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

(10) **DE 691 33 258 T2** 2004.03.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 550 450 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 33 258.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US91/05415**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 914 256.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/002617**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.07.1991**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.02.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.1993**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.03.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 11/00**
C12P 21/02

(30) Unionspriorität:
562280 **03.08.1990** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:
NAVIA, A., Manuel, Lexington, US; ST. CLAIR, L., Nancy, Charlestown, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON VERNETZTEN KRISTALLEN ALS NEUEM VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN**

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

Hintergrund der Erfindung

[0001] Enzyme werden als Industriekatalysatoren zur groß- und labortechnischen, wirtschaftlichen Herstellung von Fein- und Sonderchemikalien (Jones J. B., Tetrahedron 42 (1986), 3351–3403), zur Produktion von Nahrungsmitteln (Zaks et al., Trends in Biotechnology 6 (1988), 272–275) und als Hilfsmittel zur Synthese organischer Verbindungen (Wong C. -H., Science 244 (1989), 1145–1152; CHEMTRACTS – Org. Chem. 3 (1990), 91– 111; Klibanov A. M., Acc. Chem. Res. 23 (1990), 114–120) verwendet.

[0002] Die Produktion auf Enzymbasis kann die Schadstoffbelastung der Umwelt erheblich verringern, die mit der großtechnischen Erzeugung von sonst unbrauchbaren chemischen Zwischenprodukten verbunden ist, wie für die großtechnische Herstellung von Acrylamid unter Verwendung des Enzyms Nitrilhydratase gezeigt wurde (Nagasawa T. und Yamada H., Trends in Biotechnology 7 (1989), 153–158).

[0003] Enzyme werden auch in Biosensoranwendungen verwendet, um verschiedene Stoffe von klinischem, industriellem oder anderem Interesse nachzuweisen (Hall E., "Biosensors", Open University Press (1990)). Auf dem klinischen Gebiet können Enzyme in der extrakorporalen Therapie wie der Hämodialyse und Hämofiltration verwendet werden, wobei die Enzyme selektiv Ausscheidungsprodukte und toxische Materialien aus dem Blut entfernen (Klein M. und Langer R., Trends in Biotechnology 4 (1986), 179–185). Enzyme werden in diesen Bereichen verwendet, weil sie effizient als Katalysatoren für eine großen Bereich von Reaktionstypen bei geringen Temperaturen und mit Substratspezifität und Stereoselektivität wirksam sind. Dennoch gibt es Nachteile, die mit der Verwendung von löslichen Enzymkatalysatoren verbunden sind, die ihre Verwendung in chemischen Verfahren in der Industrie und im Labor begrenzt haben (Akiyama et al., CHEMTECH, 627–634 (1988)).

[0004] Enzyme sind teuer und relativ instabil, verglichen mit den meisten Industrie- und Laborkatalysatoren, auch wenn sie in wäßrigen Medien verwendet werden, in denen Enzyme normalerweise wirksam sind. Viele der wirtschaftlicheren chemischen Reaktionen von Interesse, die in der allgemeinen Praxis ausgeführt werden, sind mit wäßrigen Medien unverträglich, worin zum Beispiel Substrate und Produkte oft unlöslich oder instabil sind und worin eine Hydrolyse eine erhebliche Konkurrenz darstellen kann.

[0005] Zusätzlich macht die Rückgewinnung eines löslichen Enzymkatalysators aus dem Produkt und dem nicht umgesetzten Substrat in dem Ausgangsmaterial die Anwendung einer komplizierten und kostspieligen Trenntechnik erforderlich. Schließlich ist es schwer, Enzyme in einer Art und Weise zu lagern, die ihre Aktivität und funktionelle Integrität für kommerziell ausreichende Zeiträume (Monate bis Jahre) aufrechterhält, ohne Zuhilfenahme einer Kühlung (4°C bis –80°C bis zu Flüssigstickstoff-Temperaturen) oder die Aufrechterhaltung in wäßrigen Lösungsmitteln mit geeigneter(m) Ionenstärke, pH-Wert etc.

[0006] Enzymimmobilisierungsverfahren haben in vielen Fällen diese Nachteile umgangen. Die Immobilisierung kann die Stabilität von Enzymkatalysatoren verbessern und ihre funktionelle Integrität in den aggressiven Lösungsmittelumgebungen und bei den extremen Temperaturen schützen, die für chemische Verfahren in der Industrie und im Labor charakteristisch sind (Hartmeier W., Trends in Biotechnology 3 (1985), 149–153). Kontinuierliche Durchflußverfahren können mit immobilisierten Enzympartikeln in Säulen betrieben werden, zum Beispiel wo das lösliche Ausgangsmaterial über die Partikel fließt und allmählich in das Produkt umgewandelt wird. So wie hierin verwendet, verweist der Begriff Immobilisierung auf das Unlöslichmachen eines Enzymkatalysators durch Bindung an, Einkapselung von oder durch Aggregation zu makroskopischen (10^{-1} mm) Partikeln.

[0007] Eine Reihe von nützlichen Übersichtsartikeln von Enzymimmobilisierungsverfahren ist in der Literatur erschienen (Maugh T. H., Science 223 (1984), 474–476; Tramper J., Trends in Biotechnology 3 (1985), 45–50). Maugh beschreibt fünf allgemeine Ansätze zur Immobilisierung von Enzymen. Diese umfassen: Adsorption an feste Träger (wie Ionenaustauscherharze); kovalente Bindung an Träger (wie Ionenaustauscherharze, poröse Keramiken oder Glaskügelchen); Einschluß in polymere Gele; Verkapselung; und die Fällung löslicher Proteine durch deren Vernetzung mit bifunktionellen Reagenzien in einer zufälligen und undefinierten Art und Weise. EP-A-367302 (Soejima et al.) beschreibt eine wasserlösliche, vernetzte Achromobacter-Protease I zur Verwendung in einem Verfahren zur Halbsynthese von menschlichem Insulin. EP-A-341503 (Visuri) beschreibt eine wasserunlösliche Glucoseisomerase, die durch ein kristallines Enzym gebildet wird, das durch Vernetzung mit einem Dialdeyhd (Glutaraldehyd) in Gegenwart einer Verbindung, enthaltend eine Aminogruppe, in eine feste Form umgewandelt wird. Außerdem können ganze Zellen immobilisiert werden (üblicherweise abgetötet und permeabel gemacht), welche die gewünschte Enzymaktivität in hohen Spiegeln exprimierten (z. B. Nagasawa T. und Yamada H., Trends in Biotechnology 7 (1989), 153–158).

[0008] Jedes dieser Immobilisierungsverfahren weist seine Vorteile und Einschränkungen auf und keines kann als optimal oder überragend angesehen werden. Bei den meisten hiervon macht der Enzymkatalysator letztendlich nur eine kleine Fraktion des Gesamtvolumens des Material aus, das in dem Reaktor vorhanden ist. So besteht die Masse des immobilisierten Mediums aus einem inerten, aber oft kostspieligen Trägermaterial. Bei allen Verfahren pflegen die Immobilisierungswechselwirkungen der Enzymkatalysatormoleküle mitein-

ander und/oder mit dem Trägermaterial zufällig und unbestimmt zu sein. Obwohl diese Wechselwirkungen eine gewisse Stabilität auf die Enzymkatalysatormoleküle übertragen, ist die Stabilisierung als Ergebnis ihrer relativen Unspezifität und Unregelmäßigkeit suboptimal und ungleichmäßig. In den meisten Fällen bleibt der Zugang zu dem aktiven Zentrum des Enzymkatalysators schlecht definiert. Zusätzlich können die vorstehend beschriebenen Immobilisierungsverfahren nicht die Probleme lösen, die mit der Lagerung und Kühlung verbunden sind. Auch können herkömmlich immobilisierte Enzyme im allgemeinen nicht manipuliert werden, wie durch Überführung in ein anderes ausgewähltes Lösungsmittel, ohne daß ein Risiko für die strukturelle oder funktionelle Integrität des Enzyms besteht. In praktischer Hinsicht, bis auf die Bindung an das Trägerpartikel, haben herkömmlich immobilisierte Enzyme eine große Ähnlichkeit mit löslichen Enzymen und haben mit diesen die Anfälligkeit gegen eine Denaturierung und einen Funktionsverlust in aggressiven Umgebungen gemeinsam.

[0009] Im allgemeinen rufen Immobilisierungsverfahren eine Verringerung der beobachteten enzymkatalysierten Reaktionsgeschwindigkeiten im Verhältnis zu den in Lösung erhaltenen hervor. Dies ist meistens eine Folge der Einschränkung der Diffusion des Substrats nach innen und der Diffusion des Produkts nach außen innerhalb des immobilisierten Enzympartikels (Quiocho F. A. und Richards F. M., Biochemistry 5 (1967), 4062–4076). Die notwendige Anwesenheit eines inerten Trägers in den immobilisierten Enzympartikeln erhöht den mittleren freien Weg zwischen dem äußerlichen Lösungsmittel des immobilisierten Enzympartikels und dem aktiven Zentrum des Enzymkatalysators und verschlimmert somit die Diffusionsprobleme. Beim Umgang mit immobilisierten Zellen ist das Diffusionsproblem besonders schwerwiegend, selbst wenn die Zellwände und -membranen für das Substrat und das Produkt auf irgendeine Weise durchlässig gemacht werden. Ferner hätte man es mit der Vielzahl von kontaminierenden Enzymaktivitäten, Metaboliten und Toxinen zu tun, die in Zellen enthalten sind, sowie mit der Stabilität von Zellen in aggressiven Lösungsmitteln oder bei extremen Betriebstemperaturumgebungen. Eine verbesserte Immobilisierungstechnik, welche die Begrenzungen der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Verfahren umgeht, wäre bei der Förderung der Verwendung von Enzymen als Industriekatalysatoren nützlich, insbesondere da gezeigt wurde, daß sie im großtechnischen Maßstab nützlich sind (Daniels M. J., Methods in Enzymology 136 (1987), 371–379).

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung eines Enzyms durch Bildung von Kristallen des Enzyms und allgemeiner auch die Vernetzung der erhaltenen Kristalle unter Verwendung eines bifunktionellen Reagens; vernetzte immobilisierte Enzymkristalle (bezeichnet als CLECs oder CLIECs), die durch dieses Verfahren hergestellt werden; die Gefriertrocknung von CLECs als Mittel zur Verbesserung der Lagerungs-, Handhabungs- und Manipulationseigenschaften der immobilisierten Enzyme; und ein Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Produkts mit Hilfe einer Reaktion, die durch ein CLEC oder einen Satz von CLECs katalysiert wird.

[0011] In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden kleine (10^{-1} mm) Proteinkristalle aus wäßrigen Lösungen oder organische Lösungsmittel enthaltenden, wäßrigen Lösungen gezüchtet, in denen der Enzymkatalysator strukturell und funktionell stabil ist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Kristalle dann mit einem bifunktionellen Reagens wie Glutaraldehyd vernetzt. Diese Vernetzung resultiert in der Stabilisierung der Kristallgitterkontakte zwischen den einzelnen Enzymkatalysatormolekülen, die den Kristall ausmachen. Als Ergebnis dieser zusätzlichen Stabilisierung können die vernetzten immobilisierten Enzymkristalle bei erhöhten Temperaturen, extremen pH-Werten und in aggressiven wäßrigen, organischen oder nahezu wasserfreien Medien einschließlich Gemischen davon wirksam sein. Das bedeutet, daß ein erfindungsgemäßer CLEC in Umgebungen wirksam sein kann, die mit der funktionellen Integrität des entsprechenden nicht kristallisierten, unvernetzten, nativen Enzyms oder von herkömmlich immobilisierten Enzymkatalysatoren unverträglich sind.

[0012] Zusätzlich können die durch dieses Verfahren hergestellten CLECs einer Gefriertrocknung unterzogen werden, um einen gefriergetrockneten CLEC herzustellen, der in dieser gefriergetrockneten Form bei Temperaturen ohne Kühlung (Raumtemperatur) für längere Zeiträume gelagert werden kann und der ohne weiteres in ausgewählten wäßrigen, organischen oder gemischten wäßrigen-organischen Lösungsmitteln zubereitet werden kann, ohne die Bildung von amorphen Suspensionen und mit einem minimalen Risiko für eine Denaturierung.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft auch durch das vorliegende Verfahren hergestellte CLECs und deren Verwendung in der labor- und großtechnischen Herstellung von ausgewählten Materialien, wie chiralen organischen Molekülen, Peptiden, Kohlenhydraten, Lipiden und anderen chemischen Spezies. Gegenwärtig werden diese typischerweise durch herkömmliche chemische Verfahren hergestellt, die aggressive Bedingungen erfordern können (z. B. wäßrige, organische oder nahezu wasserfreie Lösungsmittel, wäßrige/organische Lösungsmittelgemische oder erhöhte Temperaturen), welche mit der funktionellen Integrität des nicht kristallisierten, unvernetzten, nativen Enzymkatalysators unverträglich sind. Andere Makromoleküle mit einer katalytischen Aktivität können in die vorgeschlagene CLEC-Technologie auch einbezogen werden. Diese könnten ka-

talytische Antikörper (Lerner R. A., Benkovic S. J. und Schultz P. G., Science 252 (1991), 659–667) und katalytische Polynucleotide (Cech T. R., Cell 64 (1991), 667–669; Celander D. W. und Cech T. R., Science 251 (1991), 401–407) einschließen.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines ausgewählten Produkts mit Hilfe einer Reaktion, die durch einen erfindungsgemäßen CLEC katalysiert wird.

[0015] In einem Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung wurde das Enzym Thermolysin, eine Zink-Metalloprotease, zur Synthese eines chiralen Dipeptidyl-Vorläufers des künstlichen Süßungsmittels Aspartam verwendet. Das Enzym Thermolysin wurde aus einer wäßrigen Ausgangslösung von 45% Dimethylsulfoxid und 55% 1,4 M Calciumacetat, 0,05 M Natriumcacodylat, pH 6,5, auskristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd vernetzt, um einen Thermolysin-CLEC zu bilden. Der Thermolysin-CLEC wurde dann aus der wäßrigen Kristallisationslösung, in der er hergestellt wurde, in eine Ethylacetatlösung überführt, welche die Substrate N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure (Z-L-Asp) und L-Phenylalaninmethylester (L-Phe-OMe) enthielt. Der Thermolysin-CLEC wurde dann zur Katalyse einer Kondensationsreaktion der zwei Substrate verwendet, um den N-(Benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalaninmethylester (Z-L-Asp-L-Phe-OMe) zu synthetisieren, welcher der Dipeptidyl-Vorläufer des künstlichen Süßungsmittels Aspartam ist. Unter Anwendung irgendeiner der vielen bekannten Techniken (vgl. z. B. Lindeberg G., J. Chem. Ed. 64 (1987), 1062–1064) kann die Schutzgruppe der L-Asparaginsäure in dem synthetisierten Dipeptidyl-Vorläufer entfernt werden, indem die Benzyloxycarbonyl (Z)-Gruppe abgespalten wird, um Aspartam (L-Asp-L-Phe-OMe) herzustellen.

[0016] In einem zweiten Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung wurde das Enzym Thermolysin zur Herstellung von Thermolysin-CLECs verwendet. Die Aktivität und Stabilität der Thermolysin-CLECs wurde mit derjenigen des löslichen Thermolysins unter optimalen Bedingungen und extremen pH- und Temperaturbedingungen, gefolgt von einer Inkubation in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln und gefolgt von einer Inkubation in Gegenwart einer exogenen Protease verglichen.

[0017] Das Enzym Thermolysin wurde aus einer Lösung von 1,2 M Calciumacetat und 30% Dimethylsulfoxid, pH 8,0, auskristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 12,5% vernetzt, um einen Thermolysin-CLEC zu bilden. Der Thermolysin-CLEC wurde dann durch ein Standardverfahren gefriergetrocknet (Cooper T. G., The Tools of Biochemistry, S. 379–380 (John Wiley and Sons, NY (1977)), um einen gefriergetrockneten Enzym-CLEC von Thermolysin zu bilden. Dieser gefriergetrocknete CLEC wurde dann direkt in die verschiedenen ausgewählten wäßrigen, organischen und gemischten wäßrigen/organischen Lösungsmittel überführt, ohne einen Lösungsmittelaustauschschritt dazwischen, ohne die Bildung von amorphen Suspensionen und mit einem minimalen Risiko für eine Denaturierung. Diese Lösungsmittel umfaßten Acetonitril, Dioxan, Aceton und Tetrahydrofuran, aber schließen andere nicht aus. Nach der Inkubation wurde die Aktivität durch Spaltung des Dipeptidsubstrats FAGLA (Furylacryloyl-glycyl-L-leucinamid) spektrophotometrisch untersucht.

[0018] In einem dritten Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung wurde das Enzym Elastase (aus der Bauchspeicheldrüse des Schweins) aus einer wäßrigen Lösung von 5,5 mg/ml Protein in 0,1 M Natriumacetat bei pH 5,0 bei Raumtemperatur auskristallisiert (Sawyer L. et al., J. Mol. Biol. 118, 137–208). Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 5% vernetzt, um einen Elastase-CLEC zu bilden. Der Elastase-CLEC wurde gefriergetrocknet, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0019] In einem vierten Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung und wie hierin offenbart wurde das Enzym Esterase (aus der Schweineleber) aus einer wäßrigen Lösung von 15 mg/ml Protein in 0,25 M Caliumacetat bei pH 5,6 bei Raumtemperatur auskristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 12,5% vernetzt, um einen Esterase-CLEC zu bilden. Der Esterase-CLEC wurde gefriergetrocknet, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0020] In einem fünften Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung und wie hierin offenbart wurde das Enzym Lipase (Geotrichum candidum) aus einer wäßrigen Lösung von 20 mg/ml Protein in 50 mM Tris bei pH 7 bei Raumtemperatur auskristallisiert. Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 12,5% vernetzt, um einen Lipase-CLEC zu bilden. Der Lipase-CLEC wurde gefriergetrocknet, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0021] In einem sechsten Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung wurde das Enzym Lysozym (Hühnereiweiß) aus einer wäßrigen Lösung von 40 mg/ml Protein in 40 mM Natriumacetatpuffer, enthaltend 5% Natriumchlorid, bei pH 7,4 bei Raumtemperatur auskristallisiert (Blake C. C. F. et al., Nature 196 (1962), 1173). Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 20% vernetzt, um einen Lysozym-CLEC zu bilden. Der Lysozym-CLEC wurde gefriergetrocknet, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0022] In einem siebten Beispiel für das Verfahren und die Durchführung der vorliegenden Erfindung wurde das Enzym Asparaginase (Escherichia coli) aus einer wäßrigen Lösung von 25 mg/ml Protein in 50 mM Natriumacetat und 33% Ethanol bei pH 5,0 bei 4°C auskristallisiert. Die Kristallisation ist eine Modifikation des Verfahrens, das durch Grabner et al. [US-Patent 3,664,926 (1972)] beschrieben wurde. Wie hierin offenbart, wur-

den die erhaltenen Kristalle mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 7,5% vernetzt, um einen Asparaginase-CLEC zu bilden. Der Asparaginase-CLEC wurde gefriergetrocknet, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0023] Andere Enzyme, die in einer ähnlichen Weise immobilisiert und zur Katalyse einer geeigneten Reaktion verwendet werden können, schließen Luciferase und Urease ein. Andere Enzyme, wie die in den Tabellen 1–5 aufgeführten, können auch unter Anwendung des vorliegenden Verfahrens kristallisiert und vernetzt werden, um einen gewünschten CLEC herzustellen, der wiederum verwendet werden kann zur Katalyse einer Reaktion, die in der Herstellung eines ausgewählten Produkts resultiert, oder zur Katalyse einer Reaktion, die einen Zwischenschritt (d. h. eine in einer Reihe von Reaktionen) bei der Herstellung eines ausgewählten Produkts darstellt. Es ist bekannt, daß, obwohl die Vernetzung zur Stabilisierung der Mehrheit der Kristalle beiträgt, dies weder notwendig noch in allen Fällen wünschenswert ist. Einige kristalline Enzyme behalten ihre funktionelle und strukturelle Integrität in aggressiven Umgebungen auch ohne eine Vernetzung bei. Obwohl der Kristall in der bevorzugten Ausführungsform vernetzt ist, ist eine Vernetzung nicht immer notwendig, um einen Enzymkristall herzustellen, welcher in dem vorliegenden Verfahren nützlich ist.

[0024] CLECs besitzen mehrere wichtige Eigenschaften, die wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Enzymimmobilisierungsverfahren bereitstellen, die gegenwärtig in Gebrauch sind. CLECs benötigen keine separate inerte Trägerstruktur. Das Fehlen eines inerten Trägers verbessert die Diffusionseigenschaften des Substrats und des Produkts innerhalb der CLECs und stellt Enzymkonzentrationen innerhalb des Kristalls bereit, die dem theoretischen Grenzwert für die Kugelpackung für Moleküle dieser Größe nahe kommen. Hohe Enzymkonzentrationen können eine erhebliche Betriebswirtschaftlichkeit durch die erhöhte effektive Aktivität eines bestimmten Volumens eines Katalysators, die Verringerung der Kontaktzeit des Substrats mit dem Enzym und die Gesamtabnahme der Anlagengröße und der Kapitalkosten zur Folge haben (Daniels M. J., Methods in Enzymol. 136 (1987), 371–379). Die Homogenität über das Kristallvolumen und die erhöhte Stabilität des Enzymbestandteils in den CLECs eröffnet neue Möglichkeiten für die Anwendung einer Enzymkatalyse unter aggressiven Bedingungen wie eine erhöhte Temperatur und wäßrige, organische oder nahezu wasserfreie Lösungsmittel sowie Gemische davon. Zusätzlich sollte der begrenzte Lösungsmittelzutritt und die regelmäßige Proteinumgebung, die mit einem Kristallgitter verbunden sind, eine verbesserte Metallionen- und Cofaktor-Retention für CLECs im Vergleich zu herkömmlich immobilisierten Enzymsystemen zur Folge haben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0025] **Abb.** 1 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität von löslichem Thermolysin und einem Thermolysin-CLEC.

[0026] **Abb.** 2 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse eines Vergleichs der pH-Abhängigkeiten von Thermolysin-CLEC und löslichem Thermolysin.

[0027] **Abb.** 3 ist eine graphische Darstellung der Messung der Aktivität von löslichem und kristallinem Thermolysin nach Inkubation bei 65°C.

[0028] **Abb.** 4 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der Beständigkeit von löslichem Thermolysin und einem Thermolysin-CLEC gegen einen exogenen proteolytischen Abbau.

[0029] **Abb.** 5 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität für lösliche Elastase und den entsprechenden Elastase-CLEC.

[0030] **Abb.** 6 ist eine graphische Darstellung der Beständigkeit von löslicher Elastase und dem entsprechenden Elastase-CLEC gegen einen exogenen proteolytischen Abbau.

[0031] **Abb.** 7 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität für lösliche Esterase und den entsprechenden Esterase-CLEC.

[0032] **Abb.** 8 ist eine graphische Darstellung der Beständigkeit von löslicher Esterase und dem entsprechenden Esterase-CLEC gegen einen exogenen proteolytischen Abbau.

[0033] **Abb.** 9 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität für lösliche Lipase und den entsprechenden Lipase-CLEC.

[0034] **Abb.** 10 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität für lösliches Lysozym und den entsprechenden Lysozym-CLEC.

[0035] **Abb.** 11 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Beurteilung der enzymatischen Aktivität für lösliche Asparaginase und den entsprechenden Asparaginase-CLEC.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0036] Ein einfaches allgemeines Verfahren, das die Stabilität und Funktion für ein bestimmtes Enzym oder eine Reihe von Enzymen unter Bedingungen gewährleistet, die für den präparativen Chemiker von Interesse sind und die zur Verwendung in Verbindung mit Enzymen unter Anwendung von gegenwärtig zugänglichen Verfahren zu aggressiv sind, wäre sehr nützlich. Vernetzte immobilisierte Enzymkristalle (bezeichnet als CLECs oder CLIECs), wie hierin beschrieben, können für diesen Zweck verwendet werden. Die Stabilisierung

des Kristallgitters und der Enzymkatalysatorbestandteile in dem Kristall durch die Vernetzungsreaktion ermöglicht die Verwendung von CLECs in Umgebungen, einschließlich wässrigen, organischen oder nahezu wasserfreien Lösungsmitteln, Gemischen dieser Lösungsmittel, extremen pH-Werten und erhöhten Temperaturen, die mit der Enzymfunktion unter Anwendung von gegenwärtig zugänglichen Verfahren unverträglich sind. Zusätzlich kann die Stabilisierung des Kristallgitters in den CLECs die Gefriertrocknung der CLECs durch Standardverfahren ermöglichen. Gefriergetrocknete CLECs können für kommerziell attraktive Zeiträume (Monate bis Jahre) ohne Kühlung gelagert werden und ermöglichen die schnelle und unkomplizierte Verwendung von CLECs in Verfahren im Industrie- und Labormaßstab durch die einfache Zugabe von ausgewählten Lösungsmitteln, ohne einen Lösungsmittelaustauschschritt dazwischen. CLECs sind auch gegen einen Abbau durch exogene Proteasen sehr beständig. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Verwendung von vielseitigen Enzymkatalysatoren in etablierten industriellen chemischen Verfahren sowie bei der Synthese von neuen Verbindungen für Forschungszwecke im Labor.

