorbeeld een amide van D-fenylglycine, bijvoorbeeld D-fenylglycineamide (FGA) of een ester van D-fenylglycine, bijvoorbeeld de methylester van D-fenylglycine (FGM), vindt hydrolyse van het acyleringsmiddel en het β -lactam antibioticum plaats, waarbij D-fenylglycine
15 (FG) ontstaat.

De mengsels die na een acyleringsreactie worden verkregen kunnen naast het β -lactam antibioticum en FG bijvoorbeeld ook nog niet omgezette β -lactamkern en/of acyleringsmiddel, bijvoorbeeld FGA of FGM, bevatten. Gebleken
20 is dat de exacte samenstelling van de mengsels die kunnen worden toegepast in de werkwijze volgens de uitvinding niet bijzonder kritisch is. Mengsels die geschikt in de werkwijze volgens de uitvinding kunnen worden ingezet zijn bij voorkeur mengsels die 10-1500 mM, in het bijzonder 50-1000 mM, β -
25 lactam antibioticum; 0-1500 mM, in het bijzonder 0-1000 mM FG; 0-1000 mM, in het bijzonder 0-200 mM β -lactamkern en 0-1000 mM in het bijzonder 0-400 mM D-fenylglycinederivaat bevatten.

Het mengsel van β -lactam antibioticum en FG wordt
30 op een zodanige concentratie en pH gebracht dat alle componenten in het bijzonder genoemde componenten in oplossing zijn. De pH wordt daartoe bij voorkeur laag gekozen, bijvoorbeeld tussen 0 en 3, in het bijzonder tussen 0,3 en 2. Wanneer het proces op grote schaal wordt

uitgevoerd, wordt bij voorkeur gekozen voor een min of meer continue opwerking. Door het oplossen continu te bedrijven wordt de verblijftijd bij relatief hoge of lage pH verkort. Desgewenst kunnen nog eventueel aanwezige vaste componenten
5 worden afgescheiden bijvoorbeeld door filtratie of ultrafiltratie.

Volgens de uitvinding wordt het mengsel, dat eventueel wel nog vast β -lactam antibioticum mag bevatten, eerst op een pH tussen 3 en 8, bij voorkeur tussen 5,5 en 8,
10 in het bijzonder tussen 6,5 en 7,5 gebracht, waarbij ervoor gezorgd wordt, bijvoorbeeld door toevoegen van water, dat de concentratie van de reactiecomponenten, in het bijzonder FG, zodanig is dat zij, eventueel met uitzondering van het β -lactam antibioticum, al dan niet oververzadigd in oplossing
15 blijven. De temperatuur ligt tussen -5 en 20°C , bij voorkeur tussen -3 en 15°C , in het bijzonder tussen 0 en 10°C . De temperatuur wordt relatief laag gehouden omdat verrassenderwijze is gebleken dat het onder deze condities mogelijk is een sterke oververzadiging van FG te realiseren,
20 zonder dat FG neerslaat.

Verder is gebleken dat bij temperatuursverhoging van de na de afscheiding van het β -lactam antibioticum resterende moederloog FG snel kristalliseert in de vorm van grote, gemakkelijk filtreerbare kristallen. De temperatuur
25 wordt daarbij verhoogd tot een waarde tussen 10 en 60°C , bij voorkeur tot een waarde tussen 12 en 50°C , in het bijzonder tussen 15 en 40°C waarbij de pH van het mengsel in principe mag variëren in het gebied tussen 3 en 8. De pH ligt bij voorkeur tussen 5,5 en 8, in het bijzonder tussen 6,5 en 7,5.

30 Doordat FG is uitgekristalliseerd is de concentratie zodanig verlaagd dat de na de FG-kristallisatie en afscheiding resterende moederloog na afkoeling althans gedeeltelijk kan worden gerecirculeerd bijvoorbeeld naar het oplosvat waaraan tevens vers mengsel van β -lactam

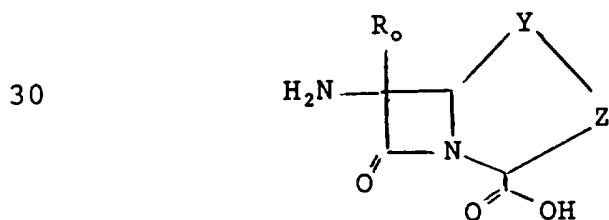
antibioticum en FG wordt toegevoegd. Bij voorkeur vindt deze recirculatie plaats met een zodanige snelheid dat FG zowel in het oplosvat in oplossing blijft, als in het β -lactam antibioticum kristallisatievat oververzadigd aanwezig blijft.

