

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1007077

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1007077

22 Ingediend: 19.09.97

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

41 Ingeschreven:
22.03.99

47 Dagtekening:
22.03.99

45 Uitgegeven:
01.06.99 I.E. 99/06

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

72 Uitvinder(s):
Harold Monro Moody te Maastricht
Ernst Edmund Kers te Rotterdam

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

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

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

NL C 1007077

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

WERKWIJZE VOOR DE WINNING VAN EEN β -LACTAM ANTIBIOTICUM

5

De uitvinding betreft een werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum uit een mengsel dat in hoofdzaak β -lactam antibioticum en D-fenylglycine (FG) in oplossing bevat, waarbij het mengsel bij een concentratie zodanig dat FG in oplossing blijft, op een pH tussen 3 en 8 wordt gebracht, het verkregen vaste β -lactam antibioticum wordt gewonnen en de resterende vloeistof wordt onderworpen aan een concentratiestap waarbij een slurry ontstaat met vast β -lactam antibioticum en vast FG, de slurry op een pH wordt gebracht waarbij het β -lactam antibioticum oplost, FG als vaste stof wordt afgescheiden, en het in de moederloog aanwezige β -lactam antibioticum althans ten dele wordt benut.

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

De uitvinding voorziet nu in een nieuw concept voor de winning van β -lactam antibiotica waarbij in een eenvoudige, op industriële schaal toepasbare, werkwijze de verliezen aan β -lactam antibioticum sterk worden beperkt en tevens waardevol D-fenylglycine wordt teruggewonnen.

Tijdens de acyleringsreactie van de β -lactamkern met een geschikt acyleringsmiddel, in het bijzonder een enzymatische acyleringsreactie met bijvoorbeeld een amide van D-fenylglycine, bijvoorbeeld D-fenylglycineamide (FGA) of een ester van D-fenylglycine, bijvoorbeeld de methylester van D-fenylglycine (FGM), vindt hydrolyse van

het acyleringsmiddel en het β -lactam antibioticum plaats, waarbij D-fenylglycine (FG) ontstaat.

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

Een mengsel dat β -lactam antibioticum en FG bevat wordt zonodig op een zodanige concentratie en pH gebracht dat alle componenten, in het bijzonder genoemde componenten, eventueel met uitzondering van het β -lactam
20 antibioticum, in oplossing zijn. De pH kan daartoe zowel hoog, bij voorbeeld tussen 6,5 en 11, bij voorkeur tussen 7 en 9,5; als laag gekozen worden, bij voorbeeld tussen 0 en 3, bij voorkeur tussen 0,3 en 2. Wanneer het proces op grote schaal wordt uitgevoerd wordt bij voorkeur gekozen
25 voor een min of meer continue opwerking. Door het oplossen continu te bedrijven wordt de verblijftijd bij relatief hoge of lage pH verkort. Desgewenst kunnen nog eventueel aanwezige vaste componenten worden afgescheiden bijvoorbeeld door filtratie of ultrafiltratie.

Volgens de uitvinding wordt het mengsel, dat
30 eventueel wel nog vast β -lactam antibioticum mag bevatten, eerst op een pH tussen 3 en 8, bij voorkeur tussen 4 en 7 gebracht, waarbij ervoor gezorgd wordt, bijvoorbeeld door toevoegen van water, dat de concentratie van de
35 reactiecomponenten, in het bijzonder FG, zodanig is dat zij, met uitzondering van het β -lactam antibioticum, al

dan niet oververzadigd in oplossing blijven. Bij voorkeur wordt de concentratie zodanig gekozen dat, nadat het mengsel op een pH tussen 3 en 8 is gebracht, de FG oververzadigd in de oplossing aanwezig is. De temperatuur is daarbij niet bijzonder kritisch en ligt bijvoorbeeld tussen -5 en 45°C, in het bijzonder tussen 0 en 25°C. Wanneer de FG-concentratie in het mengsel relatief hoog is wordt bij voorkeur een temperatuur tussen 0 en 10°C aangehouden. Verrassenderwijze is namelijk gebleken dat het onder deze condities mogelijk is een sterke oververzadiging van FG te realiseren, zonder dat FG neerslaat. Hierdoor bleek het mogelijk toch relatief hoge concentraties te handhaven, waardoor minder volume nodig is en minder β -lactam antibioticum in oplossing blijft. Bijgevolg wordt het β -lactam antibioticum in belangrijke mate als vaste stof neergeslagen, waarna het kan worden gewonnen.

