(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 831203 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 831203

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **11.04.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.04.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.10.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.04.1982 US 370,242

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Genex Corporation, 6110 Executive Boulevard, Rockville, Maryland, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Swann, Wayne Elliott, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä biologisten aineiden immobilisoimiseksi kondensoituihin polyalkyleeni-imiinipolymeereihin.

Förfarande för immobilisering av biologiska material i kondenserade polyalkyleniminpolymerer.

Menetelmä biologisten aineiden immobilisoimiseksi kondensoituihin polyalkyleeni-imiinipolymeereihin

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään biologisten aineiden immobilisoimiseksi. Erityisesti tämä keksintö kohdistuu biologisten aineiden immobilisointiin sulkemalla ne polymeerin sisään.

Biologisia aineita kuten entsyymejä tai entsyymiä tuottavia mikro-organismeja tai soluja käytetään usein katalyytteinä synteettisiä reaktioita varten ja analyyttisiä menetelmiä varten. Tällaiset katalyytit ovat haluttuja, koska ne toimivat hyvin spesifisesti ja tehokkaasti suhteellisen hellävaraisissa reaktio-olosuhteissa.

Koska entsyymit ja muut biokatalyytit ovat yleensä vesiliukoisia soveltuvat ne käytettäviksi panostyyppisissä reaktiojärjestelmissä. Tällaisten entsyymien ja muiden biokatalyyttien uudelleenkäyttö on rajoitettua johtuen vaikeuksista ottaa talteen näitä aineita aktiivisessa tai käyttökelpoisessa muodossa käytetystä reaktioväliaineesta. Nämä aineet pyrkivät lisäksi jäämään valmistettuun tuotteeseen epäpuhtauksina. Näiden ongelmien välttämiseksi on kehitetty menetelmiä biologisten aineiden immobilisoimiseksi, joilla on katalyyttinen vaikutus liukenemattomilla kiinteillä kantajilla. Immobilisoinnin tarkoituksena on johtaa stabiiliin biologiseen aineeseen, joka kykenee sietämään toistuvan tai jatkuvan käytön rasitukset.

Useita immobilisointijärjestelmiä biologisille aineille on selostettu. Entsyymejä on immobilisoitu absorboimalla liukenemattomille aineille kuten puuhiilelle, lasille, selluloosalle, kalsiumfosfaattigeelille, montmorilloniitille ja orgaanisille ioninvaihtohartseille mm. Immobilisointia on myös aikaansaatu sulkemalla tärkkelys- ja akryyliamidigeelien sisään, kovalenttisella sidoksella entsyymien ja liukenemattomien orgaanisten polymeerien välillä kuten myös kovalenttisella sidoksella entsyymimolekyylien välillä.

Ennestään tunnetut menetelmät johtivat usein tuotteisiin, joilla oli alentunut entsymaattinen aktiivisuus verrattuna vastaavaan sitoutumattomaan biologiseen aineeseen. Nämä biologiset aineet ovat tunnetusti herkkiä lämpö- tai kemialliselle denaturoinnille tai inaktivoinnille. Biologisen aktiviteetin menetys on usein seurauksena, kun immobilisointitoimenpiteet suoritetaan ankarissa olosuhteissa, mikä voi olla erityisen ongelmallista kun kysymyksessä ovat polymeerikondensaatioreaktiot. Lisäksi ennestään tunnetuista menetelmistä saadut tuotteet ovat usein epäedullisia mitä tulee niiden hydrofiilisyyteen, lujuuteen, kestävyyteen ja huokoisuuteen.

