



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201621
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 03 06 77
(21) (PV 3679-77)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 07 82

(51) Int. Cl.³
C 07 D 499/04
|| A 61 K 31/43

(75)
Autor vynálezu

ČULÍK KAREL dr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc., ZEMAN ROMAN dr.,
BÁRTA MIROSLAV dr., PRAHA a PELZBAUER JIRÍ ing., ROZTOKY
U PRAHY

(54) Způsob semikontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové

Vynález se týká způsobu semikontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové, základního meziprojektu výroby řady klinicky užívaných polosyntetických penicilinů. Jak je známo, získává se kyselina 6-aminopenicilánová (dále pro stručnost 6-APK) chemickým nebo enzymovým štěpením penicilinu, především benzylpenicilinu, a to působením penicilinacylázy produkované různými mikroorganismy, nejčastěji *Escherichia coli* (NSR pat. spis č. 1, 114. 766). Při dosavadních postupech jde téměř výhradně o jednorázové použití nativních buněk při vsádkovém způsobu štěpení penicilinu, což je jejich podstatnou nevýhodou. U nativních buněk je velmi omezená možnost jejich opakovaného použití. Nativní buňky podléhají autolýze, aktivní enzym penicilinacyláza — je z nich vyplavován a s ním i obsah buněk, zejména vnitrobuněčné rozpustné bílkoviny, které pak zčásti doprovázejí vzniklou 6-APK celým procesem izolace a kontaminují konečný produkt. Polosyntetické peniciliny, připravené z takto získané 6-APK, vyvolávají alergické reakce u člověka i zvířete. Rozklad nativních buněk je urychlován vysokou iontovou silou štěpeného roztoku penicilinu, resp. relativně vysokými hodnotami pH, při kterých enzymová hydrolýza probíhá (7,6 až 8,2). Vyplavená penicilinacyláza je pak pro opakování enzy-

mového procesu ztracena. V praxi to znamená, že nativní buňky lze použít pouze jednorázově, že je nutno připravovat je vždy novou kultivací v živné půdě, jejíž zbytky se nedají při separaci buněk zcela odstranit. Tyto zbytky přispívají ke kontaminaci konečného produktu, popřípadě komplikují volbu vhodného izolačního postupu 6-APK.

Určitý pokrok představuje příprava 6-APK štěpením penicilinu pomocí penicilinacylázy vázané. Pro vazbu tohoto enzymu na nejrůznější anorganické i umělé organické materiály se užívá čistěných preparátů získaných z buněk mikroorganismů relativně drahými, složitými a hlavně ztrátovými postupy. Tak například v čs. patentu č. 145849 je uveden způsob čištění penicilinacylázy a její vazby na nosič, spočívající v kultivaci buněk *E. coli* a separaci biomasy, v jejím mechanickém drcení a opakované extrakci enzymu, frakčním srážením koncentráту, jeho dialýze a případné lyofilizaci enzymu. Tato mnohostupňová příprava končí se získkem asi 30 % původního množství enzymu, o čistotě surového preparátu asi 10 %, vztaženo na čistou penicilinacylázu. Takto získaný technický preparát enzymu pak slouží k vazbě na nosič typu polysacharidových derivátů, po jeho předchozí chemické aktivaci bromkyanem.

Nosiče tohoto a podobných typů jsou však

velice drahé přípravky, které zvyšují náklady na vázaný enzym do té míry, že jen asi 200-násobné použití vázaného enzymu ve srovnání s jednorázovým použitím nativních buněk je efektivnější. Možnost mnohonásobného použití vázaného enzymu není vždy dána, zejména pracuje-li se vsádkově v reaktoru za míchání, které působí na vázaný enzym silnými mechanickými vlivy. Umělé materiály s vyšší mechanickou pevností mívají opět nevýhodu v omezené difuzní rychlosti a proces hydrolýzy penicilinu se zpomaluje. Vázaný enzym se při častém opakovaném použití dříve nebo později denaturuje, zvláště tehdy, když se pro hydrolýzu užívá levnějších roztoků surového penicilinu, získávaných při jeho izolaci z vyfermentované kultivační kapaliny.