[0037] Obwohl die Vernetzung zur Stabilität eines kristallinen Enzyms beiträgt, ist sie weder notwendig noch in allen Fällen wünschenswert. Einige kristallisierte Enzyme behalten ihre funktionelle und strukturelle Integrität in aggressiven Umgebungen bei, auch ohne eine Vernetzung. Die bevorzugte Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens schließt die Vernetzung eines kristallinen Enzyms ein und wird in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben. Es sollte jedoch selbstverständlich sein, daß kristallisierte Enzyme, die anschließend nicht vernetzt werden, in einigen erfindungsgemäßen Ausführungsformen verwendet werden können.

[0038] Die konstanten Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülbestandteilen in dem Kristallgitter eines CLEC's resultieren in gut definierten Poren einer begrenzten Größe, die zu den Enzymmolekülen innerhalb des Körpers eines CLEC's führen. Als Ergebnis dringen Substrate, die größer sind als die vorhandene Porengröße, nicht in den Körper des CLEC-Partikels ein.

[0039] Als Folge der begrenzten Porengröße würden viele Enzymreaktionen von kommerziellem und wissenschaftlichem Interesse unter Beteiligung von Substraten, die größer sind als die Porengröße der CLECs, außerhalb des Schutzumfangs der vorliegenden Erfindung liegen. Dies würde die meisten Reaktionen unter Beteiligung großer Polymere wie Proteine, Polynucleotide, Polysaccharide und andere organische Polymere einschließen, bei denen die Anzahl der polymeren Untereinheiten derart wäre, daß das Polymer größer als die Kristallporengröße in den CLECs ist. In solchen Fällen jedoch kann die Katalyse noch auf der CLEC-Oberfläche erfolgen.

[0040] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung eines ausgewählten Proteins, insbesondere eines Enzyms, durch Kristallisierung und Vernetzung des Proteins, wodurch ein vernetzter immobilisierter Enzymkristall (CLEC) hergestellt wird, der verwendet werden kann, um die Herstellung eines ausgewählten Produkts zu katalysieren, z. B. eines Peptids, Kohlenhydrats, Lipids oder eines chiralen organischen Moleküls. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner solche CLECs und ein Verfahren zur Herstellung eines ausgewählten Produkts mit Hilfe einer CLEC-katalysierten Reaktion oder eines CLEC-katalysierten Schrittes in einer Reihe von Reaktionen. In einer Ausführungsform der vorliegenden Endung ist der Dipeptidyl-Vorläufer von Aspartam in einer Kondensationsreaktion, katalysiert durch ein vernetztes immobilisiertes Thermolysin, das durch das vorliegende Verfahren hergestellt wurde, hergestellt worden. In einer anderen Ausführungsform dieser Erfindung ist das Indikatorsubstrat FAGLA gespalten worden, um ein kolorimetrisches Produkt herzustellen, dessen Anwesenheit eine Enzymaktivität in einem Thermolysin-CLEC anzeigt. Die FAGLA-Hydrolyse ist als Modellreaktion verwendet worden, um die Stabilität des Thermolysin-CLEC's in einer Reihe von Umgebungen zu zeigen, die normalerweise mit der Aktivität des Enzyms unverträglich wären.

[0041] In anderen Ausführungsformen dieser Erfindung sind die Enzyme Elastase, Esterase, Lipase, Asparaginase und Lysozym verwendet worden, um verschiedene angegebene Substrate zu spalten, z. B. p-Nitrophenylacetat (Esterase und Lipase), Succinyl-(Ala)-3-p-nitroanilid (Elastase), 4-Methylumbelliferyl-N-acetylchitriosid (Lysozym) und NADH (Asparaginase).

[0042] Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann der Fachmann ein Protokoll zur Herstellung eines gewünschten Produkts mit Hilfe einer Reaktion, die durch ein immobilisiertes Enzym katalysiert wird, anpassen. Das Enzym von Interesse, wenn aus einer geeigneten Lösung auskristallisiert, kann mit Glutaraldehyd oder einem anderen geeigneten bifunktionellen Reagens in der Kristallisationslösung vernetzt werden, um einen CLEC dieses Enzyms herzustellen. Anschließend kann der CLEC des ausgewählten Enzyms gefriergetrocknet werden, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0043] Es gibt mehrere Vorteile, welche die Verwendung eines CLEC's im Vergleich zu gegenwärtig verfügbaren, enzymkatalysierten Verfahren bietet. Zum Beispiel stellt die vernetzte Kristallmatrix in einem CLEC ihren eigenen Träger bereit. Es sind keine kostspieligen Trägerkügelchen, -gläser, -gele oder -filme erforderlich, um den Enzymkatalysator zu befestigen, wie bei den gegenwärtig verfügbaren Immobilisierungsverfahren. Als Ergebnis kommt die Enzymkonzentration in einem CLEC dem theoretischen Grenzwert für die Kugelpackung nahe, die für Moleküle einer bestimmten Größe erreicht werden kann, wobei die selbst in konzentrierten Lösungen erreichbaren Dichten stark überschritten werden. Der gesamte CLEC besteht aus dem aktiven Enzym (und nicht aus einem inaktiven Träger) und somit sollte die mit der Diffusion verbundene Verringerung der En-

zymreaktionsgeschwindigkeit, die üblicherweise bei herkömmlich immobilisierten Enzymen im Verhältnis zu Enzymen in Lösung beobachtet wird, minimiert werden, da der mittlere freie Weg für das Substrat und das Produkt zwischen dem aktiven Enzym und dem freien Lösungsmittel für die CLECs stark verkürzt wird (verglichen mit Trägerpartikeln eines herkömmlich immobilisierten Enzyms). Diese hohen Proteindichten sind besonders nützlich bei Biosensor-, analytischen und anderen Anwendungen, die große Proteinmengen in kleinen Volumina erfordern. In industriellen Verfahren hat die hervorragende Leistungsfähigkeit und die Kompaktheit der CLECs eine erhebliche Betriebswirtschaftlichkeit zur Folge, indem die effektive Aktivität eines bestimmten Volumens des Katalysators erhöht wird, wodurch eine Verringerung der Anlagengröße sowie der Kapitalkosten ermöglicht wird (Daniels M. J., Methods in Enzymol. 136 (1987), 371–379). CLECs sind relativ monodispers; wobei sie eine makroskopische Größe und Form aufweisen, welche die natürlichen Kristallwachstumseigenschaften der einzelnen Enzymkatalysatoren widerspiegeln. Der Austausch von vorhandenen Träger-immobilisierten Enzymmedien durch CLECs sollte nicht schwierig sein, da beide Systeme bezüglich der Größe und der Form vergleichbar sind und beide in ähnlicher Weise aus dem Ausgangsmaterial durch eine Reihe von einfachen Verfahren, einschließlich grundlegenden, wirtschaftlichen Verfahren wie Filtration, Zentrifugation, Dekantieren des Lösungsmittels und anderen, gewonnen werden können.

[0044] Zusätzlich ermöglicht die Verwendung von gefriergetrockneten CLECs die routinemäßige Handhabung und Lagerung dieser Materialien vor dem Gebrauch (trockene Lagerung bei Raumtemperatur ohne Kühlung für längere Zeiträume). Gefriergetrocknete CLECs ermöglichen auch die routinemäßige Formulierung durch die direkte Zugabe von Lösungsmitteln und Substraten von Interesse, ohne langwierige Lösungsmittelaustauschverfahren oder die Bildung von amorphen Suspensionen. Die gefriergetrocknete CLEC-Form erweitert den allgemeinen Nutzen der Enzyme als Katalysatoren auf ein breiteres Spektrum von Enzymen und funktionellen Bedingungen.

[0045] Ein zweiter Vorteil eines CLEC's ist, daß die Vernetzung des kristallisierten Enzyms das Kristallgitter und die Enzymmolekülbestandteile sowohl mechanisch als auch chemisch stabilisiert und verstärkt. Als Ergebnis kann ein CLEC das einzige Mittel zur Erreichung von wesentlichen Konzentrationen eines aktiven Enzymkatalysators in aggressiven wäßrigen, organischen oder nahezu wasserfreien Lösungsmitteln oder in wäßrigen-organischen Lösungsmittelgemischen sein. Die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren bei organischen Synthesen ist durch deren Neigung erschwert worden, in Gegenwart von nichtwäßrigen Lösungsmitteln und insbesondere in Gemischen aus wäßrigen und nichtwäßrigen Lösungsmitteln zu denaturieren (Klibanov A. M., Trends in Biochemical Sciences 14 (1989), 141–144). In den CLECs wird die Einschränkung der Konformationsmobilität, welche eine Stabilität zur Folge hat, durch die intermolekularen Kontakte und Vernetzungen zwischen den Enzymmolekülbestandteilen, die das Kristallgitter ausmachen, anstatt durch das nahezu Fehlen von Wasser in dem Medium zur Verfügung gestellt. Als Ergebnis können dazwischenliegende Wasserkonzentrationen durch die Enzyme toleriert werden, falls als CLECs formuliert, was vorher nicht möglich gewesen ist (vgl. Tabelle 12). Bei kommerziellen Anwendungen ermöglichen wäßrige-organische Lösungsmittelgemische die Manipulation der Produktbildung durch Ausnutzung der relativen Löslichkeiten der Produkte und der Substrate. Selbst in wäßrigen Medien sind Enzymkatalysatoren, immobilisiert oder löslich, den mechanischen Kräften innerhalb eines Reaktors ausgesetzt, die eine Denaturierung und eine verkürzte Halbwertszeit zur Folge haben können. Die chemischen Vernetzungen innerhalb des CLEC's stellen die notwendige mechanische Festigkeit bereit (Quiocho und Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52 (1964), 833–839), die eine erhöhte Reaktorlebensdauer für den Enzymkatalysator zur Folge hat.

[0046] Ein dritter Vorteil eines CLEC's ist, daß ein CLEC als Ergebnis seiner kristallinen Natur eine Homogenität über das gesamte vernetzte Kristallvolumen erreichen kann. Kristalline Enzyme, wie hierin beschrieben, werden in einer wäßrigen Umgebung gezüchtet und vernetzt und daher bleibt die Anordnung der Moleküle innerhalb des Kristallgitters gleich und regelmäßig. Diese Homogenität wird durch die intermolekularen Kontakte und die chemischen Vernetzungen zwischen den Enzymmolekülen, die das Kristallgitter ausmachen, aufrechterhalten, selbst bei der Übertragung in andere wäßrige, organische oder nahezu wasserfreie Lösungsmittel oder wäßrige/organische Lösungsmittelgemische. In allen diesen Lösungsmitteln behalten die Enzymmoleküle einen gleichmäßigen Abstand voneinander bei, wodurch gut definierte, stabile Poren innerhalb der CLECs gebildet werden, die den Zugang des Substrats zu den Enzymkatalysatoren sowie die Entfernung des Produkts erleichtern. Die Einheitlichkeit der Enzymaktivität ist bei industriellen, medizinischen und analytischen Anwendungen entscheidend, bei denen eine Reproduzierbarkeit und Kontinuität wichtig sind.

[0047] Ein vierter Vorteil der Verwendung eines CLEC's ist, daß er eine erhöhte Betriebs- und Lagerungshalbwertszeit zeigen sollte. Es ist bekannt, daß Gitterwechselwirkungen, auch ohne eine Vernetzung, Proteine stabilisieren, teilweise infolge der Einschränkungen der Konformationsfreiheitsgrade, die zur Proteindenaturierung notwendig sind. In den CLECs sind die Gitterwechselwirkungen, falls durch chemische Vernetzungen fixiert, besonders wichtig bei der Verhinderung einer Denaturierung, insbesondere in Gemischen aus wäßrigen und nichtwäßrigen Lösungsmitteln (Klibanov A. M., Trends in Biochemical Sciences 14 (1989), 141– 144). Enzyme, die für Monate oder Jahre im kristallinen Zustand vorlagen, behalten üblicherweise einen hohen Prozentsatz ihrer katalytischen Aktivität bei. Vernetzte immobilisierte Enzymkristalle, die in wasserfreien Lösungs-

mitteln gelagert werden, sind auch ferner gegen eine mikrobielle Kontamination und Schädigung geschützt, die ein ernstes Problem bei der Lagerung von großen Proteinmengen in einer nährstoffreichen, wäßrigen Umgebung darstellt. Im Fall eines gefriergetrockneten CLEC's wird das immobilisierte Enzym in Abwesenheit eines Lösungsmittels aufbewahrt. Das und die mittels Vernetzung erzielte Stabilisierung ermöglichen die Lagerung ohne Kühlung für lange Zeiträume.

[0048] Ein fünfter Vorteil der Verwendung eines CLEC's ist, daß er eine erhöhte Temperaturstabilität als Folge der Vernetzungen, die das Kristallgitter stabilisieren, zeigen sollte. Die Durchführung von Reaktionen bei einer höheren Temperatur als derjenigen, die bei herkömmlichen Verfahren verwendet wird, würde die Reaktionsgeschwindigkeiten für die chemischen Reaktionen von Interesse sowohl thermodynamisch als auch durch Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit in das und aus dem Kristallgitter der CLECs erhöhen. Dieses Zusammenwirken würde eine wichtige Verbesserung der Reaktionseffizienz darstellen, da sie die Produktivität einer gegebenen Menge eines Enzymkatalysators maximieren würde, der im allgemeinen die kostspieligste Komponente des Reaktionsverfahrens ist (Daniels M. J., Methods in Enzymol. 136 (1987), 371–379). Die durch die CLECs gezeigte Temperaturstabilität ist bemerkenswert, da die meisten Enzymsysteme milde Reaktionsbedingungen erfordern. CLECs wären auch gegen eine Denaturierung durch vorübergehend hohe Temperaturen während der Lagerung stabilisiert.

[0049] Ein letzter Vorteil der Verwendung eines CLEC's ist, daß Poren mit einer gleichmäßigen Größe und Form zwischen einzelnen Enzymmolekülen in dem zugrundeliegenden Kristallgitter erzeugt werden. Diese begrenzte Lösungsmittelzugänglichkeit verbessert die Metallionen- oder Cofaktor-Retentionseigenschaften eines CLEC's im Vergleich zu herkömmlich immobilisierten Enzymen und Enzymen in Lösung außerordentlich. Diese Eigenschaft eines CLEC's ermöglicht die Anwendung von wirtschaftlich vorteilhaften kontinuierlichen Durchflußverfahren in Situation (vgl. z. B. Oyama et al., Methods in Enzymol. 136 (1987), 503–516), in denen das Enzym sonst durch eine Metallionen- oder Cofaktor-Auslaugung inaktiviert werden würde. Zum Beispiel ist bekannt, daß bei der Thermolysinvermittelten Synthese des Dipeptiyl-Aspartamvorläufers Z-L-Asp-L-Phe-OMe ein herkömmlich immobilisiertes Enzym seine katalytische Aktivität in kontinuierlichen Durchflußsäulenverfahren verliert, teilweise durch die Auslaugung von Calciumionen, die für die Thermolysinaktivität essentiell sind. In der Praxis hat die Auslaugung von Calciumionen die Anwendung weniger wirksamer Batchverfahren erzwungen (Nakanishi et al., Biotechnology 3 (1985), 459–464). Eine Auslaugung erfolgt, wenn Calciumionenkomplexe mit dem Substrat Z-L-Asp in Kompetition mit den natürlichen Calciumbindungsstellen auf der Oberfläche des Enzyms gebildet werden, woraus ein Verlust der katalytische Aktivität resultiert. Die hohe Enzymdichte und das entsprechend begrenzte Volumen, das für das Lösungsmittel in den Zwischenräumen der CLECs zugänglich ist, verhindert die Bildung der konkurrierenden L-Asp-Ca^{++}-Komplexe, die für die Metallionenauslaugung verantwortlich sind.

Herstellung von CLECs – Enzymkristallisation

[0050] In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein vernetzter immobilisierter Enzymkristall (oder CLEC) wie folgt hergestellt:

[0051] Die Enzymkristalle werden durch die kontrollierte Fällung eines Proteins aus einer wäßrigen Lösung oder einer organische Lösungsmittel enthaltenden, wäßrigen Lösung gezüchtet. Die zu kontrollierenden Bedingungen schließen zum Beispiel die Verdampfungsrate des Lösungsmittels, das Vorhandensein geeigneter gelöster Co-Substanzen und Puffer sowie den pH-Wert und die Temperatur ein. Ein umfassender Übersichtsartikel der verschiedenen Faktoren, welche die Kristallisation von Proteinen beeinflussen, ist von McPherson (Methods Enzymol. 114 (1985), 112) veröffentlicht worden. Außerdem haben sowohl McPherson als auch Gilliland (J. Crystal Growth 90 (1988), 51–59) umfassende Listen aller Proteine und Nucleinsäuren zusammengestellt, die als kristallisiert beschrieben worden sind, sowie der Bedingungen, die ihre Kristallisation zur Folge haben. Eine Zusammenfassung von Kristallen und Kristallisationsrezepturen sowie eine Quelle für Koordinaten von gelösten Protein- und Nucleinsäure-Kristallstrukturen wird durch die Protein Data Bank (Bernstein et al., J. Mol. Biol. 112 (1977), 535–542) im Brookhaven National Laboratory unterhalten. Solche Referenzen können verwendet werden, um die zur Kristallisation eines bestimmten Proteins oder Enzyms, das bereits kristallisiert wurde, notwendigen Bedingungen als Einleitung für die Bildung eines geeigneten CLEC's zu bestimmen, und können die Formulierung einer Kristallisationsstrategie für Proteine lenken, die nicht kristallisiert wurden. Alternativ kann eine intelligente Versuch-Fehlersuche-Strategie (vgl. z. B. Carter C. W. Jr. und Carter C. W., J. Biol. Chem. 254 (1979), 12219–12223) in den meisten Fällen geeignete Kristallisationsbedingungen für die meisten Proteine ergeben, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, der oben besprochenen; vorausgesetzt, daß ein annehmbarer Reinheitsgrad für diese erzielt werden kann. Der erforderliche Reinheitsgrad kann von Protein zu Protein sehr variieren. Im Fall von Lysozym ist das Enzym zum Beispiel direkt aus seiner ungereinigten Quelle, das Hühnereiweiß, kristallisiert worden (Gilliland G. L., J. Crystal Growth 90 (1988), 51–59).

[0052] Zur Verwendung als CLECs in dem erfindungsgemäßen Verfahren sind keine großen Einzelkristalle erforderlich, die zur Röntgenbeugungsanalyse notwendig sind, und können tatsächlich infolge von Diffusions-

problemen in Verbindung mit der Kristallgröße unerwünscht sein. Mikrokristalline Schauer (d. h. Kristalle mit einer Größe in der Größenordnung von 10^{-1} mm/Querschnitt) sind für CLECs geeignet und werden oft beobachtet, obgleich selten darüber in der Röntgenkristallographie-Literatur berichtet wird. Mikrokristalle sind in dem erfindungsgemäßen Verfahren sehr nützlich, um Diffusionsprobleme zu minimieren (vgl. z. B. Quiocho F. A. und Richards F. M., Biochemistry 5 (1967), 4062–4076).

[0053] Im allgemeinen werden die Kristalle durch Kombination des zu kristallisierenden Proteins mit einem geeigneten wäßrigen Lösungsmittel oder einem wäßrigen Lösungsmittel, enthaltend geeignete Fällungsmittel wie Salze oder organische Verbindungen, hergestellt. Das Lösungsmittel wird mit dem Protein bei einer Temperatur kombiniert, die experimentell als geeignet für die Induktion der Kristallisation und als verträglich für die Aufrechterhaltung der Proteinstabilität und -aktivität bestimmt wurde. Das Lösungsmittel kann gegebenenfalls gelöste Co-Substanzen wie zweiwertige Kationen, Cofaktoren oder Chaotrope sowie Pufferspezies zur Kontrolle des pH-Werts einschließen. Die Notwendigkeit für gelöste Co-Substanzen und deren Konzentrationen werden experimentell bestimmt, um die Kristallisation zu erleichtern. Bei einem großtechnischen Verfahren kann die kontrollierte Fällung, die eine Kristallisation zur Folge hat, am besten durch die einfache Kombination von Protein, Fällungsmittel, gelöste Co-Substanzen und gegebenenfalls Puffern in einem Batchverfahren ausgeführt werden. Alternativ können auch Laborkristallisationsverfahren wie Dialyse oder Dampfdiffusion angepaßt werden. McPherson (Methods Enzymol. 114 (1985), 112) und Gilliland (J. Crystal Growth 90 (1988), 51–59) schließen eine umfassende Liste geeigneter Bedingungen in ihren Übersichtsartikeln der Kristallisationsliteratur ein. Gelegentlich könnte eine Unverträglichkeit zwischen dem Vernetzungsreagens und dem Kristallisationsmedium die Überführung der Kristalle in ein geeigneteres Lösungsmittelsystem erforderlich machen.

[0054] Viele der Proteine, für die bereits Kristallisationsbedingungen in der Literatur beschrieben worden sind, besitzen ein erhebliches Potential als geeignete Enzymkatalysatoren in chemischen Verfahren in der Industrie und im Labor und werden direkt einer Formulierung als CLECs in dem erfindungsgemäßen Verfahren unterzogen. Tabelle 1 ist eine Auswahl von Enzymen, die bereits kristallisiert worden sind. Es ist anzumerken, daß die in den meisten dieser Referenzen beschriebenen Bedingungen zur Züchtung von großen Kristallen mit Difraktionsqualität optimiert worden sind, oft mit einem großen Arbeitsaufwand. In einigen Fällen kann ein gewisser Anpassungsgrad der Bedingungen für die kleineren Kristalle erforderlich sein, die zur Herstellung der CLECs verwendet werden.