Nyt on havaittu, että biologisia aineita voidaan immobilisoida yksinkertaisella taloudellisella tavalla säilyttäen samalla niiden katalyyttinen aktiivisuus korkealla tasolla. Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä aikaansaa liukenemattomaksi tehdyn biologisen ainekoostumuksen, joka sisältää biologista ainetta suljettuna kondensoidun polyalkyleeni-imiinipolymeerin sisään. Joskin yhdistelmä valmistetaan suorittamalla polymeerikondensaatioreaktiot biologisen aineen läsnäollessa, ovat reaktio-olosuhteet niin hellävaraisia, että ainoastaan vähäistä aktiviteetin menetystä esiintyy. Tällaisilla yhdistelmillä on erinomainen lujuus ja kestävyys. Näiden aineiden hydrofiilisyyttä voidaan lisäksi säätää vaihtelemalla kondensointiastetta. Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä aikaansaadaan yhdistelmä, joka voidaan erottaa reaktioseoksista yksinkertaisella suodatuksella tai jota voidaan käyttää jatkuvissa reaktioprosesseissa, kuten sellaisissa, joissa reagoiva substraatti virtaa sullotun kolonnireaktorin läpi.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän mukaisesti kondensoidaan polyalkyleeni-imiinipolymeeri polykarboksyylihapon kondensoivalla määrällä kondensointiaineen ollessa läsnä kondensoivassa määrässä, jolloin mainittua biologista ainetta sekoitetaan mainitun polyalkyleeni-imiinipolymeerin kanssa kondensointireaktion aikana. Kondensointiaineen lisäys johtaa liukenemattomaksi tehdyn biologisen aineyhdistelmän muodostumiseen, jossa biologinen aine on immobilisoituna

polymeerin sisällä. Biologisen aineen immobilisointi polymeerin sisään voi tapahtua fysikaalisena sisäänsulkemisena kuten myös polyalkyleeni-imiinin tai kondensointiaineen ja biologisen aineen reaktiivisten ryhmien välisenä kovalenttisena sidoksena. Biologinen aine voidaan esimerkiksi immobilisoida kovalenttisen sidoksen kautta, koska biologisen aineen amiini- ja karboksyyliryhmät voivat korvata joko amiiniryhmän polyalkyleeni-imiinillä tai karboksyyliryhmän polykarboksyylihapolla ja lopuksi kovalenttisesti sitoutua polymeeriin.

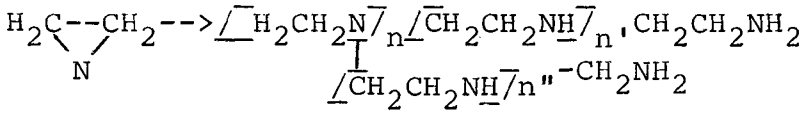
Esillä olevan keksinnön menetelmä mahdollistaa monien erilaisten biologisten sekamateriaalien valmistamisen, jotka voivat erota hydrofiilisyyden, lujuuden, kestävyyden ja huokoisuuden suhteen. Kondensaatioasteen aleneminen voi johtaa seokseen, jolla on suurempi liukoisuus veteen. Monifunktionaalisten ristikytkentäaineiden lisääminen voi lisätä polymeeribiologisen sekamateriaalin lujuutta ja kestävyyttä, kun funktionaaliset lisäryhmät edelleen kondensoivat polyalkyleeni-imiinipolymeeriä.

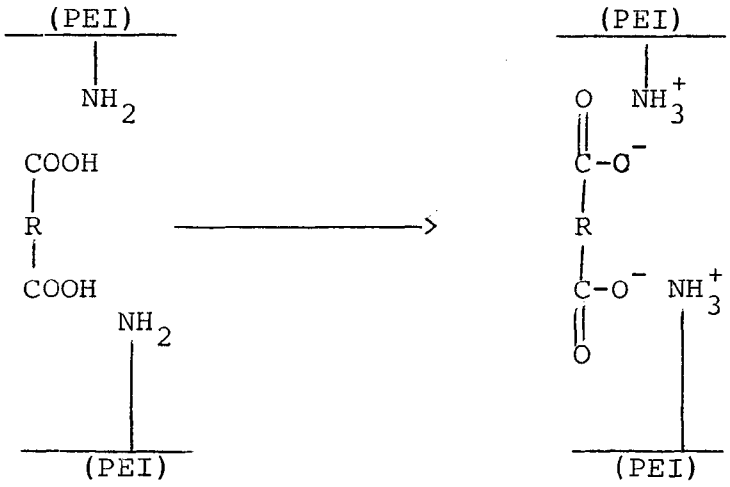
Matriisin kokonaishuokoisuutta voidaan lisätä lisäämällä vesiliukoista osasmuodossa olevaa ainetta polymeeriseokseen ennen täydellista kondensaatiota. Kuiva aine poistetaan sen jälkeen lisäämällä vettä kondensoinnin jälkeen, joka liuottaa kiintoaineen. Seoksen ne osat, jotka ennen olivat kiintoaineiden täyttämiä jäävät tyhjiksi lisäten siten matriisin huokoisuutta. Mitä tahansa vesiliukoista osasmuodossa olevaa ainetta, joka ei haitallisesti vaikuta polymeerin tai biologiseen aineeseen merkittävästi, voidaan käyttää seoksen huokoisuuden kohottamiseen. Vesiliukoiset polykarboksyylihapot, kuten sellaiset jotka on saatettu reagoimaan kondensoitumattomien polyalkyleeni-imiinien kanssa, ovat erityisen soveltuvia matriisin huokoisuuden kohottamiseen, koska huokoisuuden lisäämiseen käytetyt ylimäärät eivät olennaisesti haittaa kondensointireaktioita.