Bylo zjištěno, že zvláště vysokou produktivitu, výtěžnost a hospodárnost vykazuje způsob semikontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové štěpením penicilinů, zejména benzylpenicilinu, mikrobiálními buňkami obsahujícími penicilinacylázu, zejména buňkami mikroorganismu *Escherichia coli*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se štěpení provádí s použitím suspenze mikrobiálních buněk, obsahujících penicilinacylázu, předem chemicky stabilizovaných působením bifunkčního činidla, jako jsou dialdehydy, s výhodou působením glutardialdehydu, a s použitím roztoku penicilinu v koncentraci 1 až 10 % hmot. (objem, s výhodou 4 až 7 % hmot.) objem, při pH 7,2 až 8,2, po ukončeném štěpení a ochlazení reakční směsi na teplotu 0 až 5 °C se suspenze mikrobiálních buněk oddělí a použije ke štěpení čerstvé náklady roztoku penicilinu a ze supernatantu, popřípadě z matečného, louhu se po úpravě pH a teploty izoluje 6-aminopenicilánová kyselina, přičemž se štěpení penicilinu a izolace 6-aminopenicilánové kyseliny alepoň dvakrát opakuje.

Na enzymové štěpení způsobem podle vynálezu se účelně používá jako roztoku penicilinu roztoku sodné nebo draselné soli benzylpenicilinu, popřípadě surového roztoku benzylpenicilinu ve formě kyseliny, získávané při zpracovávání vyfermentované pudy po ukončené kultivaci.

Zásadní význam pro optimální průběh enzymového štěpení penicilinu způsobem podle vynálezu má stabilizace buněk mikroorganismu, zejména *Escherichia coli*; zvláště výhodné je použití kmenů s vysokým obsahem penicilinacylázy. Stabilizace buněk, resp. jejich vnitrobuněčného obsahu spolu s penicilinacylázou, se dosáhne kovalentním zesítním působením vhodných bifunkčních činidel, s výhodou glutardialdehydem. Touto stabilizací, což je jednoduše realizovatelná reakce, se získá odolnost buněk proti autolýze a fixace penicilinacylázy v buňkách, bez významné ztráty jejich hydrolytické aktivity. Stabilizované buněčné suspenze lze opakovaně používat ke štěpení penicilinu, přičemž pokles účinnosti je mírný a pomalý. Aktivitu zesítněných buněk lze ještě zvýšit ošetřením vhodným organie-

kým rozpouštědlem a vhodným smáčedlem, což má za následek vyplavení nezreagovaných buněčných komponent, především lipidů, které se neúčastní reakce s glutardialdehydem a tím k vyprání buněk a zlepšení jejich difuzních vlastností. Je-li k dispozici kmen s vysokým obsahem penicilinacylázy, lze za vhodných podmínek používat koncentrovanějšího roztoku penicilinu než dosud, přičemž konverze probíhá velmi rychle, v průběhu 2 až 3 hodin, s vysokým výtěžkem velmi čisté 6-aminopenicilánové kyseliny.

Při provedení způsobu semikontinuální výroby 6-aminopenicilánové kyseliny se po prvním štěpení roztoku penicilinu, obvykle v koncentraci 5 až 7 % hmot. (objem, jež probíhá obvyklým postupem za intenzivního míchání, regulace pH a teploty, se chemicky stabilizované buňky oddělí, nejlépe odstředěním, bez jakékoliv další úpravy se přes ně přelije čerstvý roztok penicilinu a probíhá další cyklus enzymové hydrolýzy za stejných podmínek. Tento postup lze mnohonásobně opakovat. Manipulační ztráty buněčné suspenze, vznikající především při odstředování, se nahrazují obvykle po pěti cyklech štěpení, doplněním suspenzí zásobních stabilizovaných buněk.