5 Doordat de FG-moederloog althans gedeeltelijk kan worden hergebruikt voor de β -lactam antibioticum kristallisatie, kunnen de oplosbaarheidsverliezen op een laag niveau gehouden worden. Vanwege de gunstige procescondities zijn tevens de afbraakverliezen relatief laag.

10 Bij voorkeur wordt de werkwijze continu uitgevoerd, waarbij steeds vers mengsel van β -lactam antibioticum en FG wordt toegevoegd en steeds een klein deel van bijvoorbeeld de FG-kristallisatie moederloog wordt gespuid. Bij voorkeur wordt de flow van de spuiroom zodanig gekozen dat het
15 volume van de processtroom op de diverse punten in het proces in de loop van de tijd constant blijft. In een continu proces kan in principe een kleinere spuiroom worden gerealiseerd. Ter illustratie is een mogelijke procesopstelling weergegeven in figuur 1.

20 De werkwijze volgens de uitvinding kan geschikt worden toegepast bij de bereiding van β -lactam antibiotica die een fenylglycine-zijstaart hebben, bijvoorbeeld cefalexine, ampicilline, cefaclor, pivampicilline, bacampicilline, talampicilline en cefaloglycine.

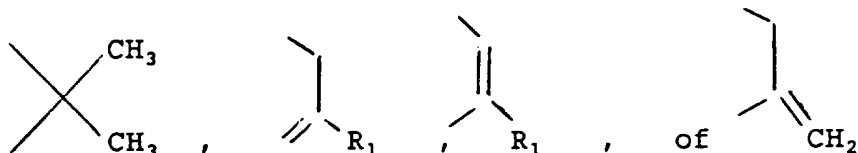
25 In principe kan elke β -lactamkern worden toegepast; in het bijzonder een β -lactamkern met de algemene formule (1)



waarin R_o staat voor H of een alkoxygroep met 1-3 C-atomen; Y

staat voor CH_2 , O, S of een geoxideerde vorm van zwavel; en Z staat voor

5



10

waarin R_1 bijvoorbeeld staat voor H, OH, halogeen, een alkoxygroep met 1-5 C-atomen, een alkylgroep met 1-5 C-atomen, een cycloalkylgroep met 4-8 C-atomen, een aryl of een heteroarylgroep met 6-10 C-atomen, waarbij de groepen eventueel gesubstitueerd kunnen zijn bijvoorbeeld met een alkyl-, een aryl-, een carboxy- of een alkoxygroep met 1-8 C-atomen; en waarin de carbonzuurgroep desgewenst een ester-
15
10
15
20
25
30
35

geschikte voorbeelden van β -lactamkernen die kunnen worden toegepast in de werkwijze volgens de uitvinding zijn penicillinederivaten, bijvoorbeeld 6-aminopenicillinaanzuur (6-APA), en cefalosporine-derivaten, bijvoorbeeld een 7-aminocefalosporaanzuur al of niet met een substituent op de 3-plaats, bijvoorbeeld 7-aminocefalosporaanzuur (7-ACA), 7-aminodesacetoxycefalosporaanzuur (7-ADCA) en 7-amino-3-chloor-cef-3-em-4-carbonzuur (7-ACCA).

Als enzym kan daarbij in principe elk enzym worden toegepast dat geschikt is als katalysator in de koppelingsreactie. Dergelijke enzymen zijn bijvoorbeeld de enzymen die bekend zijn onder de algemene aanduiding penicilline amidase of penicilline acylase. Dergelijke enzymen zijn bijvoorbeeld beschreven in J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry, Augustus 1989 p. 146-154 en in J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry International, Juni 1990, p. 97-103. Voorbeelden van geschikte enzymen zijn

enzymen afgeleid van Acetobacter, in het bijzonder Acetobacter pasteurianum, Aeromonas, Alcaligenes, in het bijzonder Alcaligenes faecalis, Aphanocladium, Bacillus sp., in het bijzonder Bacillus megaterium, Cephalosporium,
5 Escherichia, in het bijzonder Escherichia coli, Flavobacterium, Fusarium, in het bijzonder Fusarium oxysporum en Fusarium Solani, Kluyvera, Mycoplasma, Protaminobacter, Proteus, in het bijzonder Proteus rettgeri, Pseudomonas en Xanthomonas, in het bijzonder Xanthomonas citrii.

10 Bij voorkeur wordt een geïmmobiliseerd enzym toegepast, aangezien het enzym dan eenvoudig afgescheiden en hergebruikt kan worden. Een geschikte immobilisatietechnologie is bijvoorbeeld beschreven in EP-A-222462. Een andere geschikte technologie wordt gevormd door
15 het Penicilline G acylase te immobiliseren op een drager die een gelerend agens, bijvoorbeeld gelatine, en een polymeer met vrije aminogroepen, bijvoorbeeld alginaat amine, chitosan of polyethyleenimine bevat. Daarnaast kunnen enzymen ook als kristallijne stof worden ingezet (Clecs).