Tabelle 1

Enzym	Mikrobielle oder biologische Quelle	Literaturangaben (einschließlich der darin zitierten)
• Alkoholdehydrogenase	Pferdeleber	Eklund *et al.*, *J.Mol.Biol.* **146**: 561-587 (1981)
• Alkoholoxidase	*Pichia pastoris*	Boys *et al.*, *J.Mol.Biol.* **208**: 211-212 (1989) Tykarska *et al.*, *J.Protein Chem.* **9**: 83-86 (1990)
• Aldolase (Fructosebisphosphat)	Kaninchenmuskel	Eagles *et al.*, *J.Mol.Biol.* **45**: 533-544 (1969) Heidmer *et al.*, *Science* **171**: 677-680 (1971)
	Kalbsmuskel	Goryunov *et al.*, *Biofizika* **14**: 1116-1117 (1969)
	Menschenmuskel	Millar *et al.*, *Trans.Roy.Soc.Lond.* B293: 209-214 (1981)
	Drosophila melanogaster	Brenner *et al.*, *J..Biol.Chem.* **257**: 11747-11749 (1982)
• Aldolase (PKDG)	*Pseudomonas putida*	Vandlen *et al.*, *J.Biol.Chem.* **248**: 2251-2253 (1973)
• Alkalische Phosphatase	*Escherichia coli*	Sowadski *et al.*, *J.Mol.Biol.* **150**: 245-272 (1981)
• Asparaginase	*Erwinia carotova*	North *et al.*, *Nature* **224**: 594-595 (1969)
	Escherichia coli	Epp *et al.*, *Eur.J.Biochem.* **20**: 432-437 (1971)
	Escherichia coli	Yonei *et al.*, *J.Mol.Biol.* **110**: 179-186 (1977)
	Proteus vulgaris	Tetsuya *et al.*, *J.Biol.Chem.* **248**: 7620-7621 (1972)
• Carbonatdehydrase	Menschenerythrozyt (C)	Kannan *et al.*, *J.Mol.Biol.* **12**: 740-760 (1965)
	Menschenerythrozyt (B)	Kannan *et al.*, *J.Mol.Biol.* **63**: 601-604 (1972)
	Rindererythrozyt	Carlsson *et al.* *J.Mol.Biol.* **80**: 373-375 (1973)
• Katalase	Pferdeerythrozyt	Glauser *et al.*, *Acta Cryst.* **21**: 175-177 (1966)
	Micrococcus luteus	Marie *et al.*, *J.Mol.Biol.* **129**: 675-676 (1979)
	Penicillium vitale	Vainshtein *et al.*, *Acta Cryst.* **A37**: C29 (1981)
	Rinderleber	Eventoff *et. al.*, *J.Mol.Biol.* **103**: 799-801 (1976)
• Kreatinkinase	Rinderherz	Gilliland *et al.*, *J.Mol.Biol.* **170**: 791-793 (1983)
	Kaninchenmuskel	McPherson, *J.Mol.Biol.* **81**: 83-86 (1973)
• Glutaminase	*Actenobacter glutanimasificans*	Wlodawer *et al.*, *J.Mol.Biol.* **99**: 295-299 (1975)
	Pseudomonas 7A	Wlodawer *et al.*, *J.Mol.Biol.* **112**: 515-519 (1977)

Tabelle 1, Fortsetzung:

Enzym	Mikrobielle oder biologische Quelle	Literaturangaben (einschließlich der darin zitierten)
• Glucoseoxidase	*Aspergius niger*	Kalisz *et al.*, *J.Mol.Biol.* **213**: 207-209 (1990)
• B-Lactamasen	*Staphylococcus aureus*	Moult *et al.*, *Biochem J.* **225**: 167-176 (1985)
	Bacillus cereus	Sutton *et al.*, *Biochem J.* **248**: 181-188 (1987)
• Lactatdehydrogenasen	Schwein	Hackert *et al.*, *J.Mol.Biol.* **78**: 665-673 (1973)
	Huhn	Pickles *et al.*, *J.Mol.Biol.* **9**: 598-600 (1964)
	Hundshai	Adams *et al.*, *J.Mol.Biol.* **41**: 159-188 (1969)
	Bacillus stearothermophilus	Schar *et al.*, *J.Mol.Biol.* **154**: 349-353 (1982)
• Lipase	*Geotrichum candidum*	Hata *et al.*, *J.Biochem.* **86**: 1821-1827 (1979)
	Pferdebauchspeicheldrüse	Lombardo *et al.*, *J.Mol.Biol.* **205**: 259-261 (1989)
	Mucor meihei	Brady *et al.*, *Nature* **343**: 767-770 (1990)
	Menschenbauchspeicheldrüse	Winkler *et al.*, *Nature* **343**: 771-774 (1990)
• Luciferase	*Firefly*	Green,A.A.,*et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* **20**: 170 (1956)
• Luciferase	*Vibrio harveyii*	Swanson *et al*, *J.Biol.Chem.* **260**: 1287-1289 (1985)
• Nitrilhydratase	*Brevibacterium R 312*	Nagasawa *et al*, *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **139**: 1305-1312 (1986)
	P. Chlororaphis B23	Nagasawa *et.al.*, *Eur.J.Biochem.* **162**: 691-698 (1987)
• Peroxidase	Meerettich	Braithwaite *et al.*, *J.Mol.Biol.* **106**: 229-230 (1976)
	Meerettichwurzeln (Typ E4)	Aibara *et al.*, *J.Biochem.* **90**: 489-496 (1981)
	Japanischer Rettich	Morita, *Acta Cryst.* A28: S52 (1979)
• Peroxidase (Chlorid)	*Caldaromyces fumago*	Rubin *et al.*, *J.Biol.Chem.* **257**: 7768-7769 (1982)
• Peroxidase (Cytochrom)	*Sarchomyces cerevisae*	Poulos *et al.*, *J.Biol.Chem.* **253**: 3730-3735 (1978)
• Peroxidase (Glutathion)	Rindererythrozyt	Ladenstein *et al.*,*J.Mol.Biol.* **104**: 877-882 (1979)
• Subtilisin	*Bacillus subtilis (Novo)*	Drenth *et al.*, *J.Mol.Biol.* **28**: 543-544 (1967)
	Bacillus amyloliquefaciens (BPN')	Wright *et al.*, *Nature* **221**: 235-242 (1969)
	Bacillus subtilis (Carlsberg)	Petsko *et al.*, *J.Mol.Biol.* **106**: 453-456 (1976)

Tabelle 1, Fortsetzung

Enzym	Mikrobielle oder biologische Quelle	Literaturangaben (einschließlich der darin zitierten)
• Superoxiddismutase	Rind	Richardson *et al.*, *J.Biol.Chem.* 247: 6368-6369 (1972)
	Spinat	Morita *et al.*, *J.Mol.Biol.* 86: 685-686 (1974)
	Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli	Beem *et al.*, *J.Mol.Biol.* 105: 327-332 (1976)
	Bacillus stearothermophillus	Bridgen *et al.*, *J.Mol.Biol.* 105: 333-335 (1976)
	Pseudomonas ovalis	Yamakura *et al.*, *J.Biol.Chem.* 251: 4792-4793 (1976)
• Thermolysin	*Bacillus thermoproteolyticus*	Matthews *et al.*, *Nature New Biol.* 238: 37-41 (1972)
• Urease	Jackbohne	Sumner J.B., *J.Biol. Chem.* 69: 435 (1926)
• Xyloseisomerase	*Streptomyces rubiginosus*	Carrell *et al.*, *J.Biol.Chem.* 259: 3230-3236 (1984)
	Arthrobacter B3728	Akins *et al.*, *Biochym.Biophys Acta* 874: 375-377 (1986)
	Streptomyces olivochromogenes	Farber *et al.*, *Protein Engineering* 1: 459-466 (1987)
	Streptomyces violaceoniger	Glasfeld *et al.*, *J.Biol.Chem.* 263: 14612-14613 (1988)
	Actinoplanes missouriensis	Rey *et al.*, *Proteins:Struc.Func.Genet.* 4: 165-172 (1988)

Herstellung von CLECs – Vernetzungsreaktion

[0055] Nach der Züchtung der Kristalle in einem geeigneten Medium, können sie vernetzt werden. Die Vernetzung hat eine Stabilisierung des Kristallgitters durch Einführung kovalenter Bindungen zwischen den Enzymmolekülbestandteilen in dem Kristall zur Folge. Auf diese Weise wird die Überführung des Enzyms in eine andere Reaktionsumgebung ermöglicht, die sonst mit dem Vorliegen des Kristallgitters oder auch mit dem Vorhandensein eines intakten, nicht denaturierten Proteins unverträglich sein könnte. Die Vernetzung kann durch eine große Vielzahl von bifunktionellen Reagenzien erreicht werden, obwohl in der Praxis der einfache, billige Glutaraldehyd das Reagens der Wahl geworden ist. (Für eine repräsentative Liste anderer erhältlicher Vernetzungsreagenzien kann man zum Beispiel den Katalog von 1990 der Pierce Chemical Company zur Rate ziehen.)

[0056] Die Vernetzung mit Glutaraldehyd bildet starke kovalente Bindungen zwischen vorwiegend Lysinaminosäureresten innerhalb und zwischen den Enzymmolekülen in dem Kristallgitter, die den Kristall ausmachen. Die vernetzenden Wechselwirkungen verhindern, daß die Enzymmolekülbestandteile in dem Kristall wieder in Lösung gehen, wobei die Enzymmoleküle wirksam in mikrokristallinen (idealerweise 10^{-1} mm) Partikeln unlöslich gemacht oder immobilisiert werden. Die makroskopischen, immobilisierten, unlöslich gemachten Kristalle können dann ohne weiteres von dem Ausgangsmaterial, welches das Produkt und das nicht umgesetzte Substrat enthält, durch einfache Verfahren wie Filtration, Dekantieren und andere getrennt werden. Sie können auch in CLEC-gepackten Säulen in kontinuierlichen Durchflußverfahren verwendet werden, wo sie verbesserte Cofaktor- und Metallionen-Retentionseigenschaften zeigen.

[0057] Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden CLECs zur Verwendung als Enzymkatalysatoren in vorhandenen und neuen Umgebungen erhalten. Die erhöhte Stabilität der CLECs, die aus der Vernetzungsreaktion resultiert, ermöglicht die Übertragung des CLEC's in ein Lösungsmittel (z. B. wäßrige, organische oder nahezu wasserfreie Lösungsmittel oder ein Gemisch davon), mit dem es sonst unverträglich wäre, und die Durchführung eines Reaktorverfahrens bei erhöhten Temperaturen oder extremen pH-Werten. Die makroskopischen CLEC-Katalysatorpartikel können auch leicht manipuliert werden, wodurch die Gewinnung aus dem Ausgangsmaterial durch einfache Verfahren wie Filtration, Zentrifugation oder Dekantieren des Lösungsmittels ermöglicht wird. Außerdem können sie in gepackten Säulen in kontinuierlichen Durchflußverfahren verwendet

werden.

Herstellung von CLECs – Gefriertrocknung

[0058] Eine Suspension eines Volumenteils der vernetzten Thermolysinkristalle in 10 Volumenteilen von demineralisiertem Wasser bei pH 7,0 wurde über Nacht unter Verwendung eines VirTis Modell #24-Gefriertrockners gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Kristalle wurden bei Raumtemperatur oder bei 4°C vor der Rekonstitution gelagert, welche durch Zugabe von 10 Volumenteilen des ausgewählten Lösungsmittels direkt auf die der Lagerung entnommen Kristalle erfolgte. Die rehydratisierten Kristalle wurden in 10 mM Calciumacetatpuffer bei pH 7,0 für die FAGLA-Spaltungsexperimente rekonstituiert. Die rekonstituierten gefriergetrockneten CLECs wurden üblicherweise bei Raumtemperatur gelagert. Im Gegensatz dazu machte das lösliche Enzym eine Lagerung bei –70°C erforderlich, um die spezifische Aktivität länger als eine Woche aufrechtzuerhalten. Dieses Protokoll wurde für alle Enzyme verwendet, die in der hierin eingeschlossenen Erläuterung beschrieben sind.

Synthese eines Aspartamvorläufers mit einem Thermolysin-CLEC

[0059] Das erfindungsgemäße Verfahren, durch das vernetzte Enzymkristalle hergestellt werden, wird nachstehend beschrieben und veranschaulicht durch die Herstellung von vernetzten immobilisierten Kristallenzymen von Thermolysin zur Verwendung bei der Herstellung des Dipetidyl-Vorläufers von Aspartam in Ethylacetat, das ein nahezu wasserfreies, organisches Lösungsmittel ist. Thermolysin, ein Protein, das kristallisiert worden ist und dessen Struktur in einer Auflösung von 1,6 Å aufgeklärt worden ist (Holmes and Matthews, J. Mol. Biol. 160 (1982), 623–639), ist ein Beispiel für ein Enzym, das als ein CLEC in dem vorliegenden Verfahren verwendet werden kann. Thermolysin wird bei der Herstellung des künstlichen Süßungsmittels Aspartam verwendet (Isowa et al., US-Patent #4,436,925 (1984); Lindeberg, J. Chem. Ed. 64 (1987), 1062–1064; Nakanishi et al., Biotechnology 3 (1985), 459–464; Oyama et al., Methods in Enzymol. 136 (1987), 503–516). Gegenwärtig wird offensichtlich der größte Teil des Aspartams durch einen herkömmlichen Ansatz der präparativen Chemie hergestellt, obwohl die Verwendung eines herkömmlich immobilisierten Thermolysins in nahezu wasserfreien Medien ermutigende Ergebnisse ergeben hat (Oyama et al., J. Org. Chem. 46 (1981), 5242–5244; Nakanishi et al., Biotechnology 3 (1985), 459–464). Eine Verbesserung des enzymatischen Ansatzes zur Aspartam-Herstellung, wie sie durch die Anwendung des vorliegenden Verfahrens möglich ist, würde ihn hinsichtlich der gegenwärtig angewendeten Verfahren sowohl im Hinblick auf die Einfachheit als auch die Kosten konkurrenzfähig machen (Oyama et al., Methods in Enzymol. 136 (1987), 503–516).

Beurteilung von Thermolysin-CLECs

[0060] Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Thermolysin-CLECs herzustellen, die auf ihre pH-Abhängigkeit und Stabilität, Stabilität bei erhöhter Temperatur, Beständigkeit gegen eine exogene Proteolyse und Stabilität in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels beurteilt worden sind. Thermolysin-CLECs wurden mit einem löslichen Thermolysin verglichen, wie in Beispiel 2 und den **Abb.** 1–4 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung ergaben das Folgende:

1. Was die pH-Abhängigkeit und Stabilität betrifft, zeigen beide Formen eine maximale Aktivität bei pH 7 und eine ähnliche Aktivität im sauren Bereich. Im alkalischen pH-Bereich behält der CLEC seine maximale Aktivität bis pH 10 aufrecht; das lösliche Thermolysin besitzt eine 75%ige Aktivität bei pH 8,5, nur eine 25%ige Aktivität bei pH 9, und ist bei pH 9,5 völlig inaktiv.
2. Die in den CLECs erzielte zusätzliche Stabilisierung resultiert in einer enzymatischen Aktivität bei höheren Temperaturen als sie mit dem löslichen Thermolysin möglich sind. Die erhöhte Stabilität des Thermolysin-CLEC's bei niedrigeren Temperaturen macht die Lagerung einfacher als für das lösliche Enzym. Eine thermische Stabilität und Beständigkeit gegen eine Autolyse wurde für die Thermolysin-CLECs auch gezeigt, die ihre maximale Aktivität nach einer 5-tägigen Inkubation bei 65°C beibehielten. Im Gegensatz dazu, verlor das lösliche Thermolysin 50% seiner anfänglichen Aktivität nach einer 2-stündigen Inkubation und zeigte eine vernachlässigbare Aktivität nach einer 24-stündigen Inkubation bei 65°C.
3. Die enzymatische Aktivität von Thermolysin-CLECs wurde durch eine 4-tägige Inkubation in Gegenwart der leistungsfähigen Streptococcus-Protease Pronase® nicht beeinflußt. Im Gegensatz dazu wurde das lösliche Thermolysin schnell abgebaut und verlor seine gesamte Aktivität nach einer 90-minütigen Inkubation.
4. Thermolysin-CLECs und das lösliche Thermolysin zeigten eine deutlich verschiedene Stabilität in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln, wie in Tabelle 12 gezeigt. Die Thermolysin-CLECs behielten mehr als 95% ihrer maximalen Aktivität nach Inkubation mit allen beurteilten organischen Lösungsmitteln bei.

[0061] Diese Merkmale von Thermolysin-CLECs und anderen Enzym-CLECs machen sie besonders nütz-

lich, da sie einfacher zu lagern sind, stabiler sind und weniger leicht inaktiviert oder abgebaut werden als die entsprechenden löslichen Enzyme.

Beurteilung von Elastase-CLECs

[0062] Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Elastase-CLECs herzustellen, die auf ihre Aktivität und Beständigkeit gegen eine exogene Proteolyse beurteilt worden sind. Elastase-CLECs wurden mit einer löslichen Elastase verglichen, wie in Beispiel 3 und den **Abb.** 5 und 6 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung ergaben das Folgende:

1. Elastase-CLECs behielten etwa 50% ihrer Aktivität im Vergleich zu dem löslichen Enzym bei.
2. Lösliche Elastase wurde durch die Protease schneller abgebaut. Die Aktivität der löslichen Elastase wurde auf 50% ihrer anfänglichen Aktivität nach einer 10-minütigen Inkubation in Gegenwart der Protease verringert. Nach einer 1-stündigen Inkubation hatte das lösliche Enzym mehr als 90% seiner anfänglichen Aktivität verloren. Im Gegensatz dazu wurde die enzymatische Aktivität des Elastase-CLEC's durch die Inkubation mit der Protease nicht beeinflußt.

Beurteilung von Esterase-CLECs

[0063] Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Esterase-CLECs herzustellen, die auf ihre Aktivität und Beständigkeit gegen eine exogene Proteolyse beurteilt worden sind. Esterase-CLECs wurden mit einer löslichen Esterase verglichen, wie in Beispiel 4 und den **Abb.** 7 und 8 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung ergaben das Folgende:

1. Esterase-CLECs behielten etwa 50% ihrer Aktivität im Vergleich zu dem löslichen Enzym bei.
2. Lösliche Esterase war gegen einen proteolytischen Abbau sehr empfindlich. Die Aktivität der löslichen Esterase wurde auf 50% ihrer anfänglichen Aktivität nach einer 10-minütigen Inkubation in Gegenwart der Protease verringert. Nach einer 1-stündigen Inkubation hatte das lösliche Enzym mehr als 90% seiner anfänglichen Aktivität verloren. Im Gegensatz dazu wurde die enzymatische Aktivität des Esterase-CLEC's durch die Inkubation mit der Protease nicht beeinflußt.

Beurteilung von Lipase-CLECs

[0064] Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Lipase-CLECs herzustellen, die auf ihre Aktivität beurteilt worden sind. Lipase-CLECs wurden mit einer löslichen Lipase verglichen, wie in Beispiel 5 und **Abb.** 9 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung zeigten, daß Lipase-CLECs etwa 90% ihrer Aktivität im Vergleich zu dem löslichen Enzym beibehielten.

Beurteilung von Lysozym-CLECs

[0065] Das endungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Lysozym-CLECs herzustellen, die auf ihre Aktivität und Beständigkeit gegen eine exogene Proteolyse beurteilt worden sind. Lysozym-CLECs wurden mit einem löslichen Lysozym verglichen, wie in Beispiel 6 und **Abb.** 10 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung zeigten, daß Lysozym-CLECs etwa 50% ihrer Aktivität im Vergleich zu dem löslichen Enzym beibehielten.

Beurteilung von Asparaginase-CLECs

[0066] Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch angewendet worden, um Asparaginase-CLECs herzustellen, die auf ihre Aktivität beurteilt worden sind. Asparaginase-CLECs wurden mit einer löslichen Asparaginase verglichen, wie in Beispiel 7 und **Abb.** 11 ausführlich beschrieben ist. Die Ergebnisse der Beurteilung zeigten, daß Asparaginase-CLECs etwa 77% ihrer Aktivität im Vergleich zu dem löslichen Enzym beibehielten.

Allgemeine Anwendbarkeit von CLECs

[0067] Wie hierin offenbart, stellen CLECs eine neue Technologie mit einer breiten Anwendung auf vielen Gebieten dar, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, großtechnische Synthesen, Laborhilfsmittel, Biosensoren und medizinische Anwendungen. Beispiele für verschiedene Systeme unter Anwendung von herkömmlichen Enzymimmobilisierungsverfahren bei ihrer Ausführung sind nachstehend in den Tabellen 2–5 angegeben. Der Fachmann sollte in der Lage sein, diese und ähnliche Systeme an die in dieser Anmeldung offenbarte CLEC-Technologie anzupassen. Zur Veranschaulichung werden spezifische Beispiele aus jeder der aufgeführten Kategorien ausführlicher besprochen.

[0068] Die nachstehende Tabelle 2 führt Beispiele auf, die herkömmlich immobilisierte Enzyme in einem industriellen Verfahren verwenden, wobei die Beispiele ohne weiteres an die hierin offenbarte CLEC-Technologie angepaßt werden können.

Tabelle 2

Enzym	Herstellung oder Anwendung	Substrate	Literaturangaben (einschließlich der darin zitierten)
• Thermolysin	• Aspartumvorstufe	Z-Asp, L-Phe-OMe	Oyama *et al., J. Org. Chem.* 46: 5242-5244 (1981) Nakanishi *et al., Trends in Biotechnology* 3: 459-464 (1985)
• Subtilisin	• Aspartam	L-Asp-L-Phe, OMe	Davino,A.A., US Patent 4293648 (1981)
• Lipase	• Kakaofettersatzstoffe	Palmöle	Harwood, J., *Trends in Biochemical Sciences* 14: 125-126 (1989) Macrae, A.R., *J. Am. Oil Chem Soc.* 60: 291-294 (1983)
• Nitrilhydratase, Nitrilasen, Amidasen	• Acrylamid	Acrylonitril	Nagasawa, T. und Yamada, H., *Trends in Biotechnology* 7: 153-158 (1989)
• Aminoacylase (pilzlich) • Aminosäureesterase • Subtilisin • Amidasen • Hydentoinasen • Spezifische Dehydrogenasen • Aminopeptidase • Transaminase	• Aminosäuretrennung	N-Acyl-D,L-Aminosäuren Ester von D,L-Aminosäuren Amide von D,L-Aminosäuren Hydantoine α-Hydroxycarbonsäuren	Schmidt-Kastner,G. & Egerer, P. in *Biotechnology* vol 6a: 387-421 (1984) und Literaturangaben darin, Fusee,M.C., *Methods in Enzymology* 136: 463 (1987)
• Aminosäuredehydrogenase + Formaldehydrogenase	• Aminosäureherstellung: allgemein	Keto- oder Hydroxysäuren	Fusee,M.C., *Methods in Enzymology* 136: 463 (1987) Rozzell,J.D., *Methods in Enzymology* 136: 479 (1987) Enzymes in Industry; Hrsg. Gerhartz.W.,VCH Press 1990
• L-Aspartase • L-Aspartat-4-decarboxylase Aspartame + L-Aspartat-4-decarboxylase • ACL Hydrolase • L-ACT Hydrolase	• Aminosäureherstellung: spezifisch L-Asparaginsäure L-Alanine L-Lysine L-Cysteine L-Isoleucine L-Methionine	Fumarat/Fumarsäure L-Asparginsäure, Ammoniumfumarat D,L-α-Amino-ε-caprolactam (ACL) D,L-2-Amino-2-thiazolin-4-carbonsäure	
• Lyase • L-Tryptophan-Synthetase • Fumarase • Hydantoinase	L-Phenylalanine L-Tryptophan L-valine L-Malonsäure D-N-Carbamoyl-p-Hydroxyphenylglycin	Cinnamat Indol, L-Serin Fumarat 5-p-Hydroxyhydantoin	

Tabelle 2, Fortsetzung:

Enzym	Herstellung oder Anwendung	Substrate	Literaturangaben (einschließlich der darin zitierten)
• Lipasen, Esterasen	• Trennung von Racematen durch stereoselektive Synthese	synthetische Chemie	Jones, J.B., *Tetrahedron* 42: 3351-3403 (1988) Butt, S. und Roberts, S.M., *Natural Product Reports* 489-503 (1986), und darin zitierte Literaturangaben für eine umfassendere Übersicht dieses Gebiets
• Fumarase	• L-Malonsäure	Fumarsäure	Chibata *et al.*, *Methods in Enzymology* 136: 455 (1987)
• Lactase, β-Galactosidasen	• Disaccharridsynthese, z.B. Galaktosyl-N-acetyl-galactosamin	Lactose & N-Acetylgalactosamin	Larsson *et al.*, *Methods in Enzymology* 136: 230 (1987)
• Lipase, Esterase	• L-Menthol	4-Isomerengemisch	Fukui,S., Tanaka,A., *Methods in Enzymology* 136: 293 (1987)
• Amidasen	• D-Valin (Zwischenstufe für insektenvertilgendes Pyrethrumfluvinat)	D,L-Aminosäureamid	Schmidt-Kastner,G. & Egerer, P. in *Biotechnology* vol 6a: 387-421 (1984) und Literaturangaben darin
• Lipase (Candida Cylindricea)	• R-(+)2: Phenoxy-Propionsäure (Unkrautvernichtungsmittel)	2-Chlorpropionsäuren	*Biocatalysts in Organic Syntheses* eds Tramper, van de Plas & Linko; Proceedings of International Symposium in Netherlands 1985
• Lipasen, Esterasen, Amidasen, Aldolasen • Proteasen, Peptidasen • Hefelipase	• Organische Synthesen Monoglyceride Peptide • 2-(p-Chlorphenoxy)propionsäure (Unkrautvernichtungsmittel)	Trennung von racemischen Estern	Jones, J.B., *Tetrahedron* 42: 3351-3403 (1988) Butt, S. and Roberts, S.M., *Natural Product Reports* 489-503 (1986), und darin zitierte Literaturangaben für eine umfassendere Übersicht dieses Gebiets
• Strictodinsynthetase	• Alkaloidherstellung, z.B. Strictosidin		Pfitzner *et al.*, *Methods in Enzymology* 136: 342 (1987)
• Penicillinacylase • Penicillinamidase	• 6-Aminopenicillinsäure und 7-ADCA	Penicillin G oder V	*Enz Eng* 6: 291 (1982) *Enz Eng* 8: 155
• Hydroxysteroid-dehydrogenasen	• Steroidumwandlung		Carrea *et al. Methods in Enzymology* 136: 150 (1987)
• 5'-Phosphodiesterase, Nucleasen	• 5'-Ribonucleotide		Keller *et al, Methods in Enzymology* 136: 517 (1987)
• Esterase	• β-Lactamvorstufe (chirale Monoester, z.B. β-Aminoglutaminsäure-monoalkylester)	entsprechende Diester	Japanese patent application: 82-159, 493 (1981) Biseibutsu Company
• Lipasen	• β-Blocker		Kloosterman,M *et al.*,*Trends in Biotechnology* 6: 251-256 (1988)

Herstellung von Acrylamid unter Anwendung der CLEC-Technologie

[0069] Das Folgende ist eine Beschreibung einer Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens: die Anpassung der Acrylamid-Herstellung aus immobilisierten Zellen, die das Nitrilhydratase-Enzym überproduzieren (Nagasawa T. und Yamada H., Trends in Biotechnology 7 (1989), 153–158), an die bereits offenbarte CLEC-Technologie.