Mimo výhodné možnosti opakovaného používání chemicky stabilizovaných buněk je předností způsobu podle vynálezu jeho rychlost, neboť není nutno dbát na úplnou separaci buněčné hmoty do formy pasty a stabilizované buňky není třeba promývat. Zbytkový objem reakční směsi po hydrolýze, který zůstává v sedimentu, se s ním ihned vrací do procesu při zahájení druhého a dalšího cyklu hydrolýzy. Dřívější jednorázový postup se tak méně na opakovaný semikontinuální způsob, kdy po každých 3 hodinách se cyklus opakuje. Supernatant rezultující po oddělení stabilizované buněčné suspenze se ihned zpracovává na krystalickou 6-APK, a to buď přímou úpravou pH a teploty nebo po zahuštění. Významné množství produktu lze získat i ze zahuštěných matečných louhů po odstranění fenylotové kyseliny obvyklým způsobem.

Významné je dále i to, že 6-APK, získaná způsobem podle vynálezu, je podstatně čistší než produkty získávané jednorázovým postupem při použití nativních nestabilizovaných buněk, které se v průběhu štěpení částečně autolyzují a kontaminují 6-APK zplodinami svého rozpadu, především bílkovinami, které provázejí 6-APK v průběhu celé izolace, přičemž jejich dokonalé odstranění je velice obtížné a nákladné. Produkty získané štěpením pomocí chemicky stabilizovaných buněk není třeba pro další použití krystalovat a též jejich rozpustnost je lepší.

Z uvedeného je zřejmý technický i ekonomický efekt při výrobě základního meziprojektu pro přípravu řady terapeuticky významných polosyntetických penicilinů.

Způsob podle vynálezu je podrobně popsán v následujících příkladech provedení.

Příklad 1

Kultura vysokoprodukční mutanty kmene *Escherichia coli* CCM 2843, vypěstovaná v 5 t fermentačním tanku, byla zahuštěna odstředěním na objem asi 300 litrů. Zahuštěná suspenze nativních buněk obsahovala asi 400 mg vlhké hmoty/ml. Tato suspenze byla míchaním zhomogenizována za úpravy pH na hodnotu 7,5 50%₀ním roztokem hydroxidu sodného. Poté byl za míchání přidán 50%₀ní vodný roztok glutardialdehydu do výsledné koncentrace v reakční směsi 2%₀ (hmotnost/objem). Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě 20 až 25 °C. Potom byla reakční směs zředěna 3000 litry pitné vody a suspenze opět odstředěním zahuštěna na objem 300 litrů.

Takto připravená suspenze chemicky stabilizovaných buněk byla použita pro hydrolyzu penicilinu na 6-APK, a to tak, že byla převedena do reaktoru a za míchání zředěna 2100 litry deionizované vody, takže obsahovala přibližně 80 mg vlhké hmoty buněk/ml, tj. přibližně 8%₀ obj. sedimentu. Teplota suspenze byla nastavena na 37 °C a byla přidána draselná sůl benzylpenicilinu do výsledné koncentrace 7%₀ (hmotnost/objem).

Enzymová hydrolyza probíhala za míchání při teplotě 37 °C, za kontinuálního udržování pH na hodnotě 7,6 až 8,2 přidávkem zředěného vodného roztoku čpavku. Po 2 hodinách byla enzymová hydrolyza skončena, což se projevilo jak zastavením spotřeby roztoku čpavku tak analyticky zjištěnou hodnotou přeměny benzylpenicilinu na 6-APK (95%₀ teorie 6-APK za 2 hodiny). Reakční rychlost a výtěžek 6-APK byl sledován spektrofotometricky podle čs. patentu č. 116959.