Gebleken is echter dat de hoeveelheid β -lactam antibioticum aanwezig in de moederloog na de winning van het vaste β -lactam antibioticum nog relatief hoog is. Aanvraagster heeft nu een methode gevonden waarbij het mogelijk is deze vloeistof verder op te werken en de opbrengst aan β -lactam antibioticum verder te verhogen. Volgens de uitvinding wordt de vloeistof onderworpen aan concentratie. Om afbraak van het β -lactam antibioticum en kleuring van het β -lactam antibioticum en de FG-kristallen te voorkomen moet een relatief lage temperatuur worden gekozen en moet de concentratiestap relatief kort duren, terwijl voor het verkrijgen van een niet te visceuze slurry en grote, goed afscheidbare FG-kristallen juist een relatief hoge temperatuur en een relatief lange, geleidelijke concentreringsprocedure moeten worden gekozen. Verrassenderwijze bleek het mogelijk om een concentratie uit te voeren onder zodanige condities dat afbraak van ampicilline drastisch wordt beperkt terwijl toch de FG-kristallen relatief groot en goed afscheidbaar

zijn.

De temperatuur waarbij de concentratie wordt uitgevoerd kan bijvoorbeeld liggen tussen 10 en 80°C, bij voorkeur tussen 20 en 60°C, in het bijzonder tussen 25 en 55°C. De duur van de concentratie ligt bijvoorbeeld tussen 10 min. en 24 uur, bij voorkeur tussen 0,5 en 10 uur, in het bijzonder tussen 1 en 5 uur. De temperatuur waarbij de concentratie wordt uitgevoerd en de tijdsduur van de concentratie worden daarbij zo gekozen dat in de regel bij hogere temperatuur een relatief kortere tijdsduur wordt gekozen, en omgekeerd.

Concentreren kan bijvoorbeeld plaatsvinden door indampen onder verlaagde druk of nanofiltratie. De indamping kan bijvoorbeeld worden uitgevoerd in een dunne-film-verdamper. Gebleken is dat de wand eenvoudig kan worden schoongehouden en dat er weinig afbraak van het β -lactam antibioticum plaatsvond. Daarnaast is gebleken dat de kwaliteit van de FG-kristallen beter is wanneer geleidelijk wordt ingedampt bijvoorbeeld door de te concentreren vloeistofsuspensie in een hoog debiet over de verdamper te leiden, waarbij dan de samenstelling van de vloeistof geleidelijk verandert. Een tweede mogelijke uitvoeringsvorm van de concentratie is een indamp-kristallisator, bijvoorbeeld een (cascade van) omloopverdamper.

Gebleken is dat de concentratie ook heel goed kan worden uitgevoerd met behulp van nanofiltratie. Verrassenderwijze is gebleken dat de flux door het membraan relatief hoog blijft ondanks het feit dat gedurende de nanofiltratie kristallisatie optreedt. Membranen die geschikt kunnen worden toegepast bij de concentratie via nanofiltratie zijn bijvoorbeeld SeIRO MPT-10 (Membrane Products Kiryat Weizmann), WFN0505 (Stork Friesland) en Nanomax-50 (Millipore).

De concentratiefactor, dat wil zeggen de verhouding tussen het volume vóór concentratie en het

volume na concentratie kan binnen wijde grenzen variëren en ligt bij voorkeur tussen 1 en 30, in het bijzonder tussen 3 en 20. Hoe hoger de concentratiefactor, hoe hoger het rendement zal zijn. Bij voorkeur wordt de

- 5 concentratiefactor zodanig gekozen dat de gedurende het gehele proces ontstane zouten nog in oplossing blijven. De vakman kan eenvoudig de in zijn specifieke geval optimale concentratiefactor bepalen.