[0070] Die großtechnische Herstellung von Acrylamid, eine wichtige Gebrauchschemikalie, ist durch Yamada

und Mitarbeiter (Nagasawa T. und Yamada H., Trends in Biotechnology 7 (1989), 153–158) beschrieben worden. Kilotonnen von Acrylamid pro Jahr werden in Reaktoren produziert, die mit eingeschlossenen Zellen beladen sind, welche als Übererzeuger des Enzyms Nitrilhydratase selektiert wurden. Nitrilhydratase ist auch als gereinigte und kristallisierte Form aus zwei Quellen, Brevibacterium R312 (Nagasawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 139 (1986), 1305–1312) und P. chlorographis B23 (Nagasawa et al., Eur. J. Biochem. 162 (1987), 691–698), beschrieben worden. Wie hierin offenbart, können diese kristallinen Enzyme jeweils durch Vernetzung mit Glutaraldehyd oder einem anderen geeigneten Vernetzungsreagens immobilisiert werden, um einen CLEC herzustellen. Die Nitrilhydratase-CLECs können dann in einem herkömmlichen Reaktor anstelle der gegenwärtig verwendeten eingeschlossenen Zellen verwendet werden. Die Anpassung dieses Verfahrens an die CLEC-Technologie hat unmittelbare Vorteile zur Folge. Diese umfassen: eine verringerte Anlagengröße und einen besseren Durchsatz, resultierend aus der erhöhten Aktivität pro Volumeneinheit infolge der höheren Enzymkonzentration in den CLECs und der verbesserten Substrat- und Produktdiffusionsgeschwindigkeiten; die Verringerung von unerwünschten Kontaminationen und Nebenreaktionen, resultierend aus der höheren Reinheit von CLECs; und eine verringerte Empfindlichkeit gegen eine mikrobielle Kontamination in Abwesenheit von Zellen. Außerdem gibt es andere Vorteile, die nur mit einem Verfahren auf CLEC-Basis erhältlich sind. Diese Vorteile umfassen: eine höhere Betriebstemperatur für verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten; die Fähigkeit, in wäßrigen, organischen und nahezu wasserfreien Lösungsmitteln zu arbeiten, wodurch die Optimierung der Acrylamid-Herstellungsreaktion ermöglicht wird; und eine erhöhte Halbwertszeit bezüglich der Wirkungsweise und Lagerung, resultierend aus der höheren chemischen und mechanischen Stabilität von CLECs, insbesondere in unüblichen Lösungsmitteln.

Medizinische Anwendungen der CLEC-Technologie – extrakorporale Behandlung

[0071] Das erfindungsgemäße Verfahren und ein geeignet gewähltes CLEC oder ein Satz von CLECs können auch für medizinische Anwendungen verwendet werden. Ein CLEC oder ein Satz von CLECs kann zum Beispiel verwendet werden, um eine Komponente aus einer Flüssigkeit wie Blut zu entfernen, im allgemeinen durch Veränderung der Komponente und folglich deren Umwandlung in einen Stoff, der für ein Individuum nicht schädlich ist oder der durch normale Körperprozesse entfernt werden kann (z. B. über Entgiftung oder Abbau in der Leber, Ausscheidung über die Nieren). Bei dieser Anwendung wird ein geeignet gewähltes CLEC oder ein Satz von CLECs in Kontakt gebracht mit einer Körperflüssigkeit, enthaltend die zu verändernde Komponente oder einen Reaktanten (Produkt oder Substrat) einer Reaktion, an der die Komponente beteiligt ist, auf die bzw. den das Enzym in dem CLEC einwirkt. Als Ergebnis ist das Enzym in der Lage, auf die zu verändernde Komponente einzuwirken oder mit einem anderen Stoff zu reagieren, der ein Produkt einer Reaktion ist, an der die zu verändernde Komponente beteiligt ist. Die Aktivität des Enzyms hat eine direkte Veränderung der zu entfernenden Komponente oder eine Veränderung des Produkts der Reaktion, an der die Komponente beteiligt ist, zur Folge (wodurch die Fortsetzung der Reaktion unmöglich gemacht wird). Dies kann durch die Verwendung einer extrakorporalen Vorrichtung ausgeführt werden, umfassend ein geeignet gewähltes CLEC oder ein Satz von CLECs und ein Rückhaltemittel, das aus einem Material hergestellt ist, z. B. einem porösen Material, auf dem ein CLEC zurückgehalten wird, oder einer Röhre, in der ein CLEC vorliegt, wodurch ein Kontakt zwischen der Komponente selbst oder dem Stoff in der Flüssigkeit, der ein Produkt einer Reaktion ist, bei der die zu verändernde Komponente beteiligt ist, ermöglicht wird.

[0072] Dies könnte auch durch die Einführung eines geeigneten CLEC's in ein geeignetes Körperkompartiment wie das Peritoneum oder einen Lymphknoten erreicht werden, wo der CLEC Zugang zu Körperflüssigkeiten hätte. Die Einführung könnte chirurgisch oder durch Injektion der CLEC-Aufschlämmung erfolgen. Die direkte Injektion des CLEC's in den Blutstrom wäre ungeeignet, angesichts des hohen Embolierisikos.

[0073] Die Verwendung geeigneter CLECs auf diesem Gebiet könnte als Alternative zu genetischen Methoden in der Enzymaustauschtherapie dienen, um ein natürliches Defizit zu korrigieren, wie z. B. Phenylketonurie.

[0074] Tabelle 3 veranschaulicht einige der medizinischen Anwendungen, bei denen CLECs verwendet werden könnten. Für die Mehrzahl dieser Fälle befindet sich die extrakorporale Behandlung noch in der Entwicklungsphase, aber die Vorteile, die CLECs bieten, könnten neue Behandlungen in Bereichen bereitstellen, für die es bisher keine alternative Behandlung gab.

Tabelle 3

Verwendetes Enzym	Entfernung von: -	Behandelte Erkrankung/Patienten	Literaturangaben
• Asparaginase	• Asparagin	• Leukämie (Entfernung von Asparagin, einem wichtigen Krebsnährstoff, schädigt Leukämiezellen, die die essentielle Aminosäure Asparagin nicht herstellen können; normale Zellen können Asparagin herstellen und sind daher von der Behandlung nicht betroffen.)	Klein,M., Langer,R., *Trends in Biotechnology* 4: 179-185 (1986) und Literaturangaben darin Chang,T.M.S., *Methods in Enzymology* 137: 444-457 (1987) und Literaturangaben darin
• Heparinase	• Heparin	• Deheparisierung für Hemoperfusionspatienten, z.B. Nierendialyse	Langer,R.,*et al.*, *Science* 217: 261-263 (1982)
• Bilirubinoxidase	• Bilirubin	• Neugeborenenikterius	Lavin,A.,*et al.*, *Science* 230: 543-545 (1985)
• Carboxypeptidase	• Methotrexat	• Chemotherapie-Patienten	Pitt,A.M.,*et al.*, *Appl. Biochem.Biotechnol.*8: 55-68 (1983)
• Tyrosinase	• aromatische Aminosäuren	• Leberstörung mit pathologischer Erhöhung der Aminosäuren	Chang,T.M.S., *Sem.Liver Dis.Ser.* 6: 148 (1986)
• Phenylalanin-Ammoniumlyase	• Phenylalanin	• Phenylketonuria und Leberstörung	Ambrus,C.M., *et al.*, *J.Pharm.& Exp.Ther.* 224: 598-602 (1983)
• Multienzymsystem einschließlich: Urease, Glutamat-dehydrogenase, Glucosehehydrogenase & eine Transaminase	• Harnstoff (in Glutamin- und andere Aminosäuren über Ammoniak umgewandelt)	• Entgiftung für Patienten mit chronischer Nierenstörung	Chang,T.M.S., *Methods in Enzymology* 137: 444-457 (1987) und Literaturangaben darin Chang,T.M.S., *Enzyme Eng* 5: 225 (1980)
• Arginase	• Arginin	• familiäre Hyperargininämie	Kanalas,J.J. *et al.*, *Biochem. Med.* 27: 46-55 (1982)
• Glutamatdehydrogenase & Ammoniak	• Ammoniak	• Leberstörung	Maugh,T.H., *Science* 223: 474-476 (1984)

[0075] Eine besondere Anwendung des vorliegenden Verfahrens ist das Heparinlyase-System zur Blutdeheparinisierung (Bernstein et al., Methods in Enzymology 137 (1987), 515– 529), welches nachstehend besprochen wird.

[0076] Alle mit Blut durchströmten extrakorporalen Vorrichtungen, wie Nierendialyse, kontinuierliche arteriovenöse Hämofiltration oder extrakorporale Membranoxygenatoren, machen eine Heparinisierung des Patienten erforderlich, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Jedoch hat die Heparinisierung des Patienten hämorrhagische Komplikationen zur Folge und bleibt eine Bedrohung für die Sicherheit des Menschen. Diese Pro-

bleme nehmen zu, wenn sich die Perfusionszeiträume erhöhen, zum Beispiel mit dem Membranoxygenator, und können zu gravierenden Blutungen führen. Nach einer extrakorporalen Therapie kann das Heparin aus dem Blut unter Verwendung einer Heparinasevorrichtung im Ausfluß der extrakorporalen Vorrichtung entfernt werden, die das gesamte Heparin aus dem Blut eliminiert, das dem Patienten wieder zugeführt wird, und vermeidet auf diese Weise die gegenwärtigen Probleme einer Heparinisierung.

[0077] Die veröffentlichten Forschungsarbeiten (Langer et al., Science 217 (1982), 261– 263; Bernstein et al., Methods in Enzymology 137 (1987), 515–529) beschreiben ausführlich die Probleme, die durch in extrakorporalen Vorrichtungen verwendete, herkömmlich immobilisierte Enzyme verursacht werden. Das Hauptproblem besteht darin, daß die herkömmliche Immobilisierung eine geringe Retention der Enzymaktivität pro Volumeneinheit zur Folge hat, wodurch ein großes Volumen des immobilisierten Enzyms erforderlich ist, um die notwendige Heparinisierung durchzuführen. Dieses Volumen ist zu groß, um für die Anwendung bei Menschen geeignet zu sein. Jedoch vermeidet die hohe Retention der Aktivität pro Volumeneinheit in den CLECs infolge des Fehlens eines inerten Trägers dieses Problem und bietet eine praktische Lösung für die Deheparinisierung bei Menschen. Die erhöhte Stabilität von CLECs verringert die Disassoziation des Enzyms aus dem vernetzten Kristall. Dies ist der Verwendung der weniger stabilen, herkömmlich immobilisierten Enzyme überlegen, da die Immunreaktion verringert wird, die aus dem Enzymausschwemmung resultiert. Die CLEC-Temperaturstabilität verhindert die Denaturierung des Enzyms infolge von vorübergehend hohen Temperaturen während der Lagerung; es ist wahrscheinlich, daß die CLECs eine hohe Aktivität beibehalten können, selbst bei der Lagerung bei Raumtemperatur. Außerdem werden CLECs billiger und einfacher zu verwenden sein als deren herkömmlich immobilisierten Gegenstücke, infolge ihrer längeren Wirkungs- und Lagerungshalbwertszeiten.

Weitere Anwendungen der CLEC-Technologie – Biosensoren

[0078] Ein CLEC oder ein Satz von CLECs kann als Komponente eines Sensors verwendet werden, bezeichnet als Biosensor, der zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung eines Analyten von Interesse in einer Flüssigkeit wie eine Körperflüssigkeit (z. B. Blut, Urin), chemische und Laborreaktionsmedien, organische Medien, Wasser, ein Kulturmedium und Getränke nützlich ist. In einigen Fällen kann die fragliche Flüssigkeit ein Gas sein, wie bei einem Atemalkoholanalysengerät (Barzana E., Klibanov A. und Karell M., NASA Tech. Briefs 13 (1989), 104). Bei dieser Anwendung wird ein geeignet gewähltes CLEC oder ein Satz von CLECs mit einer Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die auf den Analyten von Interesse untersucht werden soll. Der Analyt von Interesse kann direkt (z. B. Blutglucosespiegel) oder indirekt (z. B. durch Nachweis oder Quantifizierung eines Stoffes, der ein Reaktant (Produkt oder Substrat) in einer Reaktion ist, an welcher der Analyt von Interesse beteiligt ist) gemessen werden. In jedem Fall ist der CLEC in der Lage, auf den Analyten oder den Stoff, der ein Reaktant in einer Reaktion ist, an welcher der Analyt auch beteiligt ist, einzuwirken. Die Aktivität des Enzyms hat eine nachweisbare Veränderung zur Folge (z. B. pH-Änderung, Erzeugung von Licht, Wärme, Änderung des elektrischen Potentials), die durch ein geeignetes Nachweismittel (z. B. pH-Elektrode, Licht- oder Wärmemeßwandler, Mittel zur Messung der elektrischen Ladung) nachgewiesen und/oder quantifiziert wird (Janata J. et al., Anal. Chem. 62 (1980), 33R–44R). Jedes Mittel, das zum Nachweis der Veränderung nützlich ist, die aus dem enzymkatalysierten Verfahren resultiert, kann verwendet werden. Ein erfindungsgemäßer Biosensor schließt einen CLEC oder einen Satz von CLECs und ein Rückhaltemittel für den CLEC ein, das den Kontakt zwischen dem (den) CLECs) und dem Analyten von Interesse oder dem Stoff in der Flüssigkeit, der ein Reaktant in der Reaktion ist, an welcher der Analyt von Interesse beteiligt ist, ermöglicht.

[0079] Tabelle 4 veranschaulicht einige der Biosensoranwendungen, bei denen CLECs verwendet werden könnten. Gegenwärtige immobilisierte Enzyme werden bei diesen Anwendungen verwendet, aber weisen eine geringe Stabilität, eine geringe Enzymdichte, kurze Halbwertszeiten und eine fehlende Reproduzierbarkeit auf. Diese Beispiele können ohne weiteres an die hierin offenbarte CLEC-Technologie angepaßt werden.

Tabelle 4

Verwendetes Enzym	Nachweis von: -	Anwendung	Literaturangabe
• Glucoseoxidase	• Glucose	• diabetische	• Daniles,B.,Mossbach,K., *Methods in Enzymology* 137: 4-7 (1987) • Hall,E "*Biosensors* " Open University Press (1990) • Taylor,R., *Proceed. Biotechnology Conference* 1989; 275-287 • Anthony *et al.*, "*Biosensors, Fundamentals and Applications*", Oxford University Press (1987)
• Keratindeiminase	• Kreatinin	• Nierenfunktion	• Tabata,M. *et al., Anal. Biochem.* 134: 44 (1983)
• Urease	• Harnstoff	• Nierenfunktion	• Hsuie,G.H *et al., Polym.Mater.Sci.Eng.* 57: 825-829 (1987) • Kobos, *et al. Anal.Chem.* 60: 1996-1998 (1988)
• Lactatoxidase & Dehydrogenase	• Lactat	• klinische Anwendungen	• Blaedel, W.J. & Jenkins,R. A., *Anal. Chem.* 48(8): 1240 (1976) • Sagaguchi, Y.,*et al.*, *J. Appl. Biochem* 3: 32 (1981)
• Glucose-6-pyruvat-dehydrogenase	Glucose-6-phosphat, Saccharose und ATP	• diabetische und andere medizinische	ibid wie Glucoseoxidase
• Alkoholdehydro-genase, Alkoholoxidase	• Ethanol & andere Alkohole; Essig-, Ameisensäuren	• Atemanalysegeräte und gewerbliche Anwendungen	• Romette,J.L.*et al., Methods in Enzymology* 137: 217-225 (1987) • Ho,M.H., *Methods in Enzymology* 137: 271-288 (1987)
• β-Fructosidase	• Saccharose	• gewerbliche Anwendungen	• Romette,J.L.*et al., Methods in Enzymology* 137: 217-225 (1987)
• Cholesterinoxidase	• Cholesterin	• Cholesterintest	• Satoh,I.,*Methods in Enzymology* 137: 217-225 (1987)
• Katalase	• Harnsäure, Cholesterin	• Atherosklerotische und andere medizinische	• Satoh,I.,*Methods in Enzymology* 137; 217-225 (1987)
• Carboxypeptidase	• Methotrexat	• Krebs	ibid wie Glucoseoxidase
• Carbonatdehydrase	• Kohlenstoffdioxid	• gewerbliche, Labor- & Umweltanwendungen	ibid wie Glucoseoxidase
• L-Aminosäure-oxidase	• Aminosäuren	• medizinische und gewerbliche	ibid wie Glucoseoxidase
• β-Lactamase Penicillinase	• Penicillin	• medizinische	• Anzai *et al., Bull.Chem. Soc.Jpn.* 60: 4133-4137 (1988)
• alkalische Phosphatase	• Phosphat	• Metabolitüberwachung	ibid wie Glucoseoxidase
• Nitrat-/Nitritreduktase	• Nitrate & Nitrite	• Metabolit- und Nährmittelüber-wachung	ibid wie Glucoseoxidase

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Verwendetes Enzym	Katalysierter Reaktionstyp	Anwendung	Literaturangabe
• Arylsulfatase	• Sulfat	• Metabolitüberwachung	• ibid wie Glycoseoxidase
• Succinatdehydrogenase	• Succinat	• gewerbliche	• ibid wie Glycoseoxidase
• Bakterielle Luciferase	$FMNH_2$ und gekoppelte Reaktionen	• Erfassung von Mengen im 10^{-18} molaren Bereich von $FMNH_2$ durch Messung von Photonenfreisetzung	• WannlundJ.,*et al.*, "Luminescent assays: Perspectives in endocrinology and clinical chemistry"; Hrsg. Serio,M. und Pazzagli,M. 1: 125 (1982) • Kurkijarvi *et al.*, *Methods in Enzymology* 137: 171-181 (1987)
• Leuchtkäfer Luciferase	ATP und gekoppelte Reaktionen	• Erfassung von Mengen in 10^{-12} molaren Bereich von ATP durch Messung von Photonenfreisetzung	• Kurkijarvi *et al.*, *Methods in Enzymology* 137: 171-181 (1987) • Murachi *et al.*, *Methods in Enzymology* 137: 260-271 (1988)

[0080] In dem erfindungsgemäßen Verfahren, so wie es zur Analyse von Proben in einem Biosensor ausgeführt wird, ist es besonders wünschenswert, das größtmögliche nachweisbare Signal aus der kleinsten möglichen Menge an Substrat und Katalysator hervorzurufen. In dieser Hinsicht ist die hierin offenbarte CLEC-Technologie besonders attraktiv, da sie die höchst mögliche Konzentration des Enzymkatalysators in einem bestimmten Volumen erzielt.

[0081] Oft werden erhebliche Anstrengungen unternommen, um eine elementare Enzymreaktion von Interesse entweder direkt oder durch geeignete Zwischenprodukte an die Erzeugung von Licht durch Enzyme wie Luciferase zu koppeln (Kurkijarvi et al., Methods in Enzymol. 137 (1988), 171–181). Dies wird gemacht, um die einzigartige Empfindlichkeit und Effizienz einer Photonennachweisapparatur auszunutzen, die den Nachweis von femtomolaren Konzentrationen der Enzymreaktionsprodukte unter geeigneten Bedingungen ermöglicht. Nach diesem Prinzip sind Biosensorsysteme unter Verwendung von herkömmlich immobilisierten Enzymen entwickelt worden, um verschiedene Substrate von klinischem und anderem Interesse nachzuweisen. Lichterzeugende Reaktionen sind mit Nachweisreaktionen gekoppelt worden, die Substrate wie D-Glucose, L-Lactat, L-Glutamat und Ethanol u. a. in einer außerordentlich geringen Konzentration nachweisen.

[0082] Im Hinblick auf diese Anwendung ist das Luciferaseenzym aus Vibrio harvevii als kristallisiert beschrieben worden (Swanson et al., J. Biol. Chem. 260 (1985), 1287–1289). Kristalle dieser Luciferase können mit Glutaraldehyd oder einem anderen geeigneten Reagens vernetzt werden, um ein Luciferase-CLEC zu bilden. Für Biosensor- und analytische Anwendungen bietet ein Luciferase-CLEC gegenüber herkömmlich immobilisierten Enzymen viele Vorteile. In einem CLEC würde das gesamte Volumen des Luciferase-CLEC's aus dem lichtemittierenden Enzym bestehen. In einem herkömmlich immobilisierten Enzymsystem werden jedoch bis zu 95% des Gesamtvolumen durch das "inerte" Trägermaterial eingenommen, das wahrscheinlicher als ein Absorptionsmittel des durch das Enzym emittierten Lichts wirksam ist. Zusätzlich sollte die erhöhte Stabilität von CLECs die Lagerung bei Raumtemperatur ermöglichen und auch neue Meßanwendungen in aggressiven Umgebungen und bei erhöhten Temperaturen möglich machen.

Zusätzliche Anwendungen der CLEC-Technologie – Laborreaktionen

[0083] CLECs können als Laborreagenzien in kleinen Säulen oder in Batchverfahren verwendet werden, die zur Ausführung von Laborreaktionen verwendet werden können. Einige der vielseitigen Kategorien von Reaktionen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5

Verwendetes Enzym	katalysierter Reaktionstyp	Literaturangabe
• Lipasen, Phospholipasen	• Stereoselektive Synthese: einschließlich Veresterung, Umesterung, Aminolyse, Lactonisierungen, Polykondensationen, Acylierung, Oximolyse und Trennung von racemischen Mischungen	• Zaks,A.& Klibanov,A.M. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 82: 3192-3196 (1985) • Klibanov,A.M. *Acc.Chem.Res.* 23: 114-120 (1990)und Literaturangaben darin • Wong,C.H.,*Chemtracts-Organic Chemistry* 3:91-111 (1990) and references therein
• Esterasen	• stereoselektive Synthese und Trennung	• Kobayashi et al., *Tetrahedron Letters* Vol 25, #24: 2557-2560 (1984) • Schneider et al., *Agnew. Chem. Int. Ed.Engl.*23 (#1): 64-68 (1984)
• Tyrosinasen	• Oxidation von Phenolen zur Herstellung von Quinonen	• Kazandjian,R.Z und Klibanov, A.M. *J.Am.Chem.Soc* 110: 584-589 (1986)
• Proteasen, z.B. Subtilisin	• stereoselektive Acylierung von Kohlenhydraten:	• Riva et al. *J.Am.Chem.Soc.*110: 584-589 (1988)
• Oxidasen	• selektive Oxidation von Kohlenwasserstoffen:	• Klibanov,A.M. *Acc.Chem.Res.* 23: 114-120 (1990)und Literaturangaben darin
• andere Enzyme, die keine Cofaktoren benötigen; Isomerasen, Lyasen, Aldolasen, Glycosyltransferasen, Glycosidasen	• Stereoselektive Synthese:	• Wong,C.H.,*Chemtracts-Organic Chemistry* 3:91-111 (1990) und Literaturangaben darin.
• andere Enzyme, die keine zugegebenen Cofaktoren benötigen: Flavoenzyme, Pyridoxadenenzyme, Metalloenzyme	• Stereoselektive Synthese:	• Wong,C.H.,*Chemtracts-Organic Chemistry* 3:91-111 (1990) und Literaturangaben darin
• Enzyme, die Cofaktoren benötigen: Kinasen (ATP), Oxidoreduktasen (NAD/P), Methyltransferasen (SAM), CoA-benötigende Enzyme, Sulferasen (PAPS)	• Stereoselektive Synthese:	• Wong,C.H.,*Chemtracts-Organic Chemistry* 3:91-111 (1990) und Literaturangaben darin

[0084] Schneider et al. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 23 (1984) (Nr. 1), 64–68) veranschaulichen wie Enzyme bei organischen Synthesen verwendet werden können. Esterase aus der Schweineleber wurde bei der Mesoesterumwandlung in einen chiralen Monoester in einem wäßrigen Phosphatpuffer verwendet.