20 Van de geïmmobiliseerde enzymen die commercieel verkrijgbaar zijn, zijn bijvoorbeeld bijzonder geschikt gebleken het Escherichia coli enzym van Boehringer Mannheim GmbH dat onder de naam Enzygel® commercieel verkrijgbaar is, het geïmmobiliseerde Penicilline-G acylase van Recordati en
25 het geïmmobiliseerde Penicilline-G acylase van Pharma Biotechnology Hannover.

In de (enzymatische) acyleringsreactie kunnen als acyleringsmiddel bijvoorbeeld D-fenylglycine in geactiveerde vorm bij voorkeur een (primaire, secundaire of tertiaire) amide
30 of zout daarvan, of een lager alkyl (1-4C) ester, bijvoorbeeld een methylester worden toegepast.

De temperatuur waarbij de enzymatische acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal lager dan 40°C, bij voorkeur tussen -5 en 35°C. De pH waarbij de

enzymatische acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal tussen 5,5 en 9,5, bij voorkeur tussen 6,0 en 9,0.

Bij voorkeur wordt de reactie vrijwel volledig gestopt wanneer nagenoeg de maximale conversie is bereikt.

- 5 Een geschikte uitvoeringsvorm om de reactie te stoppen is het verlagen van de pH, bij voorkeur tot een waarde tussen 4,0 en 6,3, in het bijzonder tussen 4,5 en 5,7. Een andere geschikte uitvoeringsvorm is het verlagen van de temperatuur van het reactiemengsel zodra de maximale conversie is bereikt. Ook
10 een combinatie van beide uitvoeringsvormen is mogelijk.

- Nadat de reactie vrijwel gestopt is bij het bereiken van maximale conversie, is het reactiemengsel meestal aanwezig in de vorm van een suspensie die meerdere vaste stoffen, bijvoorbeeld het antibioticum, D-fenylglycine
15 en eventueel geïmmobiliseerd enzym bevat. Het geïmmobiliseerde enzym wordt, vanwege de proceseconomie, bij voorkeur teruggewonnen. Dit kan bijvoorbeeld geschikt worden uitgevoerd door het reactiemengsel roerend te filteren over een zeef, waarbij bij voorkeur de draairichting van de
20 roerder zodanig wordt gekozen dat de suspensie in het centrum van de roerder omhooggepompt wordt. Vervolgens kunnen waardevolle componenten, bijvoorbeeld het antibioticum en FG, worden gewonnen met de werkwijze volgens de uitvinding waarbij eerst de vaste componenten, eventueel afgezien van
25 vast antibioticum, in oplossing worden gebracht, bijvoorbeeld met behulp van een pH-shift.

- Een pH-verlaging kan in het kader van de uitvinding bijvoorbeeld worden bewerkstelligd, door toevoegen van een zuur aan het mengsel. Geschikte zuren zijn bijvoorbeeld
30 minerale zuren, in het bijzonder zwavelzuur, zoutzuur of salpeterzuur. Bij voorkeur wordt zoutzuur toegepast. Een pH-verhoging kan bijvoorbeeld worden bewerkstelligd door toevoegen van een base aan het mengsel. Geschikte basen zijn bijvoorbeeld anorganische basen, in het bijzonder ammonia,

kaliloog of natronloog. Bij voorkeur wordt ammonia toegepast.

De enzymatische acyleringsreactie en de opwerking van het reactiemengsel worden in de praktijk meestal uitgevoerd in water. Desgewenst kan het reactiemengsel ook
5 een organisch oplosmiddel of een mengsel van organische oplosmiddelen bevatten, bij voorkeur minder dan 30 vol.%. Voorbeelden van organische oplosmiddelen die kunnen worden toegepast zijn alcoholen met 1-7 C-atomen, bijvoorbeeld een monoalcohol, in het bijzonder methanol of ethanol; een diol,
10 in het bijzonder ethyleenglycol of een triol, in het bijzonder glycerol.

De werkwijze volgens de uitvinding is in het bijzonder geschikt om te worden toegepast in de opwerking van het reactiemengsel dat wordt verkregen na de enzymatische
15 acyleringsreactie waarin 6-APA wordt geacyleerd met een amide van D-fenylglycine, bijvoorbeeld FGA, of een ester van D-fenylglycine, bijvoorbeeld FGM.

In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt er hierbij voor gezorgd dat de concentratie 6-APA in opgeloste vorm
20 aanwezig in het reactiemengsel, relatief laag wordt gehouden, waardoor een hogere conversie kan worden bereikt, dan wanneer de concentratie opgelost 6-APA zo hoog mogelijk werd gekozen. Bovendien is gebleken dat de roerbaarheid van het reactiemengsel aanzienlijk beter is wanneer de concentratie
25 opgelost 6-APA laag wordt gehouden.