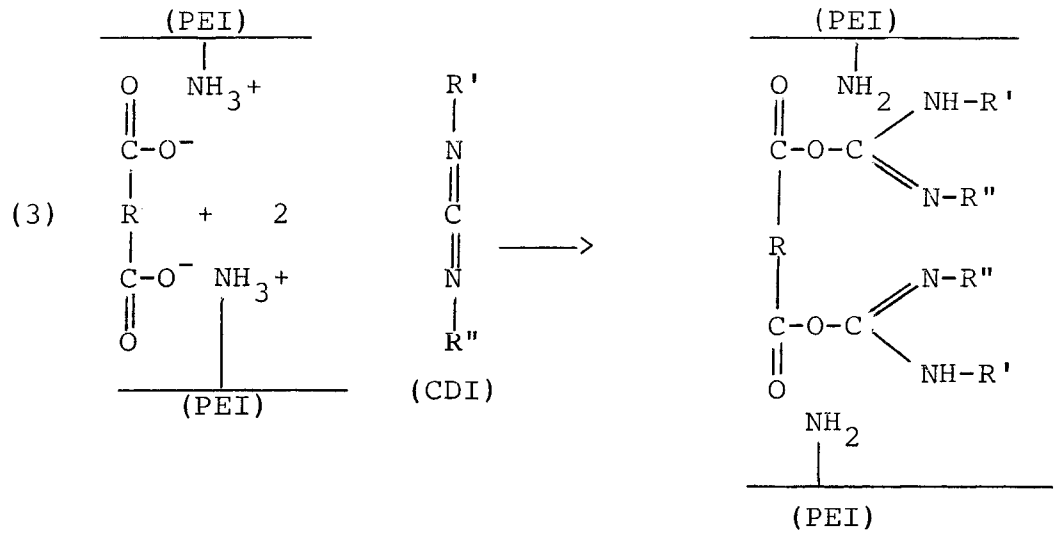
Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetyt polyalkyleeni-imiinit ja seokset ovat polymeerejä, joita voidaan synteti-