[0085] Die CLEC-katalysierten Reaktionen zur Laboranwendung sind in dreifacher Hinsicht vorteilhaft. Erstens behalten CLECs eine hohe Aktivität in aggressiven Umgebungen bei (z. B. wäßrige, organische oder nahezu wasserfreie Lösungsmittel und Gemische davon und bei hohen Temperaturen), die für chemische Syntheseexperimente im Labor typisch sind. Zweitens zeigen CLECs eine hohe Wirkungs- und Lagerungsstabilität, die für diskontinuierliche Laborexperimente geeignet ist. Drittens ermöglicht ihre hohe Aktivität pro Volumeneinheit kürzere Reaktionszeiten und erfordert kleinere Enzymvolumina (pro Aktivitätseinheit). So sehen die Vorteile, die CLECs im Vergleich zu freien oder immobilisierten Enzymen bieten, für die organischen Chemiker ein alternatives, sehr selektives Synthesehilfsmittel vor.

[0086] In allen der vorstehend beschriebenen Fällen, aber nicht auf diese begrenzt, kann das erfindungsgemäße Verfahren durch einen Fachmann angepaßt werden, um ein Verfahren unter Verwendung eines herkömmlich immobilisierten Enzymkatalysators auf die Verwendung eines CLEC's des geeigneten Enzyms umzustellen. CLECs können nicht nur herkömmlich immobilisierte Enzyme ersetzen, sondern auch bei zellvermittelten Umwandlungen verwendet werden. Die vorliegende Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, die in keiner Weise begrenzend sein sollen.

Beispiel 1

Kristallisation und Vernetzung von Thermolysin zur Synthese der Aspartamvorstufe Z-Asp-Phe-OMe

Kristallisation

[0087] 250 mg Thermolysin von Bacillus thermoproteolyticus wurden von Boehringer-Mannheim GmbH erworben und in 4 ml mit 45% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 55% 1,40 M Calciumacetat, 0,50 M Natriumkakodylat bei pH-Wert 6,5 gelöst. Diese Ausgangsbedingungen sind ähnlich zu den von Matthews et al. zur Herstellung von Thermolysinkristallen mit Diffraktionsqualität beschriebenen (siehe z. B. Holmes und Matthews, J. Mol. Biol., 160: 623–639 (1982)). Die Proteinlösung wurde dann auf 1 ml in einer Centricon 10 Mikro-Konzentrationsvorrichtung konzentriert. Eine gute Ausbeute an Mikrokristallen wurde mit einem Verfahren der Flashkristallisation, jetzt hier offenbart, erhalten, wobei 1 ml Wasser oder 1,40 M Calciumacetat, 0,50 M Natriumkakodylat mit pH-Wert 6,5 schnell in eine der vorstehend beschriebenen Thermolysin-DMSO-Lösungen eingespritzt wurde. Ein Ausfallen von hexagonalen Mikrokristallen mit etwa gleichförmigen Abmessungen (etwa 10^{-1} mm Länge) ergibt sich aus diesem Verfahren.

Vernetzung von Thermolysinmikrokristallen

[0088] Die in diesem speziellen Beispiel des endungsgemäßen Verfahrens verwendete Versuchsvorschrift ist eine Anpassung der von Nakanishi et al. (Biotechnology 3: 459–464 (1985)) beschriebenen, wobei in der Versuchsvorschrift Thermolysin zuerst an Trägerkügelchen, bestehend aus Ionenaustauscherharz Amberlite XAD-7 adsorbiert und anschließend durch Vernetzung mit Glutaraldehyd immobilisiert wurde (Quiocho und Richards, Proc. Natl., Acad. Sci. (USA) 52: 833–839 (1964)). In diesem Beispiel wurden die vorstehend erhaltenen Mikrokristalle von Thermolysin zentrifugiert und pelletiert und der Überstand verworfen. 5 ml 17,5%iger Glutaraldehyd technischer Reinheit in 2,5% DMSO, 0,05 M Calciumacetat und 0,025 M Natriumkakodylat mit pH-Wert 6,5 wurden dann zu den Mikrokristallen gegeben. Das Gemisch wurde unter leichtem Rühren 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch wiederholtes Waschen der Kristalle mit 10 ml-Mengen Wasser gestoppt, um die Glutaraldehydlösung zu entfernen. Die gewaschenen vernetzten Thermolysinkristalle bestehen aus den nachstehend als Katalysator verwendeten Thermolysin CLEC.

Snthese von Z-Asp-Phe-OMe in einer wässrigen Lösung

[0089] 5 ml einer Thermolysin CLEC-Suspension wurden in einen kontinuierlich gerührten Chargenreaktor gegeben, der bei 37°C inkubiert wurde. Nach Zentrifugieren und Dekantieren des Überstands wurde ein wässriges Reaktionsgemisch zu den CLEC gegeben. Diese Lösung wurde durch Mischen von 80 mg Z-L-Asp und 80 mg L-Phe-OMe-HCl in 1 ml Wasser unter Zugabe von Essigsäure, um einen pH-Wert von 7,0 zu erhalten, hergestellt. Proben wurden zur Analyse mit HPLC entnommen. Die nachstehende Tabelle 6 zeigt die HPLC-Peakhöhe des Peaks des Substrats Z-L-Asp nach der angegebenen Reaktionszeit, normalisiert auf 1 zur Zeit t = 0. Da Z-L-Asp in dieser Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, ist die Messung des Verbrauchs äquivalent zur Messung des Auftretens des Produkts Z-L-Asp-L-Phe-OMe (Nakanishi et al. Biotechnology 3: 459–464 (1985)). Die Tabelle 6 schließt auch die normalisierte Peakhöhe des beschränkenden verbleibenden Substrats Z-L-Asp ein und ist eine Abschätzung des Grads der vollständigen Umsetzung. Es ist deutlich, dass die Reaktion bis etwa 20% vollständiger Umsetzung innerhalb der ersten 30 Sekunden vonstatten ging und dort ein Plateau bildete. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den Beobachtungen von Nakanishi et al. (Biotechnology 3: 459–464 (1985)) bei Verwendung von herkömmlich immobilisiertem Thermolysin in einem wässrigen Reaktionsgemisch wie vorstehend, und sind der geringen Löslichkeit des Produkts Z-L-Asp-L-Phe-OMe in Wasser zuzuschreiben.

Tabelle 6

Reaktionszeit (s)	Peakhöhe (normalisiert)	Prozentsatz vollständige Umsetzung
0	1.000	
30	0.727	27.3%
60	0.857	14.3%
120	0.940	6.0%
180	0.797	20.3%

Synthese von Z-Asp-Phe-OMe in fast wasserfreier Lösung

[0090] 5 ml einer Thermolysin CLEC Suspension wurden in einen bei 37°C inkubierten kontinuierlich gerührten Chargenreaktor gegeben. Nach Zentrifugation und Dekantieren des Überstands wurde ein fast wasserfreies organisches Reaktionsgemisch zu den CLECs gegeben. Diese Lösung wurde durch Mischen von 80 mg Z-L-Asp und 240 mg L-Phe-OMe in 1 ml 99%igem Essigsäureethylester und 1% Wasser hergestellt. Proben wurden zur Analyse mit HPLC entnommen. Die nachstehende Tabelle 7 zeigt die HPLC-Peakhöhe des Peaks des Substrats Z-L-Asp nach der angegebenen Reaktionszeit, normalisiert auf 1 zur Zeit t = 0. Da Z-L-Asp in dieser Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, ist die Messung des Verbrauchs äquivalent zur Messung des Auftretens des Produkts Z-L-Asp-L-Phe-OMe (Nakanishi et al. Biotechnology 3: 459 – 464 (1985)). Die Tabelle 7 schließt auch die normalisierte Peakhöhe des beschränkenden verbleibenden Substrats Z-L-Asp und eine Abschätzung des Grads der vollständigen Umsetzung ein. In diesem Fall ging die Reaktion bis etwa 70% vollständiger Umsetzung innerhalb der ersten 30 Sekunden vonstatten und bildete dort ein Plateau. Diese Ergebnisse sind auch übereinstimmend mit den Beobachtungen von Nakanishi et al. (Biotechnology 3: 459–464 (1985)) bei Verwendung von herkömmlich immobilisiertem Thermolysin in einem fast wasserfreien Reaktionsgemisch und sind der Produkthemmung des Enzyms zuzuschreiben.

Tabelle 7

Reaktionszeit (s)	Peakhöhe (normalisiert)	Prozentsatz vollständige Umsetzung
0	1.000	
30	0.323	67.7%
60	0.314	68.6%
120	0.305	69.5%
180	0.272	72.8%

Beispiel 2

Kristallisation, Vernetzung und Gefriertrocknen von Thermolysin und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Thermolysin

[0091] Thermolysin (Diawa Kasei K. K., Japan) wurde in 10 mM Calciumacetat (Sigma), pH-Wert 10,0 in einer Konzentration von 10% (G/V) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Titration mit 2 M NaOH auf 10,0 gehalten. Nach vollständigem Lösen wurde die Proteinlösung auf pH-Wert 8,0 mit 2 M HCl titriert. Festes Calciumacetat wurde auf 1,2 M zugegeben. Dimethylsulfoxid (Sigma) wurde dann auf 30% zugegeben. Das Pro-

tein wurde auf 100 mg/ml durch Ultrafiltration in einer Amicon Rührzelle (10000 MWCO-Membran) konzentriert. Das konzentrierte Enzym wurde aliquotiert und bei –70°C gelagert. Thermolysin wurde durch die Zugabe von 9 Volumina demineralisiertem Wasser zu 1 Volumen konzentrierter (100 mg/ml) Proteinlösung kristallisiert. Die Lösung wurde kurz verwirbelt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Kristalle wurden mit 10 Volumina 10 mM Calciumacetat mit pH-Wert 7,0 gewaschen und durch Zentrifugation mit niedriger Geschwindigkeit (10 min bei 1500 g, Beckman GPR-Zentrifuge) zurückgewonnen.

[0092] Die schnelle Zugabe von Wasser zu einer konzentrierten (100 mg/ml) Lösung von Thermolysin bewirkt die Bildung von Kristallen innerhalb von 10 Minuten, die unter Vergrößerung geringer Leistung sichtbar werden. Die Kristallgröße ist reproduzierbar abhängig von der Enkonzentration des Proteins. Drei Volumina Wasser zu einem Volumen Thermolysin-Konzentrat (100 mg/ml) ergeben 0,5 mm lange hexagonale Stäbe mit Röntgenstreuqualität, die den früher von Colman et al. beschriebenen Kristallen entsprechen (Colman, P. M. Jansonius, J. N. und Matthews, B. W., J. Mol. Biol. 70: 701–724 (1972)), wie durch Diffraktionsanalyse bestätigt. Die Zugabe von zehn Volumina Wasser zu einem Volumen Proteinkonzentrat verringert die Länge der erhaltenen Kristalle auf 0,05 mm. Diese Mikrokristalle sind in CLEC-Anwendungen bevorzugt, da sie dazu neigen, Diffusionsprobleme, die mit der Kristallgröße verbunden sind, zu minimeren (siehe z. B. Quiocho, F. A. und Richards, F. M. Biochemistry 5: 4062–4076 (1967)). Innerhalb einer festgelegten Charge Protein war die Kristallgröße übereinstimmend gleichförmig. (Kristalle mit 0,05–0,10 mm Länge wurden in dieser Untersuchung verwendet, um die genaue Pipettierung der kristallinen Suspensionen zu erleichtern.) Densitometerabtastungen von SDS-PAGE zeigten eine sechsfache Reinigung des Enzyms nach Kristallisation, wobei die spezifische Aktivität der CLEC signifikant erhöht wurde. Eine Kristallisation ergab eine 20%ige Abnahme der gesamten Aktivität des CLEC-Proteins, verglichen mit löslichem Thermolysin, bei Untersuchung durch spektrophotometrische Spaltung des Dipeptidsubstrats Furylacryloyl-Glycyl-L-Leucin-Amid (FAGLA), wie nachstehend beschrieben.

Vernetzung von Thermolysinkristallen

[0093] Thermolysinkristalle wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung von 12,5% Glutaraldehyd (Sigma), 5% DMSO und 50 mM Tris pH-Wert 6,5, vernetzt. Die vernetzten Kristalle wurden 3mal in demineralisiertem Wasser gewaschen und durch Zentrifugation mit geringer Geschwindigkeit zurückgewonnen, wie in Bezug auf die Kristallisation von Thermolysin beschrieben. Eine chemische Vernetzung der Enzymkristalle stabilisiert das Kristallgitter und die ausbauenden Enzymmoleküle im Kristall ausreichend, so dass die praktische Verwendung von CLEC in Umgebungen ermöglicht wird, die andernfalls mit der Enzymfunktion nicht verträglich sind. Es bestand kein messbarer Unterschied in der enzymatischen Aktivität zwischen den vernetzten und nicht vernetzten Kristallen bei (spektrophotometrischen) Untersuchungen durch Prüfen der Spaltung des Dipeptidsubstrats FAGLA (nachstehend beschrieben). Außerdem stabilisiert die Vernetzung die CLECs bis zu dem Zeitpunkt, zu dem sie gefriergetrocknet werden können, wobei die volle enzymatische Wirksamkeit nach Wiederauflösen in wässrigen, organischen und gemischten wässrigen-organischen Lösungsmitteln beibehalten wird, wie in **Abb.** 1 und Tabelle 8 gezeigt. Obwohl die Kristallisation eine 30%ige Abnahme in der spezifischen Aktivität des CLEC-Proteins, verglichen mit löslichem Thermolysin, ergab, vermindern Vernetzen und Gefriertrocknen der CLECs die spezifische Aktivität nicht weiter.

Tabelle 8 – Thermolysinaktivität

		Extinktion bei 345 nm	
Zeit (min)		CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	0.314	0.315
2	1.0	0.272	0.271
3	3.0	0.235	0.218
4	5.0	0.204	0.198
5	10.0	0.184	0.185
6	15.0	0.183	0.184

Enzymatische Aktivität von löslichem und CLEC-Thermolysin

[0094] Die katalytische Aktivität von löslichem und CLEC Thermolysin wurde durch Hydrolyse des blockierten Dipeptidsubstrats Furylacryloyl-Glycyl-L-Leucin-Amid (FAGLA) (Schweizerhall) untersucht (Feder, J. und Schuck, J. M., Biochemistry 9: 2784 – 2791 (1970)). Die Spaltung der Amidbindung wurde spektrophotometrisch durch eine Abnahme der Extinktion bei 345 nm gemessen. Die anfängliche Enzymkonzentration betrug 10^{-7} M, bestimmt mit Bradford-Protein-Bestimmung und Abtastung mit einem Densitometer (Pharmacia LKB UltroScan XL) von Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gelen. Das CLEC Enzym wird als rekonstituierte gefriergetrocknete vernetzte Thermolysinkristalle definiert. Das lösliche Enzym ist als auf 100 mg/ml konzentriertes Thermolysin definiert. Das Enzym wurde zu 5 ml Reaktionsvolumen, welches Substrat enthielt, gegeben. Teile des Reaktionsgemisches wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und die Extinktion bei 345 nm gemessen. CLEC Thermolysin wurde vom Reaktionsgemisch durch kurze Zentrifugation (Beckman, Mikrozentrifuge E) vor Ablesen der Extinktion abgetrennt. Die Extinktion wurde mit einer Gleichung Pseudo-erster Ordnung angepaßt und kcat/Km durch Teilen des angepaßten Werts durch die Enzymkonzentration berechnet (Multtifit 2.0 Curve Fitting for the Apple Macintosh Computer, Day Computing P.O. Box 327, Milton, Cambridge CB4 6WL, U.K. (1990)).

Abhängigkeit vom pH-Wert und Stabilität

[0095] Der optimale pH-Wert und die Stabiltiät des löslichen Enzyms wurden mit den Werten von Thermolysin CLEC durch Spaltung des Dipeptidsubstrats FAGLA verglichen. Die Ergebnisse sind in **Abb.** 2 und Tabelle 9 gezeigt. Sowohl lösliche als auch kristalline Enzymformen zeigen eine maximale Aktivität bei pH-Wert 7. Die CLECs und lösliches Thermolysin zeigten auch ähnliche Aktivität im sauren Bereich und das glockenförmige pH-Profil, das durch das lösliche Enzym erzeugt wurde, war in guter Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten (Feder, J. und Schuk, J. M., Biochemistry 9: 2784–2791 (1970)). Im alkalischen pH-Bereich behält das kristalline Enzym jedoch maximale Aktivität bis zu pH-Wert 10 bei, während das lösliche Enzym 75% Aktivität bei pH-Wert 8,5 und nur 25% Aktivität bei pH-Wert 9 aufweist. Bei pH-Wert 9,5 ist das lösliche Enzym vollständig inaktiv.

Tabelle 9 – pH-Kurve von Thermolysin

		% Maximale Aktivität	
	pH-Wert	CLEC	Lösliches Enzym
1	5.0	10.250	5.170
2	5.5	9.750	6.070
3	6.0	52.500	39.100
4	6.5	85.000	74.610
5	7.0	97.500	100.000
6	7.5	100.000	98.650
7	8.0	97.500	82.920
8	8.5	95.000	71.910
9	9.0	96.250	24.720
10	9.5	95.000	0.000
11	10.0	90.000	0.000

Stabilität bei erhöhter Temperatur

[0096] Höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und kürzere Diffusionszeiten können für Substrate und Produkte unter Durchführen eines bestimmten chemischen Verfahrens bei höherer Temperatur erreicht werden, wobei das üblicherweise durch die Temperaturstabilität von Substraten und Produkten beschränkt ist. In der Katalyse

auf Enzymbasis ist es häufig der Verlust an enzymatischer Aktivität, der der Temperatur, bei der das Verfahren durchgeführt werden kann, die praktische Grenze setzt. Die in den CLECs erreichte zusätzliche Stabilisierung ermöglicht eine enzymatische Aktivität bei viel höheren Temperaturen als für das lösliche Enzym möglich.

[0097] Die erhöhte Stabilität bei geringeren Temperaturen vereinfacht die gewöhnliche Langzeitlagerung der CLEC-Katalysatoren. Zum Beispiel war es erforderlich, konzentrierte (>50 mg/ml) Lösungen von löslichem Thermolysin bei –80°C zu lagern, um maximale spezifische Aktivität beizubehalten. Bei Raumtemperatur ging die Aktivität üblicherweise innerhalb eines Tages verloren. Im Gegensatz dazu konnten rehydratisierte Thermolysin CLECs gewöhnlich ohne erkennbaren Verlust der Aktivität für Monate bei Raumtemperatur gelagert werden. Nicht rekonstituierte gefriergetrocknete CLECs von Thermolysin scheinen unendlich lebensfähig zu sein.

[0098] Die thermische Stabilität und Beständigkeit gegen Autolyse wurden in Thermolysin CLECs nach Inkubation bei 65°C für fünf hintereinanderfolgende Tage (**Abb.** 3 und Tabelle 10) gezeigt. Thermolysin CLECs behielten die maximale Aktivität nach fünf Tagen Inkubation bei erhöhter Temperatur bei. Im Gegensatz dazu verlor lösliches Thermolysin 50% seiner anfänglichen Aktivität nach nur zwei Stunden Inkubation und zeigte vernachlässigbare Aktivität nach 24 Stunden Inkubation bei 65°C.

Tabelle 10 – Thermische Stabilität von Thermolysin bei 65°C

	% Maximale Aktivität		
	Zeit (Tage)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.000	100.000	100.000
2	0.041		70.000
3	0.083	96.000	50.000
4	0.164		32.000
5	0.246		17.000
6	0.410	97.0	10.000
7	1.000	101.0	2.000
8	2.000	97.0	
9	3.000	94.0	
10	4.000	96.0	
11	5.000	92.0	

[0099] Die Aktivität von löslichem und CLEC Thermolysin wurde nach Inkubation bei 65°C gemessen. Lösliches Thermolysin wurde in 10 mM Calciumacetat, 50 mM Tris mit pH-Wert 7,0 in einem Wasserbad mit 65°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Die endgültige Proteinkonzentration betrug 10 mg/ml. Aliquots wurden zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 6, 10 und 18 Stunden entnommen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und FAGLA-Spaltung bei Raumtemperatur wie vorstehend beschrieben untersucht. Für die Thermolysin CLEC wurden 250 µl Kristallsuspension in 10 mM Calciumacetat und 50 mM Tris ebenfalls in einem Wasserbad bei 65°C inkubiert. Die Aktivität wurde zu den Zeitpunkten 0, 1, 6, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden durch FAGLA-Spaltung untersucht.

Beständigkeit gegen exogene Proteolyse

[0100] Eine Untersuchung der Beständigkeit von Thermolysin CLEC gegen die Wirkung einer exogenen Protease wurde ebenfalls durchgeführt. SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfonat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)-Analyse zeigt, dass die kommerziellen Enzyme einen wesentlichen Prozentsatz an Verunreinigungen enthalten können, von denen einige proteolytische Wirksamkeit gegen die hauptsächlich löslichen Enzymarten aufweisen könnten. Man konnte annehmen, dass beim Packen der Enzymmoleküle in ein Kristallgitter die inneren Enzymmoleküle in einem CLEC vor Proteolyse geschützt sind. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Thermolysin CLECs und ein lösliches Enzympräparat in Gegenwart von Streptococcen-Protease Pronase®, einer nicht spezifischen Protease, inkubiert, die dazu in der Lage ist, die meisten Proteine in freie Ami-

nosäuren abzubauen (Calbiochem 1990 Catalog; LaJolla, CA).

[0101] Lösliches und CLEC Thermolysin wurden in 50 mM Tris mit pH-Wert 7,5 bei 40°C in Gegenwart der Protease Pronase® (Calbiochem) inkubiert. Das Verhältnis von Pronase® zu Thermolysin betrug 1/40. Um die Thermolysin-Autolyse zu hemmen und die proteolytische Zersetzung der Pronase durch das Thermolysin zu verhindern, wurde EDTA zur löslichen Enzymreaktion bis zu einer Endkonzentration von 100 mM gegeben (EDTA hemmt die Thermolysin-Aktivität aber nicht Pronase®). Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots aus dem Reaktionsgemisch entnommen und die Aktivität spektrophotometrisch durch Spaltung der Dipeptidsubstrate FAGLA untersucht. Um die Hemmung von Thermolysin durch das Vorhandensein von EDTA zu kompensieren, wurde die spektrophotometrische Untersuchung der löslichen Enzymaktivität in 0,5 M Calciumacetatpuffer mit pH-Wert 7,0 durchgeführt und die Enzymkonzentration zweifach erhöht. Das vernetzte kristalline Enzym wurde wie vorstehend beschrieben untersucht.

[0102] Wie aus **Abb.** 4 und Tabelle 11 ersichtlich, wurde das lösliche Thermolysin schnell zersetzt und verlor die gesamte Aktivität nach 90 Minuten Inkubation. Im Gegensatz dazu war die Aktivität von Thermolysin CLEC durch vier Tage Inkubation in Gegenwart von Protease nicht beeinträchtigt. Diese nahezu Unempfindlichkeit gegenüber Proteolyse ist von besonderem Interesse in diagnostischen Biosensoranwendungen, bei denen ein geeignetes CLEC in Gegenwart eines unbekannten Cocktails natürlich vorkommender proteolytischer Enzyme wirken müsste.