- 10 Bij voorkeur wordt de na de concentratiestap verkregen slurry eerst onderworpen aan een scheiding, in een heldere vloeistofstroom en een geconcentreerde slurry, of in een heldere vloeistofstroom en een vaste stof. De scheiding kan met elke willekeurige afscheidings-
- 15 apparatuur bijvoorbeeld een centrifuge of een filter worden uitgevoerd. Aangezien niet noodzakelijk de vaste stoffen als vaste stoffen hoeven te worden afgescheiden, wordt bij voorkeur een decanter toegepast. De heldere vloeistofstroom kan bijvoorbeeld gespuid worden, waardoor een gemakkelijke manier wordt verkregen om de opbouw van
- 20 afbraakprodukten en zouten te voorkomen. Aangezien deze spuistroom relatief klein is, gaat hiermee weinig β -lactam antibioticum door oplosbaarheidsverliezen verloren.

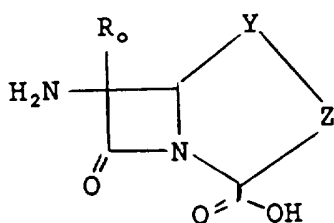
- Tijdens de concentratie wordt zowel FG als β -lactam antibioticum als vaste stof gevormd. Gebleken is
- 25 dat de bij de concentratie gevormde vaste FG goed filtreerbaar is. Bijgevolg bleek het nu mogelijk - mede aangezien de concentratie β -lactam antibioticum nu relatief laag is - FG te winnen door de slurry op een pH te brengen, waarbij het β -lactam antibioticum in oplossing
- 30 gaat en FG niet, bijvoorbeeld een pH tussen 6,5 en 11, bij voorkeur tussen 7 en 9,5, of tussen 0 en 3, bij voorkeur tussen 0,3 en 2; en vervolgens FG als vaste stof af te scheiden, bijvoorbeeld door filtratie of centrifugeren. Aangezien de vaste stof nu snel kan worden afgescheiden,
- 35 vindt hierbij relatief weinig afbraak van het β -lactam antibioticum plaats ondanks de hoge, respectievelijk lage

pH. Het filtraat kan desgewenst vervolgens weer worden teruggevoerd in het proces of anderszins worden hergebruikt.

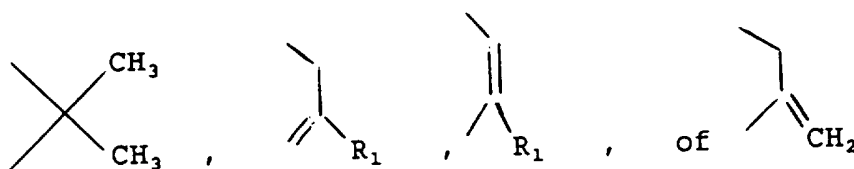
Het β -lactam antibioticum in genoemd filtraat kan worden gewonnen, bijvoorbeeld door kristallisatie met behulp van bijvoorbeeld een pH-shift. Een andere mogelijkheid is om het filtraat als zodanig terug te voeren naar het mengsel dat het β -lactam antibioticum en FG in oplossing bevat.

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

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



waarin R_0 staat voor H of een alkoxygroep met 1-3 C-atomen; Y staat voor CH_2 , O, S of een geoxideerde vorm van zwavel; Z staat voor



waarin R_1 bijvoorbeeld staat voor H, OH, halogeen, een alkoxygroep met 1-5 C-atomen, een alkylgroep met 1-5 C-atomen, een cycloalkylgroep met 4-8 C-atomen, een aryl of een heteroarylgroep met 6-10 C-atomen, waarbij de groepen eventueel gesubstitueerd kunnen zijn bijvoorbeeld met een

alkyl-, een aryl-, een carboxy- of een alkoxygroep met 1-8 C-atomen; en waarin de carbonzuurgroep desgewenst een estergroep kan zijn.