Onder conversie wordt in dit kader verstaan de molaire verhouding gevormd ampicilline tot ingezette hoeveelheid 6-APA. De concentratie opgelost 6-APA wordt
uitgedrukt als de hoeveelheid 6-APA in molen per kg
30 reactiemengsel; de totale concentratie, opgelost en niet opgelost, 6-APA en ampicilline wordt uitgedrukt als de hoeveelheid 6-APA plus ampicilline in molen per kg totaal reactiemengsel; het totale reactiemengsel kan naast de oplossing een aantal vaste stoffen bevatten, bijvoorbeeld 6-

APA, ampicilline, fenylglycine en geïmmobiliseerd enzym.

De molaire verhouding acyleringsmiddel tot 6-APA, d.w.z. de totale hoeveelheid toegevoegd fenylglycinederivaat gedeeld door de totale hoeveelheid toegevoegd 6-APA
5 uitgedrukt in molen, is bij voorkeur kleiner dan 2,5. Bij voorkeur ligt de molaire verhouding tussen 1,0 en 2,0, in het bijzonder tussen 1,2 en 1,8.

De enzymatische acyleringsreactie wordt bij voorkeur als batch proces uitgevoerd. Desgewenst is het ook
10 mogelijk om de reactie continu uit te voeren, waarbij in line de concentratie opgelost 6-APA wordt geregeld.

De totale concentratie 6-APA plus ampicilline (in opgeloste en in onopgeloste vorm) in het reactiemengsel wordt bij voorkeur hoger dan 250 mM, met meer voorkeur hoger dan
15 300 mM, in het bijzonder hoger dan 350 mM gekozen.

De concentratie van opgelost 6-APA wordt in deze voorkeursvorm gedurende de bereiding van ampicilline in essentie lager dan 300 mM, bij voorkeur lager dan 250 mM gehouden. Bij hogere concentratie van het acyleringsmiddel
20 kan eventueel een hogere concentratie opgelost 6-APA, worden gekozen dan bij lagere concentratie. Bij een hogere concentratie van het acyleringsmiddel is de reactiesnelheid namelijk hoger, waardoor 6-APA slechts relatief kort in hoge concentratie in opgeloste vorm aanwezig is.

De concentratie 6-APA in opgeloste vorm in het reactiemengsel aanwezig, kan op diverse manieren laag worden gehouden. Een mogelijkheid om de concentratie opgelost 6-APA laag te houden is, slechts een deel van de totale hoeveelheid 6-APA voorleggen en de rest doseren tijdens de reactie. Een
25 nadeel hiervan is echter dat 6-APA dan als vaste stof moet worden gedoseerd hetgeen praktische bezwaren oplevert. Bij voorkeur wordt dan ook de totale hoeveelheid 6-APA in een batch proces voorgelegd aan het begin van de reactie, waarna gedurende de enzymatische acyleringsreactie de concentratie
30

6-APA in het reactiemengsel zal afnemen en de concentratie
ampicilline zal toenemen. Een geschikte methode om toch een
lage concentratie opgelost 6-APA te bereiken is bijvoorbeeld
door de pH op een lagere waarde te houden vergeleken met de
5 pH-waarde waarbij een maximale oplosbaarheid van de
reactanten wordt bereikt. Een bijzonder geschikte methode om
de 6-APA concentratie in opgeloste vorm laag te houden is
bijvoorbeeld door ervoor te zorgen dat de concentratie van
het fenylglycinederivaat laag wordt gehouden, bijvoorbeeld
10 door het fenylglycinederivaat gedeeltelijk in de loop van de
reactie te doseren.

Gebleken is namelijk dat wanneer de
fenylglycinederivaat-concentratie laag wordt gehouden, er
weinig 6-APA in oplossing gaat, zodat door dosering van het
15 fenylglycinederivaat, de concentratie 6-APA in oplossing kan
worden geregeld.

Een bijzonder geschikte uitvoeringsvorm wordt
verkregen wanneer FGA wordt toegevoegd in de vorm van een
zout ervan, bij voorkeur het zout van FGA en een mineraal
20 zuur, bijvoorbeeld FGA.HCl, FGA.1/2H₂SO₄ en FGA.HNO₃. Op deze
wijze is het namelijk eenvoudig mogelijk om via het constant
houden van de pH een optimale dosering van het FGA te
bewerkstelligen. Bij voorkeur wordt FGA.1/2H₂SO₄ toegepast
omdat dit zout een zeer hoge oplosbaarheid heeft.