Tabelle 11

Proteasebeständigkeit

	Zeit	% Maximale Aktivität		Zeit
	(Tage)	CLEC	Lösliches Enzym	(min)
1	0.000	100.0	100.0	0.000
2	0.003		25.0	5.000
3	0.010		17.5	15.000
4	0.021		9.5	30.000
5	0.042	98.0	3.0	60.000
6	0.063		1.0	90.000
7	0.084	101.0	0.0	
8	1.000	97.0		
9	2.000	99.0		
10	3.000	98.0		
11	4.000	96.0		

Stabilität in Gegenwart von organischem Lösungsmittel

[0103] Damit die Enzyme ideale Akzeptanz als lebensfähige industrielle Katalysatoren erreichen, müssen sie in der Lage sein, ohne übermäßige Eingriffe in die praktische Umgebung der Herstellungsverfahren zu funktionieren. Insbesondere würde das die Verwendung von wässrigen, polaren und nicht polaren organischen Lösungsmitteln und Gemischen von diesen einschließen. In kommerziellen Anwendungen ermöglichen wässrig-organische Lösungsmittelgemische die Steuerung der Produktbildung unter Ausnutzen der relativen Löslichkeiten der Produkte und Substrate.

[0104] Lösliches Thermolysin und Thermolysin CLECs zeigten deutlich unterschiedliche Stabilität in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (Tabelle 12). Lösliche Enzymkonzentrationen, die in organischem Lösungsmittel inkubiert werden konnten, waren auf ein Maximum von 10 mg/ml beschränkt. Größere Konzentrationen als dieser Wert ergaben die sofortige Ausfällung von Thermolysin nach Zugabe von organischem Lösungsmittel. Im Gegensatz dazu wurden die Konzentrationen an Thermolysin CLEC nur durch das von den Kristallen eingenommene Volumen beschränkt. Lösliches Thermolysin behielt seine größte Aktivität (75%)

nach Inkubation in Aceton und die geringste (36%) in Tetrahydrofuran bei. Nach einer Stunde Inkubation in Gegenwart von Acetonitril oder Dioxan verlor das lösliche Enzym etwa 50% seiner anfänglichen Aktivität. Das CLEC Thermolysin behielt mehr als 95% maximale Aktivität nach Inkubation mit allen untersuchten organischen Lösungsmitteln bei.

Tabelle 12

	% Maximale Aktivität	
	Lösliches Enzym	CLEC
Acetonitril	42	102
Dioxan	66	97
Aceton	75	99
THF*	36	96

* Tetrahydrofuran

Stabilität in organischen Lösungsmitteln

[0105] Thermolysin CLECs oder lösliche Thermolysinpräparate wurden in 50%igen (V/V) Lösungen der angegebenen organischen Lösungsmittel inkubiert. 100 µl Aufschlämmung von Thermolysin CLECs (10 mg/ml) in 10 mM Tris mit pH-Wert 7 wurde in eine Glasampulle mit einem Volumen von 1/2 dram gegeben. Ein gleiches Volumen des angegebenen organischen Lösungsmittels wurde zugegeben und das Gemisch kurz verwirbelt. 20 µl lösliches Thermolysin (100 mg/ml) wurden in 80 µl 0,015 M Tris-Puffer mit pH-Wert 7,0 in einer Glasampulle mit einem Volumen von 1/2 dram verdünnt. 100 µl des organischen Lösungsmittels wurden dann zu der Proteinlösung gegeben und kurz verwirbelt. Die CLEC und das lösliche Enzym wurden in Gegenwart des organischen Lösungsmittels eine Stunde bei 40°C inkubiert. Nach Inkubation wurde die Enzymaktivität durch Spaltung des Dipeptidsubstras FAGLA wie beschrieben untersucht.

[0106] Es wird angenommen, dass geringe Wasserkonzentration die Entfaltung von Zwischenzuständen auf dem Weg zur Enzymdenaturierung benachteiligt. In den CLECs wird diese Beschränkung der Konformationsbeweglichkeit durch die intermolekularen Kontakte und Vernetzungen zwischen den aufbauenden Enzymmolekülen bereitgestellt, die das Kristallgitterbilden, und nicht durch das beinahe Fehlen von Wasser im Medium. Als Ergebnis werden dazwischenliegende Konzentrationen von Wasser und organischem Lösungsmittel ohne Weiteres durch die Enzyme toleriert, wenn sie als CLECs formuliert werden, etwas, was vorher mit Enzymen nicht beobachtet wurde (siehe Tabelle 12). Diese Entdeckung öffnet vollständig neue Bereiche der Synthesechemie der Produktion unter Verwendung von Enzymkatalyse.

[0107] Gerade in nahezu wasserfreien organischen Lösungsmitteln wurde jedoch die Routineverwendung von Enzymen durch ihre Neigung behindert, schlecht definierte Suspensionen zu bilden, die der Klumpung und anderen Aggregationsproblemen unterliegen. Diese Eigenschaft macht diese Präparate inhärent unattraktiv für großformatige Industrieverfahren. Im Gegensatz dazu bleiben CLECs und die aufbauenden Enzyme im Kristallgitter in all diesen Lösungsmitteln monodispers.

Vergleich mit anderen Verfahren zur Immobilisierung

[0108] Eine Reihe nützlicher Berichte von Verfahren zur Enzymimmobilisierung erschien in der Literatur (Maugh, T. H., Science, 223: 474–476 (1984)); Tramper, J. Trends in Biotechnology 3: 45–50 (1985)). In diesen stellt das Enzym immer einen kleinen Anteil des Gesamtvolumens des immobilisierten Teilchens dar, wobei die Masse davon inertes Trägermaterial ist. Der Träger erhöht den mittleren freien Weg zwischen dem äußeren des Lösungsmittels des immobilisierten Enzymteilchens und den aktiven Stellen des Enzyms, wobei die Diffusionsprobleme verstärkt werden (Quiocho, F. A. und Richards, F. M., Biochemistry 5: 4062–4076 (1967)).

[0109] In einem CLEC stellt die vernetzte Kristallmatrix ihren eigenen Träger bereit, wodurch ein Träger nicht mehr erforderlich ist. Als Ergebnis ist die Konzentration des Enzyms in einem CLEC nahe der theoretischen

Packungsgrenze, die für Moleküle mit einer festgelegten Größe erreicht werden kann, wobei die Dichten in großem Maße überstiegen werden, die auch in konzentrierten Lösungen erreichbar sind. Der gesamte CLEC besteht aus dem aktiven Enzym, und so wird eine mit der Diffusion verbundene Verringerung von Enzymreaktionsgeschwindigkeiten, die üblicherweise bei herkömmlich immobilisierten Enzymen beobachtet werden, relativ zu Enzymen in Lösung minimiert (siehe **Abb.** 1), da der mittlere freie Weg für das Substrat und Produkt zwischen dem aktiven Enzym und freien Lösungsmittel für CLEC in starkem Maße verkürzt wird (verglichen mit herkömmilichen immobilisierten Enzymträgerteilchen). Es ist wesentlich, dass das aufbauende Enzym in CLEC intrinsisch monodispers ist und mit einfachen Handhabungen der CLEC-Teilchen, wie Filtration, Zentrifugation oder Dekantieren des Lösungsmittels, zurückgewonnen werden kann.

Beispiel 3

Kristallisation Vernetzung und Gefriertrocknen von Elastase und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Elastase

[0110] Gefriergetrocknete Elastase aus Schweinebauchspeicheldrüse (Serva) wurde in 0,1 M Natriumacetat mit pH-Wert 5,0 mit einer Konzentration von 5 mg/ml (G/V) bei Raumtemperatur gelöst. Stabförmige Elastasekristalle waren innerhalb einer Minute der vollständigen Solvation des Proteins sichtbar. Die Kristallisationslösung wurde auf 4°C abgekühlt und man ließ die Kristallisation über Nacht vollständig vonstatten gehen. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation wie vorstehend beschrieben erhalten.

Vernetzung von Elastasekristallen

[0111] Ein Volumen von 200 µl Elastasekristallen wurden zu 1,3 ml einer Lösung von 5,77% Glutaraldehyd und 1,5 M Natriumacetat mit pH-Wert 5,0 gegeben. Die Kristalle wurden eine Stunde unter leichtem Rühren (Schüttelplatte) vernetzt. Nach Vernetzen wurden die Kristalle mit drei Volumina von jeweils 15 ml 0,2 M Tris mit pH-Wert 8,0 gewaschen. Die Elastase CLEC wurden wie in Beispiel 2 beschrieben gefriergetrocknet.

Enzymatische Aktivität von löslicher und CLEC Elastase

[0112] Die katalytische Aktivität von löslicher und CLEC Elastase wurde spektrophotometrisch durch Messen der Hydrolyse des Substrats Succinyl-$(Ala)_3$-p-Nitroanilid (Bachem) [Bieth, et al. Biochem. Med 11: 350–357 (1974)] untersucht (Tabelle 13, **Abb.** 5). Die Spaltung wurde durch Zunahme der Extinktion bei 410 nm untersucht. Die anfängliche Substratkonzentration betrug 2×10^{-4}. Die Enzymkonzentration betrug $2{,}8 \times 10^{-7}$ M. CLEC oder lösliches Enzym wurde zu einem Reaktionsvolumen von 5 ml gegeben, das das Substrat in 0,2 M Tris mit pH-Wert 8,0 enthielt. Wie vorstehend beschrieben wurde das CLEC Enzym aus dem Reaktionsgemisch vor Messen der Extinktion entfernt.

Tabelle 13 – Elastaseaktivität

		Extinktion 400 nm	
	Zeit (min)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	0.000	0.000
2	0.5	0.103	0.205
3	1.0	0.195	0.390
4	2.0	0.366	0.672
5	3.0	0.523	0.923
6	4.0	0.657	1.098
7	5.0	0.780	1.227
8	6.0	0.888	1.326
9	7.0	0.974	1.393
10	10.0	1.170	1.512
11	15.0	1.365	1.586

Beständigkeit gegen exogene Proteolyse

[0113] Eine Untersuchung der Beständigkeit der Elastase CLEC gegenüber der Wirkung von Protease wurde ebenfalls unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wie für Thermolysin (Beispiel 2) beschrieben. Die Aktivität des löslichen und CLEC Enzyms nach Inkubation mit Protease wurde durch Hydrolyse des Nitroanilidsubstrats wie vorstehend beschrieben untersucht (Tabelle 14 und **Abb.** 6).

Tabelle 14 – Beständigkeit von Elastase gegen Proteolyse

		% Maximale Aktivität	
	Zeit	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	100.0	100.0
2	10.0		53.0
3	20.0		32.0
4	30.0	101.0	18.0
5	45.0		11.0
6	60.0	102.0	8.0
7	120.0	101.0	3.0
8	180.0	103.0	2.0

Beispiel 4

Kristallisation Vernetzung und Gefriertrocknen von Esterase und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Esterase

[0114] Wie hier offenbart, wurden 30 mg/ml Ammoniumsulfatsuspension von Schweineleberesterase (Fluka) in 0,25 M Calciumacetat mit pH-Wert 5,6 bei Raumtemperatur gelöst. Die Esterasekristalle waren innerhalb einiger Minuten nach Zugabe der Calciumacetatlösung sichtbar. Die Kristallisationslösung wurde bei Raumtemperatur stehengelassen, und die Kristallisation war über Nacht vollständig. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben erhalten.

Vernetzung von Esterasekristallen

[0115] Wie hier offenbart, wurden ein Volumen von 300 µl Esterasekristallen zu 5 ml einer Lösung von 12,5% Glutaraldehyd und 0,5 M Natriumacetat mit pH-Wert 5,5 gegeben. Die Kristalle wurden eine Stunde unter leichtem Rühren (Schüttelplatte) vernetzt. Nach Vernetzen wurden die Kristalle mit drei Volumina von jeweils 15 ml 0,5 M Calciumacetat mit pH-Wert 6,3 gewaschen. Die Esterase CLEC wurden wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben gefriergetrocknet.

Enzymatische Aktivität von löslicher und CLEC Esterase

[0116] Die katalytische Aktivität von löslicher und CLEC Esterase wurde spektrophotometrisch durch Messen der Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenylacetat (Fluka) untersucht (Tabelle 15 und **Abb.** 7). Die Spaltung wurde durch Zunahme der Extinktion bei 400 nm untersucht. Die anfängliche Substratkonzentration betrug 0,001%. Die Enzymkonzentration betrug 1×10^{-8} M. CLEC oder lösliches Enzym wurde zu einem Reaktionsvolumen von 5 ml gegeben, das das Substrat in 0,25 M Calciumacetat mit pH-Wert 6,3 enthielt. Wie in Beispiel 2 beschrieben wurde das CLEC Enzym durch Zentrifugation aus dem Reaktionsgemisch vor Messen der Extinktion entfernt.

Tabelle 15 – Esteraseaktivität

		Extinktion 400 nm	
	Zeit (min)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	0.000	0.000
2	0.5	0.770	0.252
3	1.0	0.128	0.297
4	2.0	0.208	0.337
5	3.0	0.260	0.346
6	5.0	0.324	0.353
7	7.0	0.353	0.359
8	10.0	0.369	0.368

Beständigkeit gegen exogene Proteolyse

[0117] Eine Untersuchung der Beständigkeit der Esterase CLEC gegenüber der Wirkung von Protease wurden ebenfalls unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wie für Thermolysin (Beispiel 2) beschrieben. Die Aktivität des löslichen und CLEC Enzyms nach Inkubation mit Protease wurde durch Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenylacetat wie vorstehend beschrieben untersucht (Tabelle 16 und **Abb.** 8).

Tabelle 16 – Beständigkeit von Esterase gegen Proteolyse

		% Maximale Aktivität	
	Zeit (min)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	100.0	100.0
2	10.0		68.0
3	20.0		47.0
4	30.0	99.0	25.0
5	45.0		20.0
6	60.0	97.0	16.0
7	120.0	94.0	10.0
8	180.0	91.0	6.0

Beispiel 5

Kristallisation Vernetzung und Gefriertrocknen von Lipase und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Lipase

[0118] Wie hier offenbart, wurde die Enzymlipase (Geotrichum candidum) durch Dampfdiffusion aus einer wässrigen Lösung von 20 mg/ml Protein in 50 mM Tris mit pH-Wert 7, die 8% Ammoniumsulfat enthielt, kristallisiert. Bipyramidale Kristalle waren nach 20 bis 30 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur sichtbar. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation wie vorstehend beschrieben erhalten.

Veretzung von Lipasekristallen

[0119] Wie hier offenbart, wurden Lipasekristalle zu einer Lösung von 12,5% Glutaraldehyd und 50 mM Tris mit pH-Wert 5,6 gegeben. Die Kristalle wurden eine Stunde vernetzt. Nach Vernetzen wurden die Kristalle mit drei Volumina von jeweils 15 ml 50 mM Tris mit pH-Wert 7,0 gewaschen. Die Lipase CLEC wurden wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben gefriergetrocknet.

Enzymatische Aktivität von löslicher und CLEC Lipase

[0120] Die katalytische Aktivität von löslicher und CLEC Lipase wurde spektrophotometrisch durch Messen der Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenylacetat untersucht (Tabelle 17 und **Abb.** 9). Die Spaltung wurde durch Zunahme der Extinktion bei 400 nm untersucht. Die anfängliche Substratkonzentration betrug 0,005%. Die Enzymkonzentration betrug $1,5 \times 10^{-8}$ M. CLEC oder lösliches Enzym wurde zu einem Reaktionsvolumen von 5 ml gegeben, das das Substrat in 0,2 M Tris mit pH-Wert 7,0 bei Raumtemperatur enthielt. Wie in Beispiel 2 beschrieben wurde das CLEC Enzym durch Zentrifugation aus dem Reaktionsgemisch vor Messen der Extinktion entfernt.

Tabelle 17 – Lipaseaktivität

	Zeit (min)	Extinktion 400 nm CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	0.000	0.000
2	1.0	0.013	0.021
3	5.0	0.094	0.116
4	10.0	0.164	0.186
5	15.0	0.248	0.258
6	30.0	0.346	0.357
7	45.0	0.407	0.420
8	60.0	0.461	0.459
9	90.0	0.497	0.502

Beispiel 6

Kristallisation Vernetzung und Gefriertrocknen von Lysozym und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Lysozym

[0121] Nach dem Verfahren von Blake, C. C. F. et al, Nature 196: 1173 (1962) wurden 200 mg gefriergetrocknetes Hühnereiweiß-Lysozym (Boehringer Mannheim) in 2,5 ml 0,04 M Natriumacetatpuffer mit pH-Wert 4,7 bei Raumtemperatur gelöst. Nach Solvatation des Proteins wurden tropfenweise 2,5 ml 10%iges Natriumchlorid zur Lysozymlösung unter Rühren zugegeben. Die Kristallisationslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen und die Kristallisation war innerhalb 48 Stunden vollständig. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben erhalten.

Vernetzueng von Lysozymkristallen

[0122] Wie hier beschrieben wurde ein Volumen von 500 µl Lysozymkristallen zu 10 ml 24% Glutaraldehyd und 50 mM Tris mit pH-Wert 5,6 gegeben, der 20% Natriumchlorid enthielt. Die Kristalle wurden 20 Minuten unter leichtem Rühren (Schüttelplatte) vernetzt. Nach Vernetzen wurden die Kristalle mit drei Volumina von jeweils 50 ml 20 mM Calciumacetat und 50 mM Kaliumchlorid mit pH-Wert 5,3 gewaschen. Die Lysozym CLEC wurden wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben gefriergetrocknet.

Enzymatische Aktivität von löslichem und CLEC Lysozym

[0123] Die katalytische Aktivität von löslichem und CLEC Lysozym wurde spektrophotometrisch durch Messen der Geschwindigkeit der Hydrolyse des Substrats 4-Methylumbelliferyl-N-acetylchitriosid (Fluka) untersucht (Yang, Y. und Hamaguchi, K. J. Biochem. 8: 1003–1014 (1980)) (Tabelle 18 und **Abb.** 10). Die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon wurde fluorometrisch (Perkin Elmer Modell LS-50) verfolgt. Die anfängliche Substratkonzentration betrug $1{,}42 \times 10^{-3}$. Die Enzymkonzentration betrug 3×10^{-7}. CLEC oder lösliches Enzym wurde zu einem Reaktionsvolumen von 2 ml gegeben, das das Substrat in 20 mM Calciumacetat und 50 mM Kaliumchlorid mit pH-Wert 5,3 bei 42°C enthielt. Die Menge an 4-Methylumbelliferon wurde fluorometrisch durch Messen der Fluoreszenzintensitäten bei 450 nm unter Anregen bei 360 nm untersucht. Die Schlitzbreite für sowohl Anregung als auch Emission betrug 10 mm. Wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben wurde das CLEC Enzym durch Zentrifugation aus dem Reaktionsgemisch vor Messen der Fluoreszenz entfernt.

Tabelle 18 – Lysozymaktivität

Fluoreszenz

	Zeit (min)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.000	0.000	0.000
2	10.000	4.400	18.900
3	30.000	10.500	29.400
4	60.000	27.500	44.800
5	90.000	33.800	51.700
6	120.000	45.900	59.800

Beispiel 7

Kristallisation Vernetzung und Gefriertrocknen von Asparaginase und Untersuchung der Eigenschaften des erhaltenen Produkts

Kristallisation von Asparaginase

[0124] Als Abänderung des von Grabner et al. [U.S.-Patent 3,664,926 (1972)] beschriebenen Verfahrens wurden 25 mg gefriergetrocknete Asparaginase (Worthington) in 500 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer mit pH-Wert 7,2 gelöst. Die Lösung wurde auf 4°C abgekühlt und der pH-Wert mit 1 M Essigsäure auf 5,0 eingestellt. Kaltes (–20°C) Ethanol wurde dann zur Asparaginaselösung bis zu einer Endkonzentration von 33% tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde bei 4°C inkubiert. Die Kristallisation war innerhalb 48 Stunden vollständig. Die Kristalle wurden durch Zentrifugation wie vorstehend beschrieben erhalten.

Vernetzung von Asparaginasekristallen

[0125] Wie hier offenbart, wurden Asparaginasekristalle in einer Lösung von 7,5% Glutaraldehyd in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit pH-Wert 5,6 vernetzt. Nach Vernetzen wurden die Kristalle mit fünf Volumina von jeweils 15 ml 50 mM Tris mit pH-Wert 7,0 gewaschen. Die Asparaginase CLEC wurden wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben gefriergetrocknet.

Enzymatische Aktivität von löslicher und CLEC Asparaginase

[0126] Die katalytische Aktivität von löslicher und CLEC Asparaginase wurde spektrophotometrisch durch Messen der Entwicklung von Ammoniumionen in der nachstehend beschriebenen gekoppelten enzymatischen Reaktion untersucht (alle Reagenzien wurden von Boehringer Mannheim erworben) (Tabelle 19 und **Abb.** 11).

$$\text{L-Asparagin} \xrightarrow{\text{Asparaginase}} \text{Aspartat} + NH_4^+$$

$$NH_4^+ + \text{NADH} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{Glutamatdehydrogenase}} \text{Glutaminsäure} + NAD^+$$

[0127] Die Oxidation von NADH wurde durch Abnahme der Extinktion bei 340 nm gemessen. Die anfängliche NADH-Konzentration betrug 1,4 mg/ml. Die Asparaginkonzentration betrug 10^{-3} M. Die α-Ketoglutarat-Konzentration betrug 10^{-4} M. Die Glutamatdehydrogenase-Konzentration betrug 10^{-7} M. Die Asparaginasekonzentration betrug $2{,}3 \times 10^{-8}$ M. Wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben wurde das CLEC-Enzym aus dem Reaktionsgemisch durch Zentrifugation vor Messen der Extinktion entfernt.

Tabelle 19 – Asparaginaseaktivität

		Extinktion 340 nm	
	Zeit (min)	CLEC	Lösliches Enzym
1	0.0	1.000	1.000
2	1.0	0.867	0.825
3	3.0	0.739	0.684
4	5.0	0.603	0.538
5	10.0	0.502	0.406
6	15.0	0.449	0.338
7	30.0	0.328	0.199
8	45.0	0.211	0.187

Patentansprüche

1. Enzymkristall, der mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel vernetzt ist, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pyridoxalphosphatenzymen, Metallenzymen, Enzymen, die CoA benötigen, und Sulfurasen (PAPS).

2. Enzymkristall, der mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel vernetzt ist, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thermolysin, Nitrilase, Aminocyclase und Hydantoinase.

3. Vernetzter Enzymkristall nach Anspruch 2, wobei das Enzym Thermolysin ist.

4. Enzymkristall, der mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel vernetzt ist, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Elastase, Aminopeptidase, Asparaginase, Glutaminase, Arginase, Urease, alkalischer Phosphatase, Lipase, vorzugsweise Phospholipase, β-Lactamase, ACL-Hydrolase, L-ACT-Hydrolase, Arylsulfatase, Glycosidase, vorzugsweise β-Galactosidase und β-Fructosidase, Penicillinacylase, Amidase, vorzugsweise Penicillinamidase, Aminosäureesterase, 5'-Phosphodiesterase, Nuclease und Creatindeiminase.

5. Vernetzter Enzymkristall nach Anspruch 4, wobei das Enzym Elastase ist.

6. Vernetzter Enzymkristall nach Anspruch 4, wobei das Enzym Asparaginase ist.

7. Vernetzter Enzymkristall nach Anspruch 4, wobei das Enzym Lipase ist.

8. Enzymkristall, der mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel vernetzt ist, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuredehydrogenase, Formiatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase, Hydroxysteroiddehydrogenase, Glucose-6-Pyruvatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase, Glucosedehydrogenase, Katalase, Superoxiddismutase, Peroxidase, Luciferase, Tyrosinase, Flavoenzym, Nitrat-/Nitritreductase, Oxidoreductase (NAD/P), Oxidase und Lyase.

9. Vernetzter Enzymkristall nach Anspruch 8, wobei die Oxidase Alkoholoxidase, Glucoseoxidase, Bilirubinoxidase, Lactatoxidase, Cholesteroloxidase oder L-Aminooxidase, und/oder die Lyase Aldolase, L-Asparatat-4-decarboxylase, Phenylalaninammoniumlyase, Carboanhydrase, Nitrilhydratase, L-Aspartase, Fumarase oder Heparinase ist.

10. Enzymkristall, vernetzt mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe

bestehend aus Kinase (ATP), vorzugsweise Kreatinkinase, Transaminase, Glycosyltransferase und Methyltransferase (SAM).

11. Enzymkristall, vernetzt mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus L-Tryptophansynthetase und Strictodinsynthetase.