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

 Als enzym kan daarbij in principe elk enzym worden toegepast dat geschikt is als katalysator in de
15 koppelingsreactie. Dergelijke enzymen zijn bijvoorbeeld de enzymen die bekend zijn onder de algemene aanduiding penicilline amidase of penicilline acylase. Dergelijke enzymen zijn bijvoorbeeld beschreven in J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry, Augustus 1989 p. 146-154 en in
20 J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry International, Juni 1990, p. 97-103. Voorbeelden van geschikte enzymen zijn enzymen afgeleid van Acetobacter, in het bijzonder Acetobacter pasteurianum, Aeromonas, Alcaligenes, in het bijzonder Alcaligenes faecalis, Aphanocladium, Bacillus
25 sp., in het bijzonder Bacillus megaterium, Cephalosporium, Escherichia, in het bijzonder Escherichia coli, Flavobacterium, Fusarium, in het bijzonder Fusarium oxysporum en Fusarium Solani, Kluyvera, Mycoplana, Protaminobacter, Proteus, in het bijzonder Proteus
30 rettgari, Pseudomonas en Xanthomonas, in het bijzonder Xanthomonas citrii.

 Bij voorkeur wordt een geïmmobiliseerd enzym toegepast, aangezien het enzym dan eenvoudig afgescheiden en hergebruikt kan worden. Een geschikte
35 immobilisatietechnologie is bijvoorbeeld beschreven in EP-A-222462. Een andere geschikte technologie wordt gevormd

door het Penicilline G acylase te immobiliseren op een drager die een gelerend agens, bijvoorbeeld gelatine, en een polymeer met vrije aminogroepen, bijvoorbeeld alginaat amine, chitosan of polyethyleenimine bevat. Daarnaast
5 kunnen enzymen ook als kristallijne stof worden ingezet (Clecs).

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

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

De temperatuur waarbij de enzymatische
20 acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal lager dan 40°C, bij voorkeur tussen -5 en 35°C. De pH waarbij de enzymatische acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal tussen 5,5 en 9,5, bij voorkeur tussen 6,0 en 9,0.

Bij voorkeur wordt de reactie vrijwel volledig
25 gestopt wanneer nagenoeg de maximale conversie is bereikt. Een geschikte uitvoeringsvorm om de reactie te stoppen is het verlagen van de pH, bij voorkeur tot een waarde tussen 4,0 en 6,3, in het bijzonder tussen 4,5 en 5,7. Een andere geschikte uitvoeringsvorm is het verlagen van de
30 temperatuur van het reactiemengsel zodra de maximale conversie is bereikt. Ook een combinatie van beide uitvoeringsvormen is mogelijk.

Nadat de reactie vrijwel gestopt is bij het bereiken van maximale conversie, is het reactiemengsel
35 meestal aanwezig in de vorm van een suspensie die meerdere vaste stoffen, bijvoorbeeld het antibioticum, D-

fenylglycine en eventueel geïmmobiliseerd enzym bevat. Het geïmmobiliseerde enzym wordt, vanwege de proceseconomie, bij voorkeur teruggewonnen. Dit kan bijvoorbeeld geschikt worden uitgevoerd door het reactiemengsel roerend te
5 filteren over een zeef, waarbij bij voorkeur de draairichting van de roerder zodanig wordt gekozen dat de suspensie in het centrum van de roerder omhooggepompt wordt. Vervolgens kunnen waardevolle componenten, bijvoorbeeld het antibioticum en FG, worden gewonnen met
10 de werkwijze volgens de uitvinding waarbij eerst de vaste componenten, eventueel afgezien van vast antibioticum, in oplossing worden gebracht, bijvoorbeeld met behulp van een pH-shift.

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

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

De werkwijze volgens de uitvinding is in het
35 bijzonder geschikt om te worden toegepast in de opwerking van het reactiemengsel dat wordt verkregen na de

enzymatische acyleringsreactie waarin 6-APA wordt geacyleerd met een amide van D-fenylglycine, bijvoorbeeld (FGA) of een ester van D-fenylglycine, bijvoorbeeld FGM.

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

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

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

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

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

350 mM gekozen.