25 In het kader van deze uitvinding kunnen de
verschillende componenten in de vrije vorm of als zouten in
het reactiemengsel aanwezig zijn. Met de genoemde pH-waarde
wordt steeds de pH-waarde gemeten bij kamertemperatuur
bedoeld.

30 De uitvinding zal verder worden toegelicht aan de
hand van de voorbeelden, zonder evenwel daartoe te worden
beperkt.

Afkortingen:

AMPI = ampicilline

AMPI.3H₂O = ampicilline-trihydraat

6-APA = 6-amino-penicillaanzuur

FGA = D-fenylglycineamide

5 FG = D-fenylglycine

FGHM = D-p-hydroxyfenylglycine methylester

AssemblaseTM is een geïmmobiliseerde Escherichia coli penicilline acylase uit E. coli ATCC 1105, zoals beschreven in WO-A-97/04086. De immobilisatie is uitgevoerd als beschreven in EP-A-222462, waarbij gelatine en chitosan als gellerend agens en glutaaraldehyde als crosslinker zijn gebruikt.

De uiteindelijke activiteit van de Escherichia coli penicilline acylase wordt bepaald door de hoeveelheid enzym die aan de geactiveerde bolletjes is toegevoegd en bedroeg 3 ASU/g drooggewicht waarbij 1 ASU (Amoxicilline Synthese Unit) is gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die per uur 1 g Amoxicilline.3H₂O genereert uit 6-APA en FGHM (bij 20°C; 6,5% 6-APA en 6,5% FGHM).

20

Voorbeeld I

Bereiding van FGA.1/2H₂SO₄ oplossing.

301,6 g FGA (2,00 mol) werd gesuspenderd in 650 g water bij T = 5°C. Onder roeren werd in 1 uur 102,1 g 96% H₂SO₄ (1,00 mol) toegedruppeld, waarbij de temperatuur door middel van koelen op T < 25°C werd gehouden.

25

Voorbeeld II

Enzymatische synthese van ampicilline.

30 Een enzymreactor (1,5 l, diameter 11 cm), voorzien van een zeefbodem met 175 µm gaas, werd gevuld met 300 g netto-nat assemblaseTM (de term netto-nat verwijst naar de massa van het enzym dat verkregen wordt nadat het enzym met een glasfilter is afgescheiden uit een enzymslurry).

Een aanmaakreactor (1,2 l) werd gevuld met 131,6 g 6-APA (0,600 mol), 30,2 g FGA (0,200 mol) en 400 ml water ($T = 10^{\circ}\text{C}$). Dit mengsel werd 15 minuten geroerd bij $T = 10^{\circ}\text{C}$ en vervolgens op $t = 0$ met behulp van 100 ml water ($T = 10^{\circ}\text{C}$) in de enzymreactor overgebracht.

Op $t = 0$ werd de roerder in de enzymreactor aangezet. De temperatuur werd steeds op 10°C gehouden. Gedurende 233 minuten werd 423,7 g (0,800 mol) $\text{FGA} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4$ oplossing met constante snelheid toegevoegd. De pH was ca. 6,3. Vanaf $t = 295$ minuten werd de pH op 6,3 gehouden door middel van titratie met 6N H_2SO_4 . Op $t = 570$ minuten was de hoeveelheid AMPI maximaal en werd de pH verlaagd naar 4,7 door middel van toevoegen van 6N H_2SO_4 . De enzymreactor bevatte nu:

575 mmol AMPI
15 mmol 6-APA
50 mmol FGA
365 mmol FG

20 Voorbeeld III

Afscheiden van de AMPI/FG slurry uit de enzymreactor.

Met behulp van geroerde filtratie werd de AMPI/FG slurry, bereid zoals beschreven in voorbeeld II, via de zeefbodem verwijderd uit de enzymreactor. Hierbij werd een schuine-blad-roerder gebruikt, welke 0,5 cm boven het zeef was geplaatst. Er werd omhoog geroerd met ca. 500 rpm. De uit de reactor afgescheiden AMPI/FG slurry werd over een G3-glasfilter gefiltreerd. De AMPI/FG wetcake werd apart gehouden en de moederloog werd teruggevoerd naar de enzymreactor, waarna de geroerde filtratie, gevolgd door de G3-filtratie van de volgende AMPI/FG slurry, werd hervat. Op deze wijze werd de enzymreactor net zo lang gewassen met de AMPI/FG moederloog totdat er geen vaste stof meer uit de reactor werd gespoeld. De laatste, bij de G3-filtratie,

opgevangen moederloog werd gecombineerd met de AMPI/FG wetcake tot een AMPI/FG slurry.

De zo verkregen AMPI/FG slurry bevatte > 99,0% van de totaal in de enzymreactor geproduceerde AMPI en > 95,5% van de totaal in de enzymreactor geproduceerde FG. Het AssemblaseTM bevond zich na deze geroerde filtratie voor > 99,5% in de enzymreactor.