12. Enzymkristall, vernetzt mit einem multifunktionalen Vernetzungsmittel, wobei der vernetzte Enzymkristall eine Resistenz gegen exogene Pronase™-Proteolyse hat, wobei das Enzym Esterase ist.

13. Vernetzter Enzymkristall nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Kristall ein Mikrokristall mit einem Querschnitt von ungefähr 10^{-1} mm ist.

14. Vernetzter Enzymkristall nach einem der Ansprüche 2, 4 oder 12, wobei der vernetzte Enzymkristall mindestens 91% seiner anfänglichen Aktivität nach einer Inkubation von 3 Stunden in Gegenwart einer Konzentration von Pronase™ behält, die bewirkt, dass die lösliche, nicht vernetzte Form des Enzyms, das kristallisiert wird, um den Enzymkristall zu bilden, der vernetzt wird, höchstens 6% ihrer anfänglichen Aktivität unter den gleichen Bedingungen behält, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Esterase, Elastase und Thermolysin.

15. Vernetzter Enzymkristall nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei der Quervernetzer Glutaraldehyd ist.

16. Vorrichtung, umfassend einen vernetzten Enzymkristall nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und ein Rückhaltemittel für den vernetzten Enzymkristall, wobei das Rückhaltemittel aus einem Material besteht, das einen Kontakt zwischen dem vernetzten Enzymkristall und dem Substrat erlaubt, auf das das Enzym wirkt, wobei das Substrat in einer Flüssigkeit vorhanden ist.

17. Biosensor zum Nachweis eines Analyten von Interesse in einer Flüssigkeit, umfassend:
a) einen vernetzten Enzymkristall nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das vorhandene Enzym auf den Analyten von Interesse oder auf einen Reaktionspartner in einer Reaktion wirkt, an der der Analyt von Interesse beteiligt ist; und
b) ein Rückhaltemittel für den vernetzten Enzymkristall, wobei das Rückhaltemittel aus einem Material besteht, das den Kontakt zwischen dem quervernetzen Enzymkristall und einer Flüssigkeit erlaubt, wobei die Flüssigkeit entweder (1) den Analyten, auf den das Enzym wirkt, oder (2) einen Reaktionspartner in einer Reaktion enthält, an der der Analyt beteiligt ist.

18. Biosensor nach Anspruch 17, wobei der Biosensor außerdem ein Nachweismittel umfasst.

19. Verwendung eines Biosensors nach Anspruch 17 oder 18 zum Nachweis eines Analyts von Interesse in einer Flüssigkeit, wobei der Analyt von Interesse ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Glucose, Kreatinin, Harnstoff, Lactat, Glucose-6-phosphat, Saccharose, ATP, Ethanol, Essigsäure, Ameisensäure, Cholesterin, Harnsäure, Methotrexat, Kohlendioxid, Aminosäuren, Phosphaten, Penicillinen, Nitraten, Nitriten, Sulphaten und Succinat.

20. Biosensor nach Anspruch 17, wobei der vernetzte Enzymkristall ein Luciferasekristall ist, wobei die Luciferase auf den Analyten von Interesse oder auf ein Produkt einer Reaktion wirkt, an dem der Analyt von Interesse beteiligt ist, und wobei das Rückhaltemittel aus einem Material besteht, das den Kontakt zwischen dem vernetzten Luciferasekristall und einer Flüssigkeit erlaubt, wobei die Flüssigkeit entweder (1) den Analyten, auf den die Luciferase wirkt, oder (2) das Produkt einer Reaktion enthält, an der der Analyt beteiligt ist.

21. Extrakorporale Vorrichtung zur Verwendung in der Änderung eines Bestandteils einer Flüssigkeit umfassend:
a) einen vernetzten Enzymkristall nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das vorliegende Enzym auf den Bestandteil oder auf einen Partner einer Reaktion wirkt, an der der Bestandteil beteiligt ist; und
b) ein Rückhaltemittel für den vernetzten Enzymkristall, wobei das Rückhaltemittel aus einem Material besteht, das den Kontakt zwischen dem quervernetzen Enzymkristall und einer Flüssigkeit erlaubt, wobei die Flüssigkeit entweder (1) den Bestandteil, auf den das Enzym wirkt oder (2) das Produkt einer Reaktion enthält, an der der Bestandteil beteiligt ist.

22. Verwendung einer extrakorporalen Vorrichtung nach Anspruch 21 zur Änderung eines Bestandteils einer Flüssigkeit, wobei der Bestandteil ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Asparagin, Heparin, Bilirubin, Methotrexat, Aminosäuren, Harnstoff und Ammoniak.

23. Vorrichtung zur Verwendung bei der Herstellung eines ausgewählten Produkts, umfassend ein Enzym in der Form eines vernetzten Enzymkristalls nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und ein Rückhaltemittel für den vernetzten Enzymkristall.

24. Verfahren zur Herstellung von Aspartam, umfassend die Schritte:
a) Kombinieren von zwei Peptiden und einem vernetzten Thermolysinkristall nach Anspruch 2, wobei das erste Peptid die Formel Z-L-Asp und das zweite Peptid die Formel L-Phe-OMe hat, unter Bedingungen, die geeignet sind zur Kondensation der zwei Peptide durch die Wirkung des vernetzten Thermolysinkristalls, wobei ein teilweise geschütztes Dipeptid der Formel Z-L-Asp-L-Phe-OMe hergestellt wird, wobei Z eine Benzyloxycarbonylgruppe ist, und
b) Entfernen der Benzyloxycarbonylgruppe aus dem Dipeptid, wobei Aspartam hergestellt wird.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

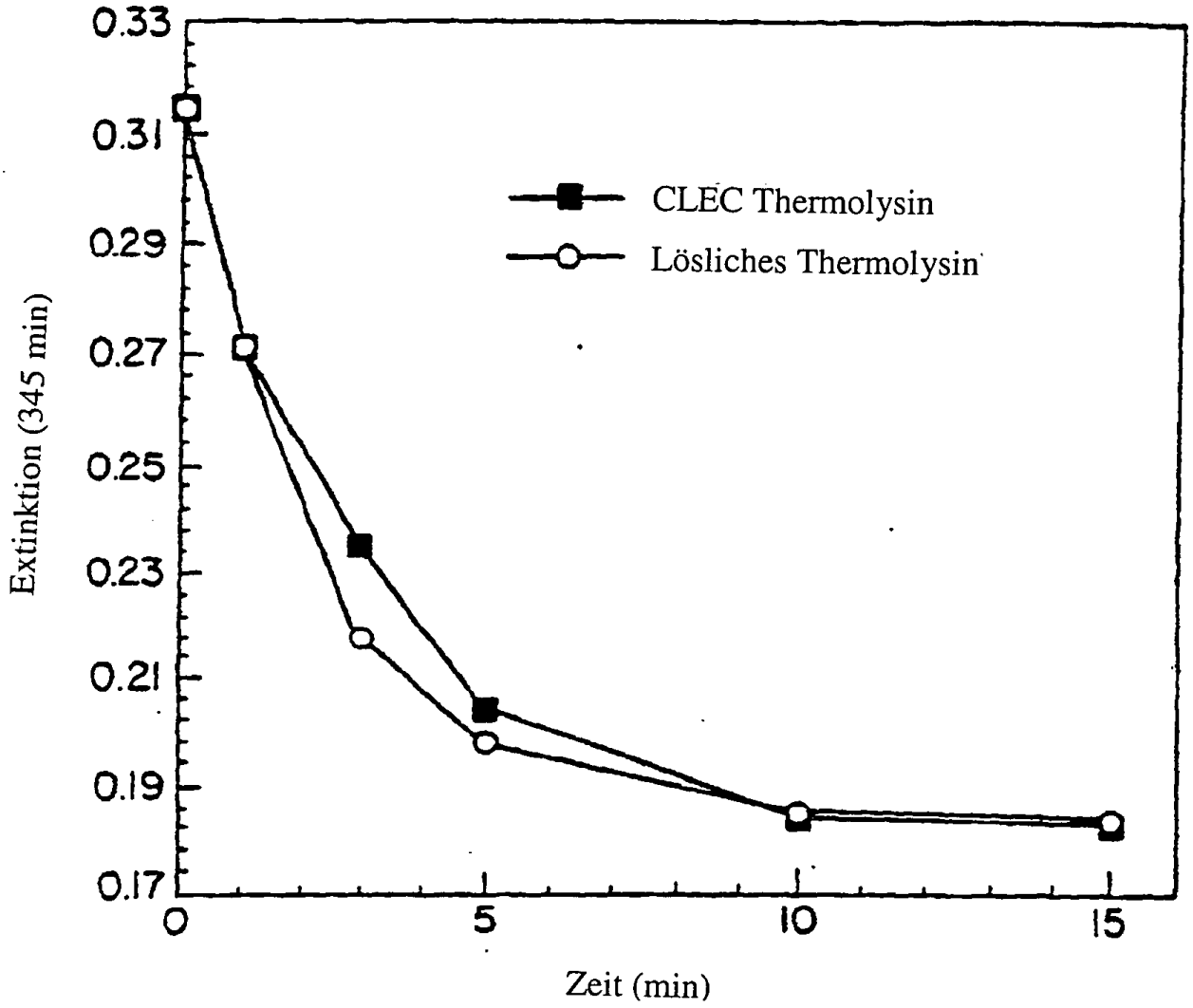


Abb. 1

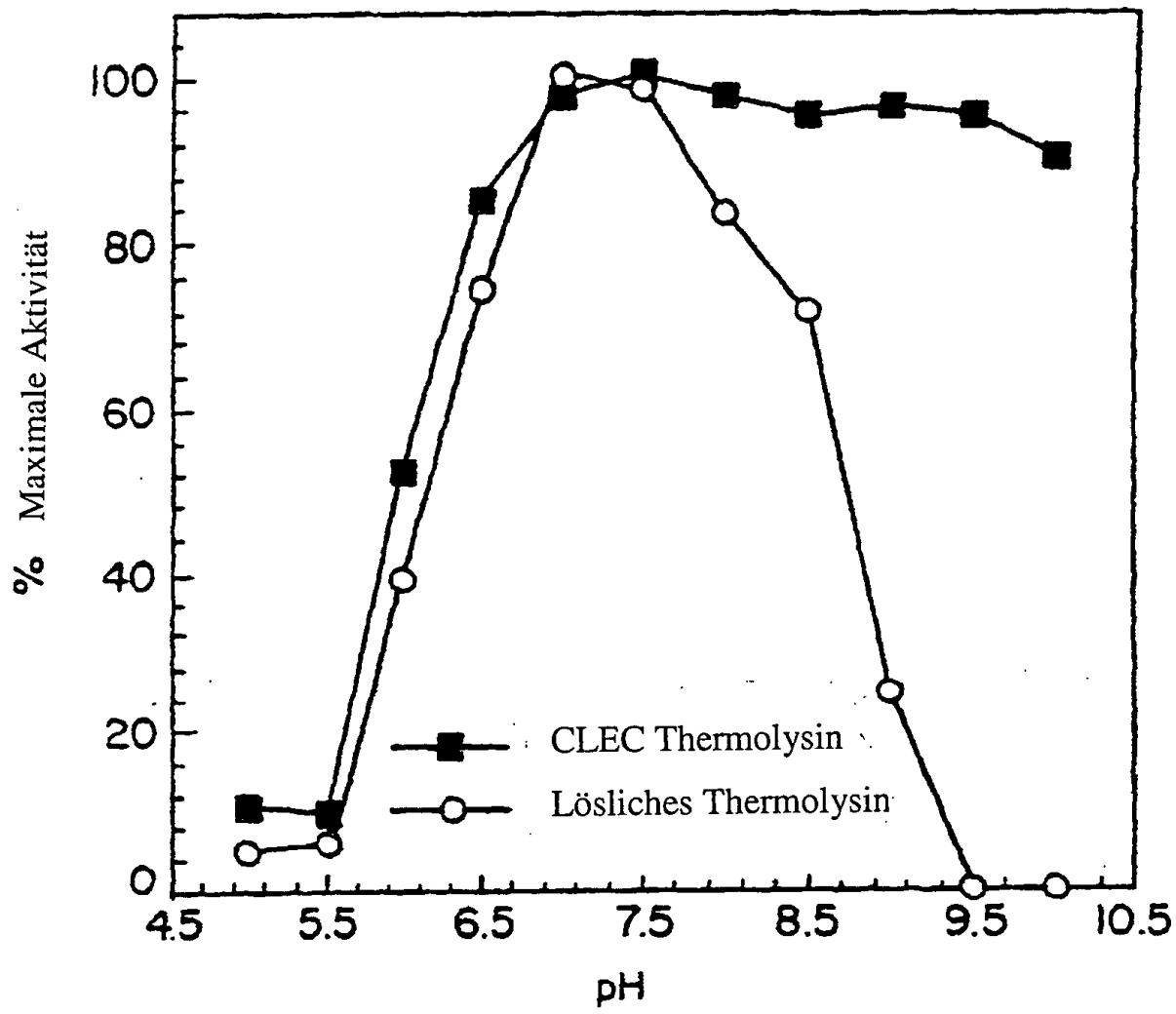

% Maximale Aktivität
100
80
60
40
20
0
4.5
5.5
6.5
7.5
8.5
9.5
10.5
pH
CLEC Thermolysin
Lösliches Thermolysin

Abb. 2

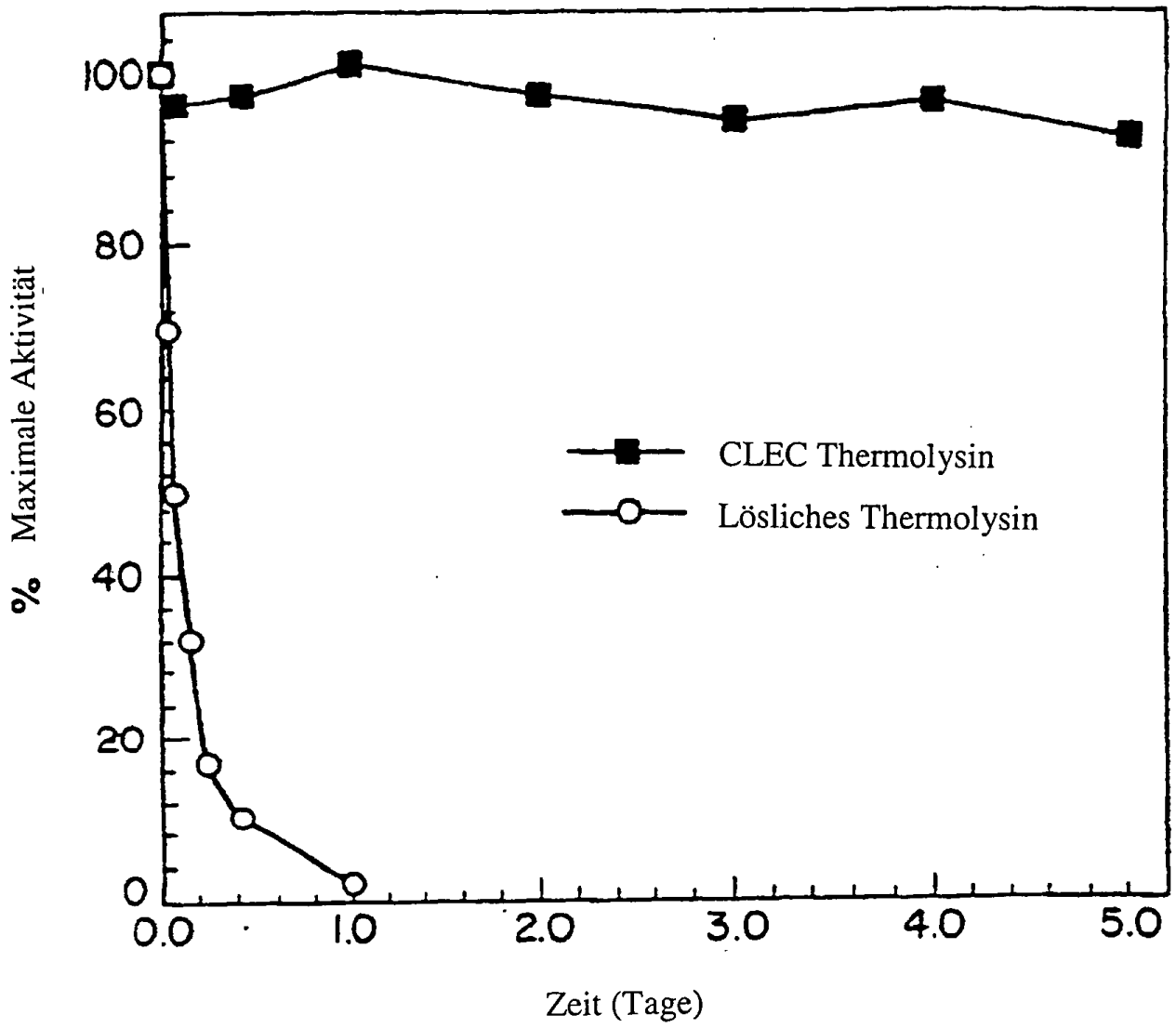

% Maximale Aktivität
100
80
60
40
20
0
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
CLEC Thermolysin
Lösliches Thermolysin
Zeit (Tage)

Abb. 3

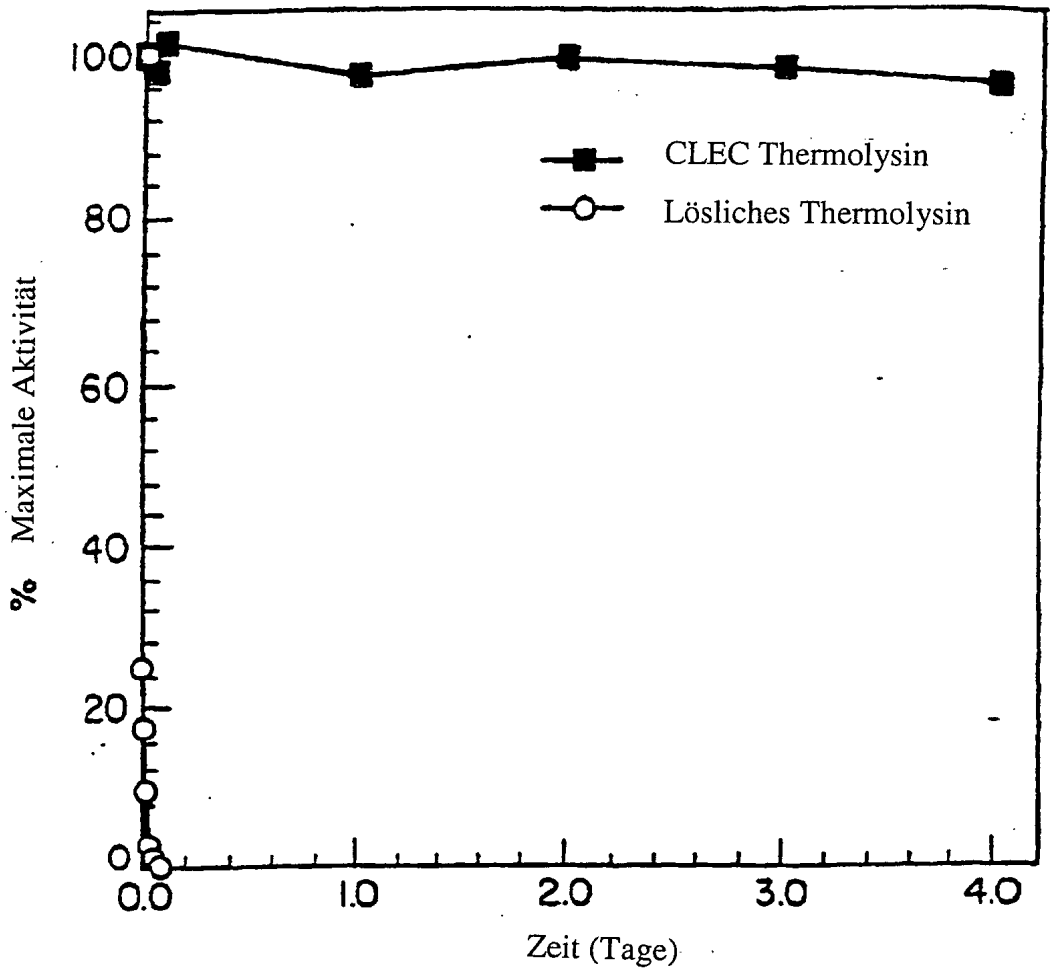

100
80
60
40
20
0
% Maximale Aktivität
CLEC Thermolysin
Lösliches Thermolysin
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
Zeit (Tage)

Abb. 4

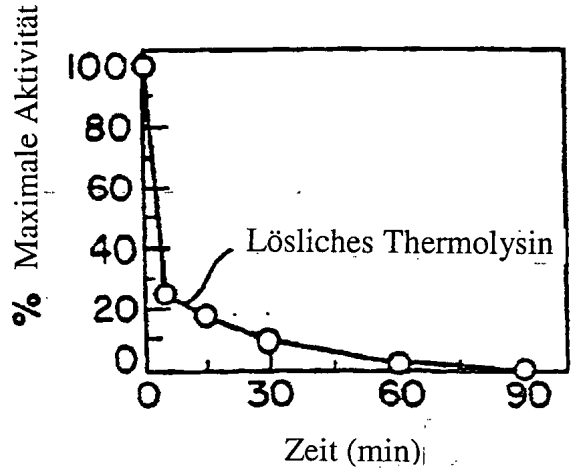

% Maximale Aktivität
100
80
60
40
20
0
Lösliches Thermolysin
0
30
60
90
Zeit (min)

Abb. 4a

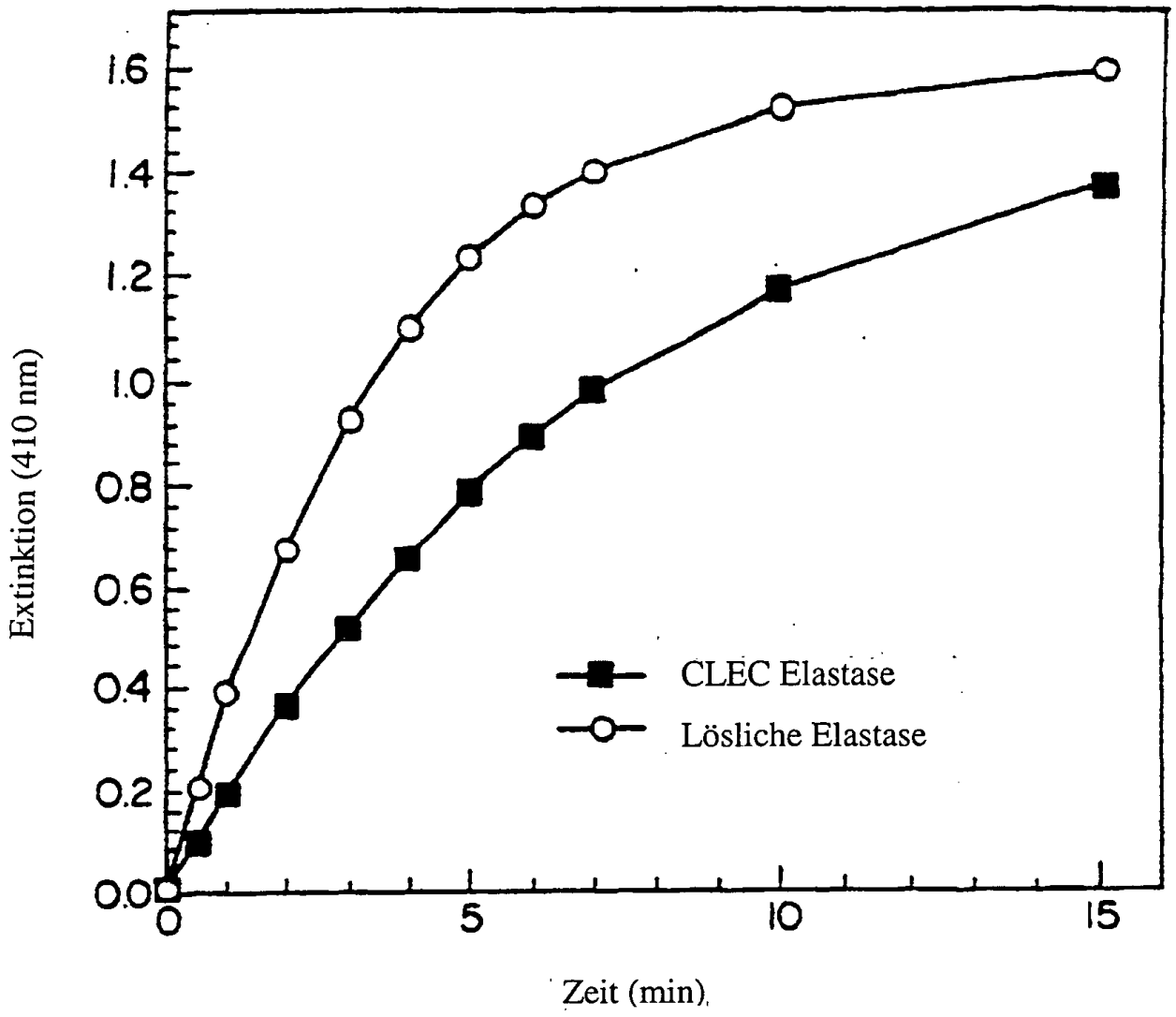

Extinktion (410 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
Zeit (min)
CLEC Elastase
Lösliche Elastase