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

De concentratie 6-APA in opgeloste vorm in het reactiemengsel aanwezig, kan op diverse manieren laag worden gehouden. Een mogelijkheid om de concentratie opgelost 6-APA laag te houden is, slechts een deel van de totale hoeveelheid 6-APA voorleggen en de rest doseren tijdens de reactie. Een nadeel hiervan is echter dat 6-APA dan als vaste stof moet worden gedoseerd hetgeen praktische bezwaren oplevert. Bij voorkeur wordt dan ook de totale hoeveelheid 6-APA in een batch proces voorgelegd aan het begin van de reactie, waarna gedurende de enzymatische acyleringsreactie de concentratie 6-APA in het reactiemengsel zal afnemen en de concentratie ampicilline zal toenemen. Een geschikte methode om toch een lage concentratie opgelost 6-APA te bereiken is bijvoorbeeld door de pH op een lagere waarde te houden vergeleken met de pH-waarde waarbij een maximale oplosbaarheid van de reactanten wordt bereikt. Een bijzonder geschikte methode om de 6-APA concentratie in opgeloste vorm laag te houden is bijvoorbeeld door ervoor te zorgen dat de concentratie van het fenylglycinederivaat laag wordt gehouden, bijvoorbeeld door het fenylglycinederivaat gedeeltelijk in de loop van de reactie te doseren.

Gebleken is namelijk dat wanneer de

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

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

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

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

Afkortingen:

AMPI = ampicilline

25 AMPI.3H₂O = ampicilline-trihydraat

6-APA = 6-amino-penicillinaanzuur

FGA = D-fenylglycineamide

FG = D-fenylglycine

FGHM = D-p-hydroxyfenylglycine methylester

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

De uiteindelijke activiteit van de Escherichia

coli penicilline acylase wordt bepaald door de hoeveelheid enzym die aan de geactiveerde bolletjes is toegevoegd en bedroeg 3 ASU/g drooggewicht waarbij 1 ASU (Amoxicilline Synthese Unit) is gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die
5 per uur 1 g Amoxicilline. $3\text{H}_2\text{O}$ genereert uit 6-APA en FGHM (bij 20°C ; 6,5% 6-APA en 6,5% FGHM).

Voorbeeld I

Bereiding van $\text{FGA} \cdot 1/2\text{H}_2\text{SO}_4$ oplossing.

10 301,6 g FGA (2,00 mol) werd gesuspendeerd in 650 g water bij $T = 5^\circ\text{C}$. Onder roeren werd in 1 uur 102,1 g 96% H_2SO_4 (1,00 mol) toegedruppeld, waarbij de temperatuur door middel van koelen op $T < 25^\circ\text{C}$ werd gehouden.

15 Voorbeeld II

Enzymatische synthese van ampicilline.

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

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

Op $t = 0$ werd de roerder in de enzymreactor aangezet. De temperatuur werd steeds op 10°C gehouden.
30 Gedurende 233 minuten werd 423,7 g (0,800 mol) $\text{FGA} \cdot 1/2\text{H}_2\text{SO}_4$ oplossing (uit voorbeeld I) met constante snelheid toegevoegd. De pH werd daarbij constant gehouden op ca. 6,3. Vanaf $t = 295$ minuten werd de pH op 6,3 gehouden door middel van titratie met 6N H_2SO_4 . Op $t = 570$ minuten was de
35 hoeveelheid AMPI maximaal en werd de pH verlaagd naar 5,0 door middel van toevoegen van 6N H_2SO_4 . De enzymreactor

bevatte nu:

575 mmol AMPI

15 mmol 6-APA

50 mmol FGA

5 365 mmol FG

Voorbeeld III

Afscheiding van de AMPI/FG slurry uit de enzymreactor.

Met behulp van roerende filtratie werd de
10 AMPI/FG slurry, bereid zoals beschreven in voorbeeld II,
via de zeefbodem verwijderd uit de enzymreactor. Hierbij
werd een schuine-blad-roerder gebruikt, welke 0,5 cm boven
het zeef was geplaatst. Er werd omhoog geroerd met ca. 500
rpm. De reactor werd nagespoeld met 10 porties van 250 ml
15 water ($T = 10^{\circ}\text{C}$). De waswaters werden ook met behulp van
roerende filtratie via de zeefbodem verwijderd.