Po ukončení hydrolyzy byla reakční směs ihned ochlazená na teplotu 0 až -5 °C a suspenze buněk byla odstředěním zahuštěna na 1/9 původního objemu o oddělena od reakční směsi. Supernatant o teplotě kolem 2 °C byl koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou okyslen, na pH 4,2, čímž se vyloučila krystalická 6-APK, která byla oddělena filtrací. Filtrát byl okyslen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 2,0 a extrahován 30%₀ (objemovými) chloridu uhličitého. Vodná fáze byla neutralizována na hodnotu pH 7,0 koncentrovaným roztokem čpavku a vakuově azeotropicky zahuštěna při teplotě 35 ° na 1/3 objemu. Poté bylo pH upraveno na hodnotu 4,2 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou za chlazení na teplotu 0 °C. Vykrytalovaná 6-APK byla odfiltrována. Z extraktu byla regenerována kyselina fenyloctová.

Zahuštěná suspenze buněk byla ihned převedena do dalšího reaktoru, opět zředěna na objem 2400 litrů a za výše popsaných podmínek proveden opakovaný cyklus enzymové hydrolyzy benzylpenicilinu. Uvedeným způsobem bylo semikontinuální štěpení benzylpenicilinu opakováno se stejnou suspenzí buněk 12krát, beze ztrát na výtěžnosti hydrolyzy a izolace 6-APK.

Příklad 2

Spojené zahuštěné suspenze nativních buněk *E. coli* ze dvou 5 t fermentačních tanků, o objemu 600 litrů, byly odstředěny do formy buněčné pasty, čímž byly odděleny zbytky živné půdy. Buněčná pasta byla suspendována v 1000 litrech deionizované vody a za míchání homogenizována, takže obsahovala 300 mg vlhké hmoty nativních buněk/ml. Za míchání bylo upraveno pH této suspenze na hodnotu 7,0 přidávkem 50%₀ního (hmotnost/objem) roztoku hydroxidu sodného a potom přidán 25%₀ní vodný roztok glutardialdehydu v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi činila 1%₀ (hmotnost/objem). Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě 25 °C. Po této době byla reakční směs zředěna 4000 litry deionizované vody a zahuštěna na objem 400 litrů.

Takto připravená suspenze chemicky stabilizovaných buněk byla přečerpána do reaktoru, za míchání zředěna 3600 litry deionizované vody a zhomogenizována, takže obsahovala přibližně 60 mg vlhké hmoty buněk/ml, tj. 6%₀ obj. sedimentu. S touto buněčnou suspenzí bylo provedeno 25 cyklů konverzní 4%₀ního (hmotnost/objem) roztoku sodné soli benzylpenicilinu na 6-APK semikontinuálním způsobem za dobu 125 hodin za stejných podmínek jako v příkladu 1. Po každém pátém cyklu použití byla v případě potřeby reakční směs doplněna zásobní suspenzí chemicky stabilizovaných buněk, čímž byly nahrazeny manipulační ztráty.

Po oddělení buněk byl supernatant zpracován na 6-APK tak, že po okyselení na pH 2,0 byl extrahován butylacetátem, vodná fáze byla alkalizována na pH 7,5 a vakuově zahuštěna na 1/2 původního objemu při teplotě 40 °C. Po ochlazení na 0 °C a okyselení na pH 4,2 se vyloučila krystalická 6-APK, která byla odfiltrována a promyta ledovou vodou a acetonem. Z extraktu byla regenerována kyselina fenyloctová obvyklým způsobem.

Průměrná analyticky zjištěná hodnota přeměny benzylpenicilinu na 6-APK činila 90%₀ teorie za 2,5 hodiny, průměrný výtěžek suché 6-APK činil 84,5%₀ teorie.