Abb. 5

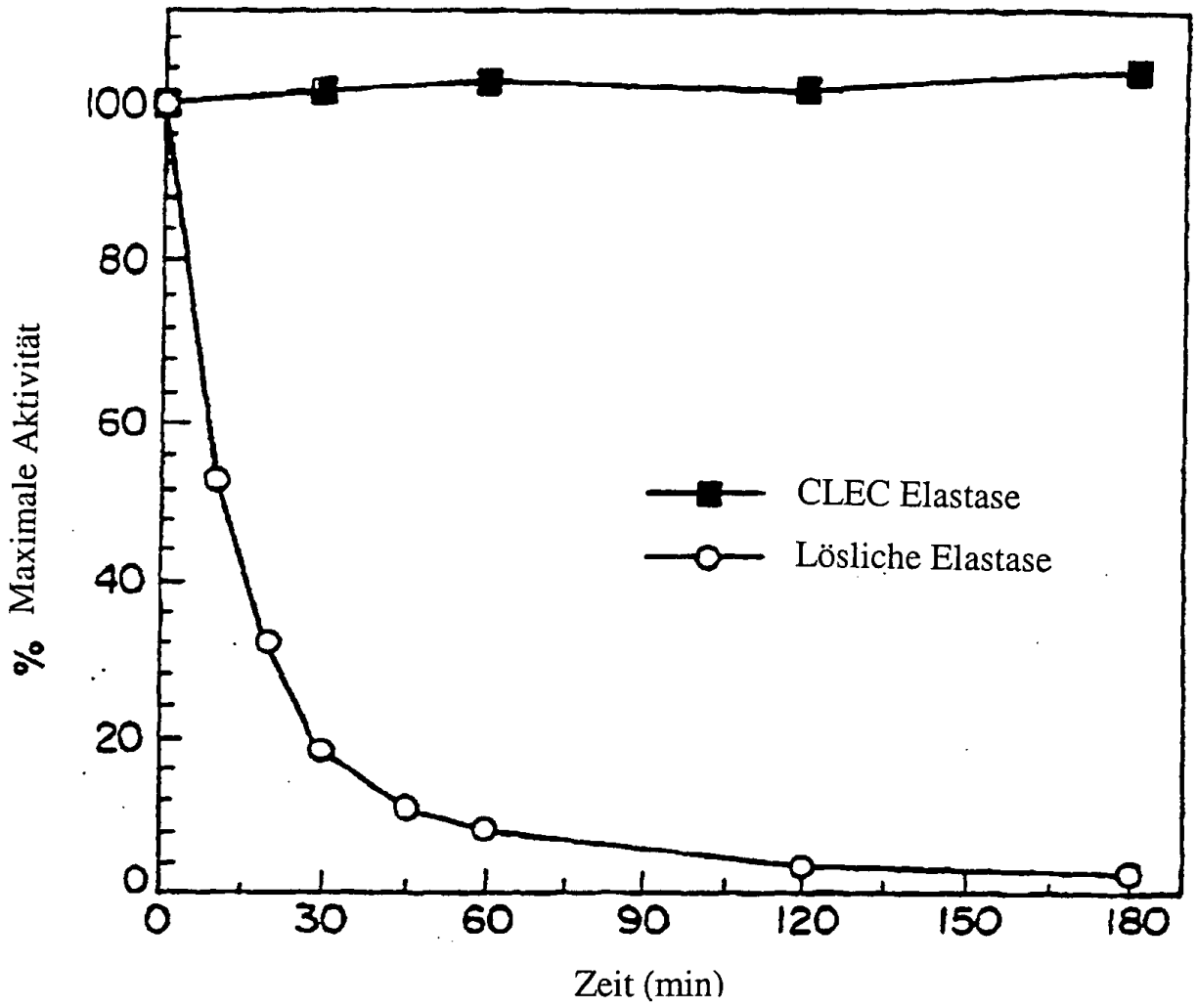

% Maximale Aktivität
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
Zeit (min)
CLEC Elastase
Lösliche Elastase

Abb. 6

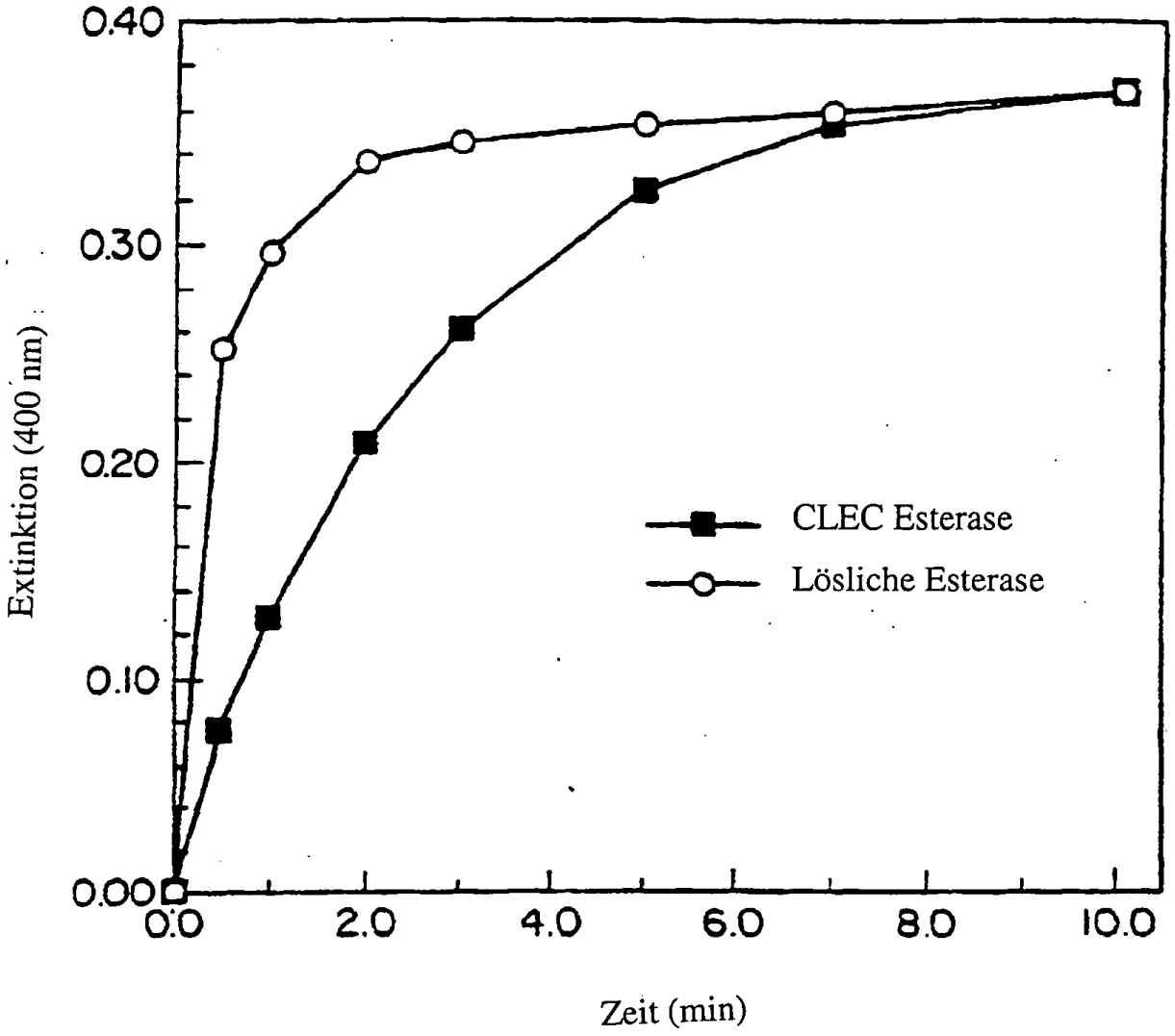

0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Extinktion (400 nm)
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
Zeit (min)
CLEC Esterase
Lösliche Esterase

Abb. 7

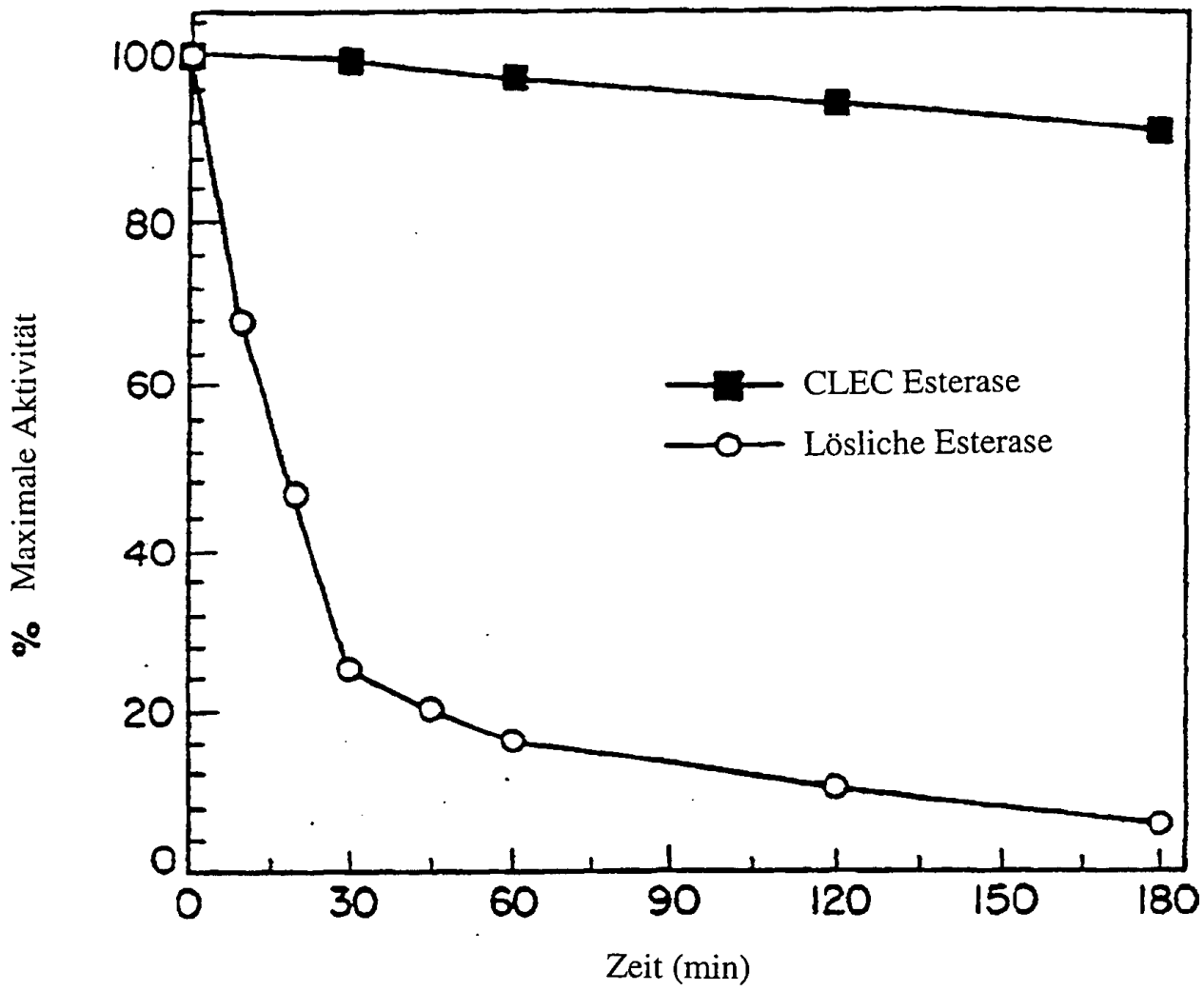

% Maximale Aktivität
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
Zeit (min)
CLEC Esterase
Lösliche Esterase

Abb. 8

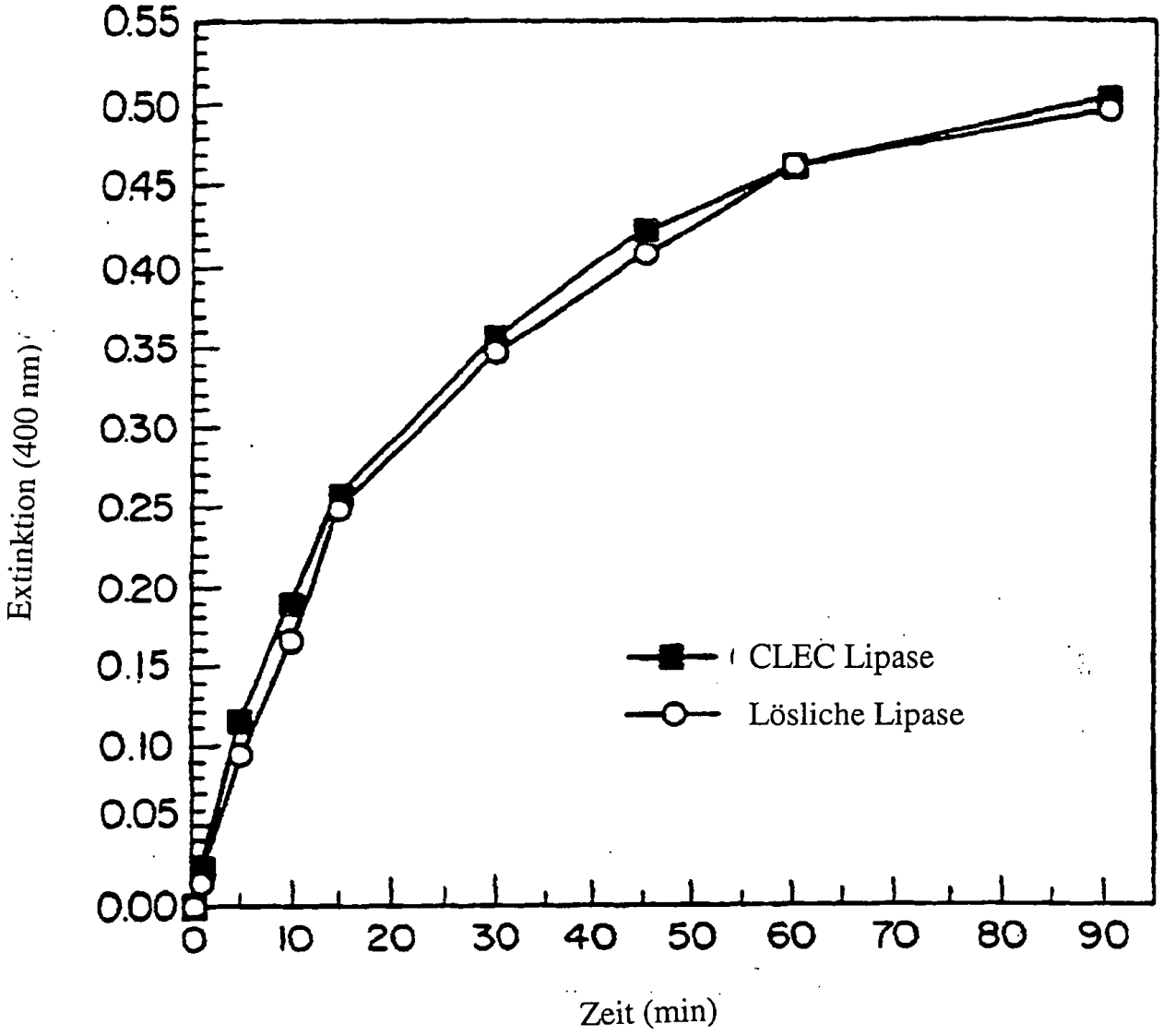

0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Extinktion (400 nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Zeit (min)
CLEC Lipase
Lösliche Lipase

Abb. 9

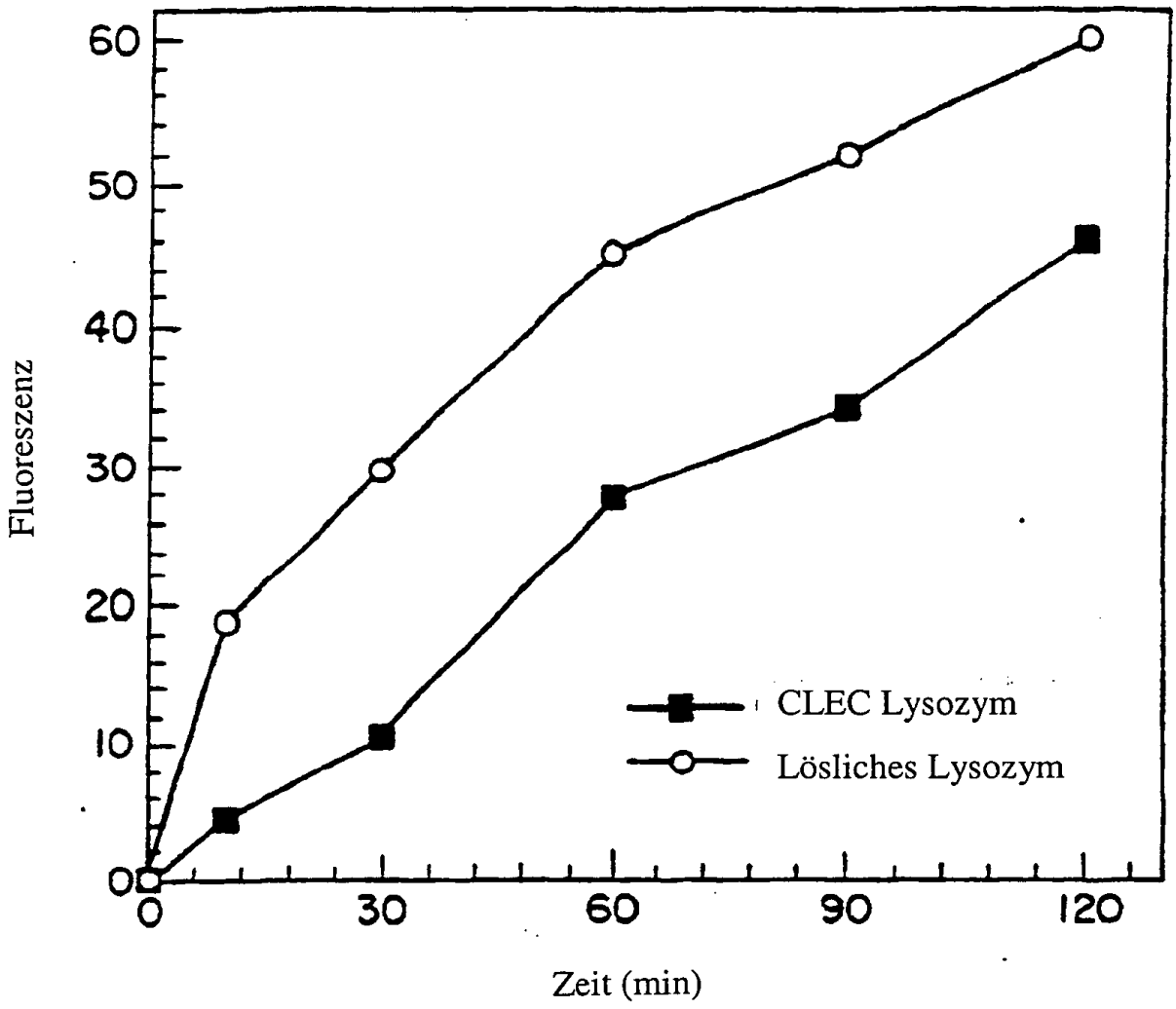

60
50
40
30
20
10
0
Fluoreszenz
0
30
60
90
120
Zeit (min)
CLEC Lysozym
Lösliches Lysozym

Abb. 10

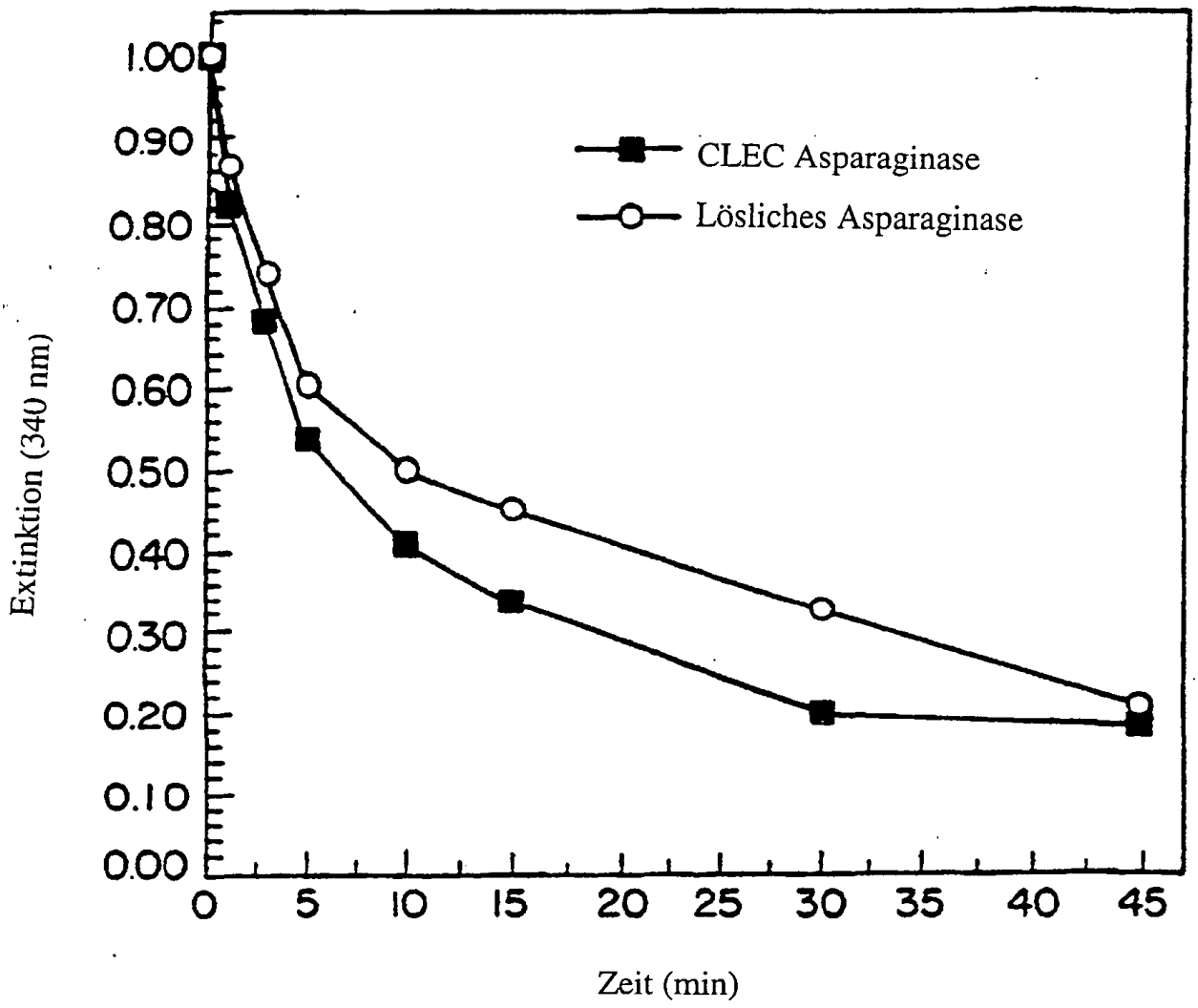

1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Extinktion (340 nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Zeit (min)
CLEC Asparaginase
Lösliches Asparaginase

Abb. 11