De uit de reactor afgescheiden AMPI/FG slurry en
alle waswaters werden gecombineerd ($T = 10^{\circ}\text{C}$). De aldus
resulterende AMPI/FG slurry bevatte $> 99,8\%$ van de totaal
20 in de enzymreactor geproduceerde AMPI en $> 99,5\%$ van de
totaal geproduceerde FG.

Het AssemblaseTM bevond zich na deze roerende
filtratie voor $> 99,5\%$ in de enzymreactor.

25 Voorbeeld IV

Concentratie van de ampicilline-moederloog via indampen
met behulp van een dunne filmverdamer.

Een moederloog van een AMPI-kristallisatie
(hoeveelheid: 6798 g, $T = 5^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$) bevatte $0,06\%$ (17
30 mmol) 6-APA, $0,10\%$ (45 mmol) FGA, $0,53\%$ (104 mmol) AMPI en
 $0,96\%$ (430 mmol) FG.

Deze moederloog werd geconcentreerd via indampen
met behulp van een dunne filmverdamer. De voeding aan de
dunne filmverdamer werd toegevoegd vanuit een
35 voorraadvat, en het product van de dunne filmverdamer
werd weer teruggevoerd naar hetzelfde voorraadvat. Het

voorraadvat werd geroerd.

De wandtemperatuur van de dunne filmverdamer werd ingesteld op $t = 65^{\circ}\text{C}$ en de druk in de dunne filmverdamer werd ingesteld op $P = 80 \text{ mbar}$.

5 Op $t = 0$ werd de circulatie gestart (voorraadvat $\rightarrow$ dunne filmverdamer $\rightarrow$ voorraadvat; flow = 41,6 kg/uur).

De temperatuur van de vloeistof in het voorraadvat werd op $T = 40^{\circ}\text{C}$ gehouden.

10 Op $t = 257$ minuten werd het afdampen gestopt. Er was nu in totaal 5655 g condensaat opgevangen. De inhoud van de dunne filmverdamer en voorraadvat werd nog eens 2 uur gecirculeerd, terwijl de temperatuur lineair werd verlaagd van $T = 40^{\circ}\text{C}$ naar $T = 3^{\circ}\text{C}$. Daarna werd het concentraat (1084 g) afgetapt. De dunne filmverdamer en
15 het voorraadvat werden nagespoeld met achtereenvolgens 250 ml en 2000 ml water ($T = 10^{\circ}\text{C}$). Het concentraat en het 1e waswater werden gecombineerd. Het 2e waswater bevatte verwaarloosbare hoeveelheden AMPI en FG.

20 Voorbeeld V

Terugvoer van de geconcentreerde ampicilline-moederloog als recycle in het ampicilline-proces; afscheiding van FG.

Het gecombineerde concentraat + 1e waswater (voorbeeld IV) werden gefiltreerd over een glasfilter
25 (diameter 10 cm, filtratietijd 10 minuten). De vaste stof werd met 25 ml water ($T = 5^{\circ}\text{C}$) nagewassen. Opbrengst: 210 g AMPI/FG-wetcake. De moederloog (1155 g) werd gespuid.

De AMPI/FG-wetcake werd kwantitatief overgebracht in een geroerde reaktor met behulp van 400 g
30 water. De slurry werd 1 uur geroerd bij $T = 5^{\circ}\text{C}$. Daarna werd bij $T = 5^{\circ}\text{C}$ in 4 minuten 33,0 g 6N HCl toegevoegd. Nadat 5 minuten was nageroerd werd de slurry gefiltreerd over een glasfilter (diameter 13 cm, filtratietijd 5 minuten). De FG-wetcake werd gewassen met 120 ml water (T
35 $= 5^{\circ}\text{C}$) en gedroogd. Opbrengst = 36,7 g FG. De moederloog en het waswater werden gecombineerd ($T = 5^{\circ}\text{C}$) en na 2

minuten toegevoegd aan de zure oplossing van voorbeeld VI (gedurende 30 minuten).

Voorbeeld VI

- 5 Ampicilline omkristallisatie, inclusief recycle van de geconcentreerde ampicilline-moederloog.