Příklad 3

11 000 litrů kultury kmene *Escherichia coli* CCM 2843, vypěstované v 15 t fermentačním tanku obsahující přibližně 500 kg vlhké hmoty buněk (120 kg suché hmoty buněk) bylo zahuštěno na objem 1000 litrů pomocí sedimentačních odstředivek. Zahuštěná suspenze buněk byla homogenizována za úpravy pH 25%₀ním roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7,0. Za stálého míchání při teplotě 25 °C bylo přidáno 40 litrů 25%₀ního vodného roztoku glutardialdehydu. Reakce probíhala za míchání 3 hodiny při teplotě 25 °C. Směs byla zředěna pitnou vodou na objem 3500 litrů a dále míchána po dobu 15 minut. Reakční

směs byla opět zahuštěna na sedimentačních odstředivkách.

400 litrů takto zesíťené buněčné biomasy bylo zředěno pitnou vodou na celkový objem 500 litrů a přidáno 50 litrů butylacetátu. Suspenze byla míchána po dobu 5 hodin při teplotě 25 °C. Po této době byl přidán roztok 10 kg Slovafolu 909 a dále mícháno ještě 15 minut. Po této době byla suspenze zředěna pitnou vodou na celkový objem 4000 litrů a odseparována na sedimentačních odstředivkách. Vypraná buněčná pasta byla suspendována v nádrži s intenzivním mícháním v 3500 litrech pitné vody a po homogenizaci dále míchána po dobu 30 minut. Po této době byla suspenze zahuštěna pomocí sedimentačních odstředivek na celkový objem 400 litrů. Zahuštěná suspenze byla opět přečerpána do míchané nádoby, zředěna na celkový objem 3500 litrů pitnou vodou a zahuštění zesíťených a vypraných buněk z míchané suspenze bylo opakováno ještě jednou popsáním způsobem opět na objem 400 litrů.

Z celkového množství 500 kg vlhké hmoty (120 kg suché hmoty) nativních buněk *E. coli* bylo popsáním procesem sítění, praní a promývání získáno 350 kg vlhké hmoty (84 kg suché hmoty) chemicky stabilizovaných buněk, což jest v hmotnostní bilanci 70%ní výtěžek.

300 litrů takto připravené zahuštěné suspenze chemicky stabilizovaných buněk bylo přečerpáno do reaktoru, zředěno na celkový objem 4000 litrů deionizovanou vodou a homogenizováno mícháním. Po rozmíchání činila koncentrace zesíťených buněk 60 mg vlhké hmoty/ml, tj. 17 až 20 mg suché hmoty/ml. Teplota suspenze byla nastavena na 37 °C a byla přidána draselná sůl benzylpenicilinu do výsledné koncentrace 6,5 % (hmotnost/objem), tj. 414 miliard jednotek (268 kg). Enzymová hydrolýza probíhala 2 hodiny za podmínek uvedených v příkladu 1.

Po ukončení hydrolýzy byly chemicky stabilizované buňky pomocí sedimentačních odstředivek zahuštěny na celkový objem 400 litrů a zahuštěná suspenze buněk ochlazená na 5 °C. Čirá reakční směs po oddělení stabilizovaných buněk byla přečerpána do nádrží, zředěna přidáním 800 litrů metylizobutylketonu, promíchána, ochlazená na 2 °C a reakční směs okyselena na hodnotu pH 4,2 40%ním roztokem (hmotnost/objem) kyseliny sírové. Potom byla směs ponechána 3 až 4 hodiny krystalovat, pak byla zfiltrována, filtrační koláč prokryt 10 litry ledové deionizované vody, krystaly vyjmuty a suspendovány ve 120 litrech ledové deionizované vody a opět zfiltrovány. Potom byl produkt prokryt 10 litry zchlazeného acetonu, vyjmut a sus-

pendován ve 120 litrech zchlazeného acetonu a znovu zfiltrován. Z filtrátu byla regenerována kyselina fenylloctová a metylizobutylketon.