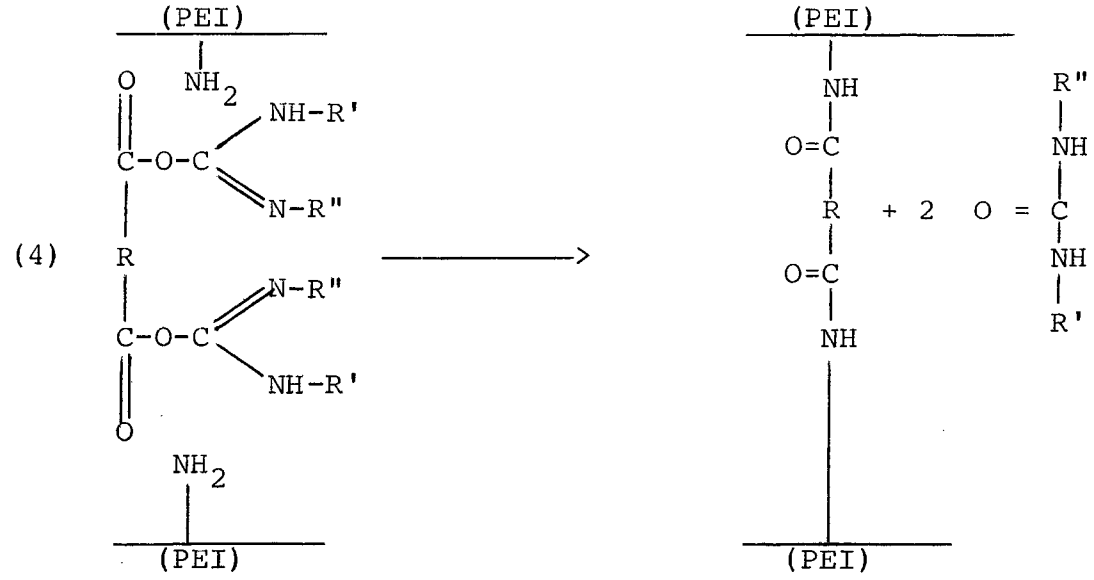
soida alkyleeni-imiinimonomeerien happokatalysoidulla additiopolymeroinnilla. Tällaisten polymeerien molekyylipaino vaihtelee tavallisesti 30 000 ja 100 000 välillä, riippuen reaktio-olosuhteista ja niillä on edullisesti haarautunut ketjurakenne.

Polyetyleeni-imiini (PEI) on suosittu polyalkyleeni-imiini, koska se tällä hetkellä on helposti saatavana suhteellisen halvalla ja toimii hyvin keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetyissä kondensointireaktioissa. Polyetyleeni-imiiniä valmistetaan rengas-avauspolymeroimalla etyleeni-imiiniä katalyyttien, kuten mineraalihappojen läsnäollessa. Polymeeri on erittäin haarautunut ja sisältää primäärisiä, sekundäärisiä ja tertiäärisiä aminoryhmiä. PEI on vesiliukoinen ja polymeeriketjujen kondensoiduttua saadaan veteen liukenematon tuote. Eräässä erittäin tehokkaassa kondensointimenetelmässä käytetään polykarboksyylihappoa (PCA) viereisissä PEI-ketjuissa olevien amiiniryhmien silloitukseen. Kondensointiaineet, edullisesti karbodi-imidit vaikuttavat helposti kondensaatioon. Esillä olevan keksinnön mukaisen kondensoidun polyetyleeni-imiinin valmistukseen liittyvät reaktiot on esitetty alla:

(1) 

(2) 





Reaktio (1) kuvaa etyleeni-imiinin polymerointia PEI:ksi, jolla on haarautunut ketjurakenne, jossa n ja n' ovat kokonaislukuja suurempi kuin 0 ja n" voi olla 0 /tarkoittaen että (CH_2CH_2NH)-ryhmä on poissa/ tai suurempi kuin 0. Reaktio (2) esittää PEI:n amiiniryhmien suolan muodostusta polykarboksyylihapon kanssa, jossa R voi olla suora sidos tai substituoitu tai substituoimaton hiilivetyryhmä, esimerkiksi suora tai haarautunut hiilivety, jossa mahdollisesti on alisyklisiä, olefiinisiä tai aromaattisia ryhmiä, kuten myös erilaisia funktionaalisia ryhmiä, kuten hydroksyylejä, karbonyylejä, karboksyyliryhmiä, amiineja, nitriilejä, amideja,

estereitä ja sentapaisia, jotka eivät haitallisesti vaikuta kondensointireaktioon, biologisiin aineisiin tai saatuun seokseen. Tällaiset ryhmät voivat laajasti vaihdella hyvin lukuisten käyttökelpoisten polykarboksyylihappojen aikaansaamiseksi, kuten alla selostetaan. Reaktiot (3) ja (4) esittävät PEI:n ja polykarboksyylin kondensaatiota käyttäen karbodi-imidikondensointiainetta. R' ja R" ovat hiilivetyryhmiä, joita yhdessä muiden reagenssien ja esitettyjen reaktioiden olosuhteiden mukaan on selostettu yksityiskohtaisemmin alla.