De omkristallisatie werd uitgevoerd in een opstelling die bestond uit achtereenvolgens: een voorraadvat (4 l), een oplosvat (0,25 l), een filter
10 voorzien van een Seitz-filterplaat, en een kristallisatievat (7 l). Alle vaten waren voorzien van een roerder, een pH-elektrode en een thermometer.

In het kristallisatievat werd 200 ml water ($T = 5^{\circ}\text{C}$) met 5,0 g $\text{AMPI} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ als ent voorgelegd. De pH werd
15 met behulp van 2N NaOH oplossing op $\text{pH} = 7,0$ gebracht.

De AMPI/FG slurry, welke was geïsoleerd zoals beschreven in voorbeeld III, werd kwantitatief overgebracht in het voorraadvat, en al roerend afgekoeld naar $T = 2^{\circ}\text{C}$. Nadat de gehele lijn op $T = 2^{\circ}\text{C}$ was
20 gebracht, werd het oplosvat gevuld vanuit het voorraadvat. Op $t = 0$ werd de pH in het oplosvat ingesteld op $\text{pH} = 1,1$ met behulp van 6N HCl waarna de pH steeds op 1,1 werd gehouden (titratie met behulp van 6N HCl). Vervolgens werd de inhoud van het voorraadvat in 1 uur toegevoegd aan het
25 oplosvat, terwijl de inhoud van het oplosvat aan het kristallisatievat werd gedoseerd, waarbij het niveau in het oplosvat steeds constant werd gehouden. De temperatuur in het kristallisatievat werd op $T = 5^{\circ}\text{C}$ gehouden. De pH in dit vat werd op $\text{pH} = 7,0$ gehouden, door middel van
30 titratie met 2N NaOH oplossing. Daarnaast werden de gecombineerde moederloog en waswater, welke werden bereid zoals beschreven in voorbeeld V, toegevoegd aan het oplosvat, met constante snelheid van $t = 15$ minuten tot $t = 45$ minuten.

35 Op $t = 60$ minuten was het voorraadvat leeg en was er in totaal 300 ml 6N HCl oplossing aan het oplosvat

toegevoegd. Het voorraadvat werd met 450 g water ($T = 5^{\circ}\text{C}$) nagespoeld naar het oplosvat. De titratie met 6N HCl werd gestopt. Het oplosvat werd met 50 g water ($T = 5^{\circ}\text{C}$) nagespoeld naar het kristallisatievat. De pH in het

5 kristallisatievat werd met behulp van 6N HCl verlaagd naar 6,0. Na 1 uur nadoeren werd de slurry in het kristallisatievat gefiltreerd over een glasfilter, en de wetcake werd gewassen met 2x 175 ml water ($T=5^{\circ}\text{C}$) en gedroogd. Opbrengst:

10 227 g AMPI. $3\text{H}_2\text{O}$ (incl. ent), dus
222 g AMPI. $3\text{H}_2\text{O}$ (excl. ent), dat wil zeggen
92 % AMPI. $3\text{H}_2\text{O}$ ten opzichte van 600 mmol 6-APA.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum uit een mengsel dat het β -lactam antibioticum en D-fenylglycine (FG) in oplossing bevat, waarbij het mengsel bij een concentratie zodanig dat FG in oplossing blijft, op een pH tussen 3 en 8 wordt gebracht, het verkregen vaste β -lactam antibioticum wordt gewonnen en de resterende vloeistof wordt onderworpen aan een concentratiestap waarbij een slurry ontstaat met vast β -lactam antibioticum en vast FG, de verkregen slurry op een pH wordt gebracht waarbij het β -lactam antibioticum oplost, FG als vaste stof wordt afgescheiden, en het in de moederloog aanwezige β -lactam antibioticum althans ten dele wordt benut.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij de concentratie van het mengsel zodanig wordt gekozen dat, nadat het mengsel op een pH tussen 3 en 8 is gebracht, de FG oververzadigd in de oplossing aanwezig is.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarin het in de moederloog aanwezige β -lactam antibioticum althans ten dele wordt gewonnen.
4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3, waarin de moederloog wordt teruggevoerd en gecombineerd met het mengsel.
5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4, waarin de concentratie wordt uitgevoerd bij een temperatuur tussen 20 en 60°C gedurende 0,5-10 uur.
6. Werkwijze volgens conclusie 5 waarin de concentratie wordt uitgevoerd bij een temperatuur tussen 25 en 55°C gedurende 1-5 uur.
7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6, waarin de concentratie wordt uitgevoerd in een dunne filmverdamer.