400 litrů zahuštěné suspenze buněk ve zbytku reakční směsi z předcházejícího cyklu enzymové hydrolýzy bylo po 4 hodinách stání při 5 °C přečerpáno zpět do reaktoru, zředěno na objem 4000 litrů deionizovanou vodou a za výše popsaných podmínek proveden opakovaný cyklus enzymové hydrolýzy benzylpenicilinu.

Uvedeným způsobem bylo semikontinuální štěpení benzylpenicilinu na 6-APK opakováno se stejnou suspenzí chemicky stabilizovaných buněk 5krát s časovou prodlevou mezi započítáním jednoho a skončením druhého cyklu 6 hodin, při dosažení průměrného stupně konverze uvedené koncentrace benzylpenicilinu na 6-APK 93 % a průměrného výtěžku 6-APK v izolaci 80 % teorie bez zpracování matečných louhů. Kvalita produktu byla posuzována z hlediska 4 kritérií a to čistoty (98,8 %), nerozpustného zbytku trietylaminové soli v dichlormetanu (2,18 %), vlhkosti (0,9 %) a tintometrickým měřením barvnosti (0,1/0,1).

Příklad 4

Zahuštění buněk *E. coli* po kultivaci v 15 t fermentoru a jejich chemická stabilizace byla provedena jak je uvedeno v příkladu 3. Praní a promývání stabilizovaných buněk bylo provedeno rovněž stejným způsobem jak je uvedeno v příkladu 3 s tím rozdílem, že místo butylacetátu bylo použito toluenu a místo Slovafolu 909, Slovafolu 910 ve stejných koncentracích.

Semikontinuální hydrolýza 6,5%ního roztoku draselné soli benzylpenicilinu byla provedena rovněž stejným způsobem jak je uvedeno v příkladu 3, avšak s tím rozdílem, že bylo provedeno 15 opakovaných cyklů hydrolýzy, přičemž před zahájením pátého, desátého a čtrnáctého cyklu bylo přidáno vždy 27 litrů zahuštěné zásobní suspenze chemicky stabilizovaných buněk, čímž byly nahrazeny manipulační ztráty.

Izolační postup 6-APK byl rovněž stejný jak je uvedeno v příkladu 3 s tím rozdílem, že místo metylizobutylketonu bylo použito 1500 litrů butylacetátu.

Průměrný stupeň konverze 15 semikontinuálních cyklů štěpení byl 92 %, průměrný výtěžek 6-APK v izolaci 81,6 % teorie bez zpracování matečných louhů. Kvalita 6-APK byla podobná jak je uvedeno v příkladu 3 s tím rozdílem, že průměrná hodnota nerozpustného zbytku činila 4,8 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob semikontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové štěpením penicilinů, zejména benzylpenicilinu, mikrobiálními

buňkami obsahujícími penicilinacylázu, zejména buňkami mikroorganismu *Escherichia coli*, vyznačující se tím, že se štěpení

provádí s použitím suspenze mikrobiálních buněk, obsahujících penicilinacylázu, předem chemicky stabilizovaných působením bifunkčního činidla, jako jsou dialdehydy, s výhodou působením glutardialdehydu, a s použitím roztoku penicilinu v koncentraci 1 až 10 % hmotnost/objem, s výhodou 4 až 7 % hmotnost/objem, při pH 7,2 až 8,2 po ukončeném štěpení a ochlazení reakční směsi na teplotu 0 až 5 °C se suspenze mikrobiálních buněk oddělí, použije ke štěpení čerstvé násady roztoku penicilinu a ze supernatantu, popřípadě matečného louhu se

- po úpravě pH a teploty izoluje 6-aminopenicilánová kyselina, přičemž se štěpení penicilinu a izolace 6-aminopenicilánové kyseliny alespoň dvakrát opakuje.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako roztoku penicilinu používá roztoku sodné nebo draselné soli benzylpenicilinu.
 3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako roztoku penicilinu používá surového roztoku benzylpenicilinu ve formě kyseliny, získaného při zpracování vyfermentované půdy po ukončené kultivaci.