Voorbeeld IV

10 Ampicilline-omkristallisatie.

De omkristallisatie werd uitgevoerd in een opstelling (zie figuur 1) die bestond uit achtereenvolgens: een voorraadvat (2 l), een pomp, een oplosvat (0,05 l), een filter voorzien van een Seitz-filterplaat, een pomp, een AMPI
15 kristallisatievat (0,5 l), twee parallel geschakelde glasfilters 1A en 1B, een pomp, een warmtewisselaar, een FG-kristallisatievat (0,5 l), twee parallel geschakelde glasfilters 2A en 2B, een pomp en tenslotte een warmtewisselaar, welke weer verbonden was met het oplosvat.
20 De leiding tussen filters 2A en 2B en het oplosvat bevatte een driewegkraan via welke een gedeelte van de stroom gespuid kon worden. Alle vaten waren voorzien van een roerder, een thermometer en een pH elektrode.

De AMPI/FG slurry, welke was geïsoleerd zoals beschreven in voorbeeld III, werd kwantitatief overgebracht naar het voorraadvat, en al roerende afgekoeld naar 2°C.

De omkristallisatieloop (oplosvat tot en met warmtewisselaar) werd gevuld met in totaal ca. 1350 gram startoplossing, welke bestond uit een waterige oplossing van
30 0,6% AMPI en 0,6% FG. De omkristallisatieloop (behalve het FG kristallisatievat en glasfilters 2A en 2B) werd afgekoeld naar 1-2°C. Het FG kristallisatievat en de glasfilters 2A en 2B werden op 20°C gehouden.

De circulatie in de omkristallisatieloop werd

gestart (flow = 1,2 liter per uur). De pH in het oplosvat werd ingesteld op pH = 1,25 door middel van titratie met 8N HCl-oplossing. De pH in het AMPI-kristallisatievat werd ingesteld op pH = 6,5 door middel van titratie met 25 wt% NH₃ oplossing. In het AMPI kristallisatievat werd 13,0 gram AMPI.3H₂O als ent voorgelegd. In het FG kristallisatievat werd 10,0 gram FG-ent voorgelegd.

Op t=0 werd de omkristallisatie gestart door middel van het starten van de dosering van de AMPI/FG slurry uit het voorraadvat aan het oplosvat (flow = 0,14 liter per uur). De inhoud van het voorraadvat werd in ca. 8 uur toegevoegd aan het oplosvat. De niveaus in het oplosvat en de AMPI- en FG-kristallisatievaten bleven steeds constant. Dit werd bereikt door een deel van de FG moederloog niet te recirculeren naar het oplosvat, maar te spuien.

De AMPI slurry uit het AMPI kristallisatievat werd op glasfilter 1A voortdurend gefiltreerd terwijl de moederloog naar het FG-kristallisatievat werd gepompt. De FG-slurry uit het FG-kristallisatievat werd op glasfilter 2A gefiltreerd en de moederloog werd naar het oplosvat teruggepompt. De AMPI/FG slurry uit het voorraadvat en de FG moederloog werden in het oplosvat tijdens de hele proef in een verhouding 1 op 8,6 gemengd. Na ca. 8 uur was het voorraadvat leeg en was er in totaal 330 ml 8 N HCl oplossing aan het oplosvat gedoseerd.

Op t=8 uur werd het voorraadvat gevuld met een nieuwe AMPI/FG slurry, welke weer was geïsoleerd zoals beschreven in voorbeeld III. De AMPI afscheiding in de omkristallisatieloop werd omgeschakeld van glasfilter 1A naar 1B, en net zo werd de FG-afscheiding omgeschakeld van glasfilter 2A naar 2B.

De AMPI wetcake op glasfilter 1A werd gewassen met 2 x 175 ml water (T=5°C) en gedroogd. De FG wetcake op glasfilter 2A werd gewassen met 2 x 60 ml water en gedroogd.

De omkristallisatie werd continu bedreven door het voorraadvat elke 8 uur te vullen met AMPI/FG slurry en de glasfilters 1A en 1B, en 2A en 2B, beurtelings om te schakelen en te legen. De gemiddelde flow van de FG
5 moederloogspui was ca. 0,18 liter per uur.

De gemiddelde opbrengst per voorraadvat-vulling (600 mmol 6-APA gedoseerd aan de enzymreactor in voorbeeld II) bedroeg: 220 gram AMPI.3H₂O (exclusief AMPI-ent; 91% ten opzichte van 600 mM 6-APA) en 30 gram FG (exclusief FG-ent).