8. Werkwijze volgens een der conclusies 1-7, waarin de concentratiefactor tijdens de concentratie ligt tussen 3 en 20.
9. Werkwijze volgens een der conclusies 1-8, waarin de
5 slurry eerst wordt onderworpen aan een scheiding in een vloeistofstroom en een geconcentreerde slurry of een vaste stof.
10. Werkwijze volgens conclusie 9, waarin de scheiding wordt uitgevoerd in een decanter.
- 10 11. Werkwijze volgens een der conclusies 1-10, waarbij het uitgangsmengsel dat in hoofdzaak β -lactam antibioticum en FG bevat, afkomstig is uit een enzymatische acyleringsreactie waarbij de
15 overeenkomstige β -lactamkern wordt geacyleerd met een D-fenylglycine derivaat.
12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarin het na de acyleringsreactie verkregen mengsel eerst wordt onderworpen aan een pH wijziging tot een pH tussen 6,5 en 11, of een pH tussen 0 en 3.
- 20 13. Werkwijze volgens conclusie 12, waarin het mengsel wordt onderworpen aan een pH-verlaging tot een pH tussen 0,3 en 2.
14. Werkwijze volgens een der conclusies 1-13, waarin het mengsel 10-1500 mM β -lactam antibioticum, 0-1500 mM
25 FG, 0-1000 mM D-fenylglycinederivaat en 0-1000 mM β -lactamkern bevat.
15. Werkwijze volgens een der conclusies 1-14 waarbij de β -lactamkern 6-aminopenicillilaanzuur (6-APA) is en het β -lactam antibioticum ampicilline is.
- 30 16. Werkwijze volgens een der conclusies 1-14, waarbij de β -lactamkern 7-aminodesacetoxycefalosporaanzuur (7-ADCA) is en het β -lactam antibioticum cefalexine.
17. Werkwijze volgens een der conclusies 1-14, waarbij de β -lactamkern 7-amino-3-chloor-cef-3-em-4-carbonzuur
35 (7-ACCA) is en het β -lactam antibioticum cefaclor.

18. Werkwijze voor het winnen van een β -lactam antibioticum zoals beschreven en toegelicht aan de hand van de voorbeelden.

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde 9289NL
Nederlandse aanvraag nr. 1007077		Indieningsdatum 19 september 1997
		Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) CHEMFERM V.O.F.		
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type --		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 29945 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)		
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int.Cl.6: C 07 D 499/18, C 07 D 501/12, C 12 P 37/04, C 12 P 35/04		
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK		
Onderzochte minimum documentatie		
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen	
Int.Cl.6:	C 07 D, C 12 P, A 61 K	
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen		
III. ☐ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)		
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)		

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007077

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP

IPC 6 C07D499/18 C07D501/12 C12P37/04 C12P35/04

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

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)

IPC 6 C07D C12P A61K

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

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

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	WO 97 22610 A (CHEMFERM V.O.F.) 26 Juni 1997 zie bladzijde 3, regel 7 - bladzijde 4, regel 19; conclusies ---	1-18
A	WO 96 30376 A (CHEMFERM V.O.F.) 3 Oktober 1996 zie het gehele document ---	1-18
A	WO 96 23796 A (CHEMFERM V.O.F.) 8 Augustus 1996 zie het gehele document ---	1-18
A	WO 95 03420 A (DSM N.V.) 2 Februari 1995 zie het gehele document ---	1-18
	-/--	

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

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

- *A* document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang
- *E* eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna
- *L* document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven
- *O* document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel
- *P* document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

- *T* later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt
- *X* document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten
- *Y* document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt
- *G* document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

24 April 1998

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

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

De bevoegde ambtenaar

Chouly, J

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007077

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	US 5 034 522 A (F.G. SCHREIBER) 23 Juli 1991 zie conclusies -----	1-18

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007077

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