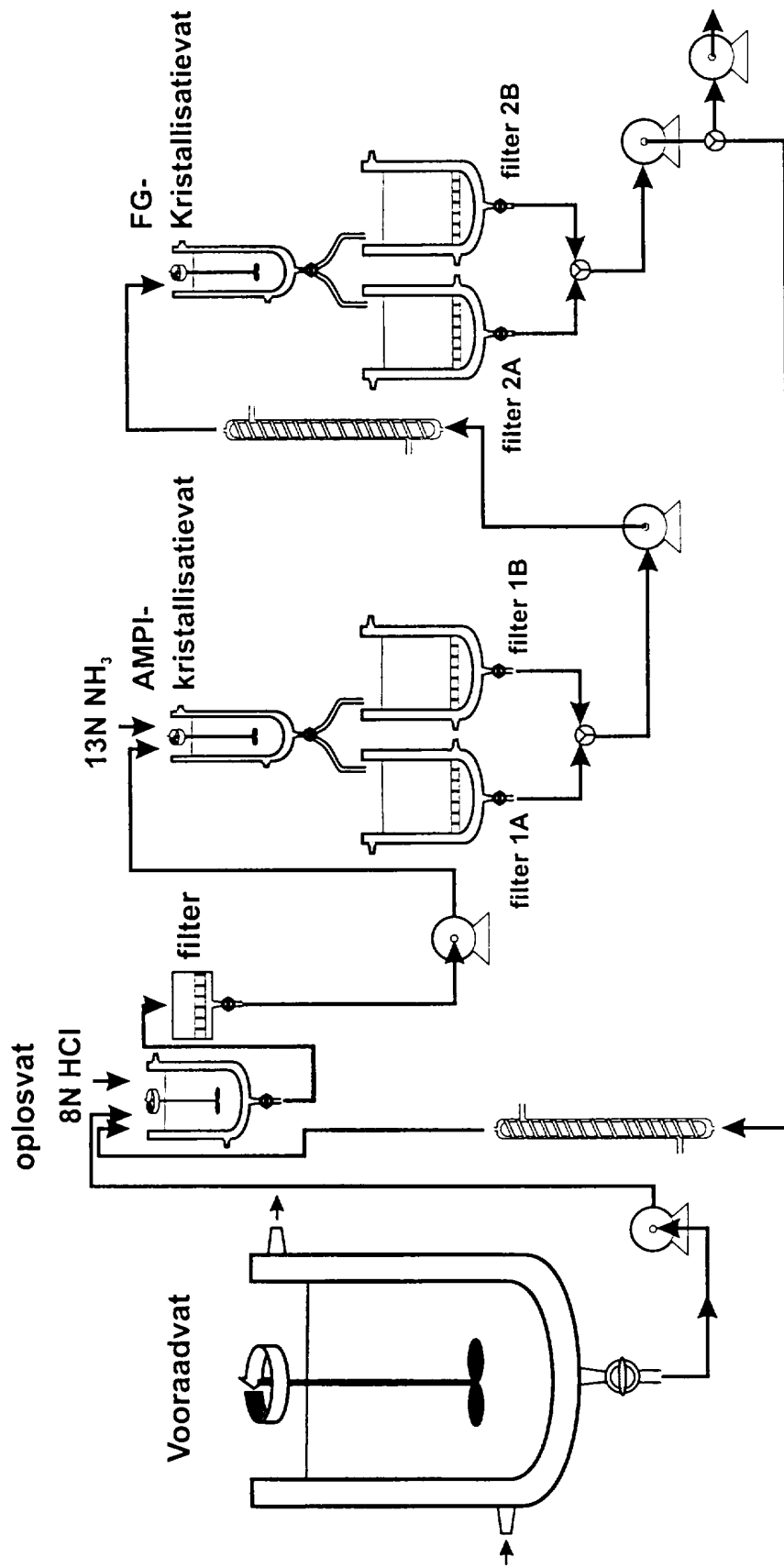
C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum uit een mengsel dat het β -lactam antibioticum en D-fenylglycine (FG) in oplossing bevat, waarbij het mengsel bij een temperatuur tussen -5 en 20°C en bij een concentratie zodanig dat FG in oplossing blijft, op een pH tussen 3 en 8 wordt gebracht, het verkregen vaste β -lactam antibioticum wordt gewonnen en de resterende vloeistof wordt onderworpen aan een temperatuursverhoging tot een temperatuur tussen 10 en 60°C waarbij vast FG ontstaat, FG als vaste stof wordt afgescheiden, en de moederloog althans ten dele wordt gerecirculeerd.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin de temperatuur van het mengsel ligt tussen -3 en 15°C .
3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarin de temperatuur van het mengsel ligt tussen 0 en 10°C .
4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3, waarin de temperatuursverhoging tot een waarde tussen 12 en 50°C wordt uitgevoerd.
5. Werkwijze volgens conclusie 4 waarin de temperatuursverhoging wordt uitgevoerd tot een waarde tussen 15 en 40°C .
6. Werkwijze volgens een der conclusies 1-5, waarin het mengsel op een pH tussen 4 en 7 wordt gebracht.
7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6, waarbij de moederloog wordt gerecirculeerd naar het mengsel dat het β -lactam antibioticum en FG in oplossing bevat.
8. Werkwijze volgens een der conclusies 1-7, met het kenmerk dat de werkwijze continu wordt uitgevoerd.
9. Werkwijze volgens een der conclusies 1-8, waarbij het uitgangsmengsel dat in hoofdzaak β -lactam antibioticum en FG bevat, afkomstig is uit een enzymatische acyleringsreactie waarbij de overeenkomstige β -

lactamkern wordt geacyleerd met een D-fenylglycine derivaat.

10. Werkwijze volgens conclusie 9 waarin het na de acyleringsreactie verkregen mengsel eerst wordt
5 onderworpen aan een pH verlaging tot een pH tussen 0 en 3.
11. Werkwijze volgens conclusie 10, waarin het mengsel wordt onderworpen aan een pH-verlaging tot een pH tussen 0,3 en 2.
- 10 12. Werkwijze volgens een der conclusies 1-11, waarin het mengsel 10-1500 mM β -lactam antibioticum, 0-1500 mM FG, 0-1000 mM D-fenylglycinederivaat en 0-1000 mM β -lactamkern bevat.
13. Werkwijze volgens een der conclusies 1-12 waarbij de β -
15 lactamkern 6-aminopenicillilaanzuur (6-APA) is en het β -lactam antibioticum ampicilline is.
14. Werkwijze volgens een der conclusies 1-12, waarbij de β -lactamkern 7-aminodesacetoxycefalosporaan-
15 zuur (7-ADCA) is en het β -lactam antibioticum cefalexine is.
- 20 15. Werkwijze volgens een der conclusies 1-12, waarbij de β -lactamkern 7-amino-3-chloor-cef-3-em-4-carbonzuur (7-ACCA) is en het β -lactam antibioticum cefaclor.
16. Werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum
zoals beschreven en toegelicht aan de hand van de
25 voorbeelden.

Figuur 1.



**SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE**

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde 9314 NL
Nederlandse aanvraag nr. 1007076	Indieningsdatum 19 september 1997
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) CHEMFERM V.o.F.	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type --	Door de instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 29944 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int.Cl.6: C 07 D 499/18, C 07 D 501/12, C 12 P 37/04, C 12 P 35/04	
II. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.Cl.6:	C 07 D, C 12 P, A 61 K
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. ☐ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1007076

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 C07D499/18 C07D501/12 C12P37/04 C12P35/04

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 6 C07D C12P A61K

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	WO 97 22610 A (CHEMFERM V.O.F.) 26 Juni 1997 zie bladzijde 3, regel 7 - bladzijde 4, regel 19; conclusies ---	1-16
A	WO 96 30376 A (CHEMFERM V.O.F.) 3 Oktober 1996 zie het gehele document ---	1-16
A	WO 96 23796 A (CHEMFERM V.O.F.) 8 Augustus 1996 zie het gehele document ---	1-16
A	WO 95 03420 A (DSM N.V.) 2 Februari 1995 zie het gehele document ---	1-16
	--- -/--	

☒ Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A document dat de algemene stand van de techniek **weergeeft**, maar niet beschouwd wordt als zijnde van **bijzonder belang**

E eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

L document dat het beroep op een recht van voorrang **aan twijfel** onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de **publicatiedatum** van een andere aanhaling vast te stellen of om een **andere reden** zoals aangegeven

O document dat betrekking heeft op een mondelinge **uitleg**, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

P document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

T later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

X document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

Y document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

Z document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

24 April 1998

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Chouly, J

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007076

C. (Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	US 5 034 522 A (F.G. SCHREIBER) 23 Juli 1991 zie conclusies -----	1-16

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1007076

In het rapport genoemd octrooigescrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 9722610 A	26-06-97	AU 7711496 A	14-07-97
WO 9630376 A	03-10-96	BE 1009264 A AU 4958296 A	07-01-97 16-10-96
WO 9623796 A	08-08-96	BE 1009071 A BE 1009194 A BE 1009263 A AU 4846196 A AU 4846296 A EP 0815256 A WO 9623897 A PL 321626 A	05-11-96 03-12-96 07-01-97 21-08-96 21-08-96 07-01-98 08-08-96 08-12-97
WO 9503420 A	02-02-95	BE 1007296 A AT 160589 T CN 1127531 A DE 69407049 D EP 0712443 A	09-05-95 15-12-97 24-07-96 08-01-98 22-05-96
US 5034522 A	23-07-91	GEEN	