Yleensä esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoiset polykarboksyylihapot voivat olla substituoituja tai substituoimattomia karboksyylihappoja, joissa on vähintään kaksi karboksyyliryhmää. Edullisesti polykarboksyylihapot ovat vesiliukoisia, niin että niitä voidaan käyttää seoksen huokoisuuden lisäämiseen kuten myös polyalkyleeni-imiinin kondensointiin. Esimerkkejä polykarboksyylihapoista, joita voidaan käyttää esillä olevan keksinnön menetelmissä ja seoksissa ovat adipiini-, atselaiini-, 1,11-undekaanidioni-, 1,12-dodekaanidioni-, trauma-, pentadekaanidioni-, heksadekaanidioni-, sebasiini-, suberiini-, glutaari-, maloni-, pimelliini-, meripihka-, maliini-, maleiini-, glutaami-, asparagiini-, oksaali-, fumaari-, polyasparagiinihappo ja sentapaiset. Esillä olevassa keksinnössä käytetään edullisesti dikarboksyylihappoja kuten maleiinihappoa, meripihkahappoa, glutaarihappoa ja adipiinihappoa. Korkeammat polykarboksyylihapot käsittävät minkä tahansa aineen, joka sisältää kaksi tai useampia karboksyylihapporyhmiä, esimerkiksi suurmolekyylipainoisia polymeerisiä aineita, kuten polyasparagiinihappo, jonka molekyylipaino on noin 5000 - 70 000. Kondensaatioreaktiot ovat yleensä eksotermisiä, sen vuoksi reaktioseoksia edullisesti jäähdytetään lämpötilaan, joka ei ole haitallinen immobilisoidulle biologiselle aineelle, esimerkiksi noin 37°C:een tai alemmaksi.

Polykarboksyylihapon ja polyalkyleeni-imiinin moolisuhde (PCA:PAI) voi vaihdella suuresti, johtuen reagoivien aineiden

molekyylipainojen vaihteluista. Yleensä voidaan polykarboksyylihappoa käyttää missä tahansa kondensoivassa määrässä ja PCA/PAI-suhde ulottuu yleensä arvosta 1:20 arvoon 1:0005. Kun polykarboksyylihappoa lisätään esillä olevan keksinnön seoksen huokoisuuden kohottamiseksi käytetään usein huomattavaa mooliylimäärää polykarboksyylihappoa.

Yhdistelmiä valmistettaessa voidaan käyttää mitä tahansa ainesosien lisäysjärjestystä. Immobilisoitavaa biologista ainetta voidaan esimerkiksi lisätä koska tahansa ennen polymeerin kiinteyttämistä, mutta se lisätään edullisesti sen jälkeen kun polykarboksyylihappo on lisätty polyalkyleeni-imiiniin. Eräs suosittu menetelmä esillä olevan keksinnön mukaisten seosten valmistamiseksi on lisätä kondensoiva määrä polykarboksyylihappoa polyalkyleeni-imiiniin esipolymerointiolosuhteissa vesiliukoisen esipolymeerin valmistamiseksi. Esipolymeeri on yleensä viskoottinen neste, johon biologinen aine voidaan sopivasti lisätä ja sitä pidetään suspensiossa kondensointireaktion aikana. Kondensoivaa ainetta lisätään sen jälkeen kondensoinnin aikaansaamiseksi ja polymeeri-biologisen aineyhdistelmän kiinteyttämiseksi. Reaktioseoksen pH pidetään tasolla, joka ei olennaisesti inaktivoi tai vaikuta haitallisesti biologiseen aineeseen. pH voi olla noin 2-12 ja edullisesti noin 5-10.

Polymeeriin lisätyn biologisen aineen määrä voi vaihdella biologisen aineyhdistelmän lopullisen erityiskäytön mukaisesti. Yleensä se on noin 0,001-10 g (kuivapainon perusteella) käytetyn polyalkyleeni-imiinin grammaa kohti, edullisesti noin 0,1-5 g per gramma PAI:ta. Biologinen aine voi olla entsyymejä, mikrobisoluja, antigeeneja, vasta-aineita, antibiootteja, hiilihydraatteja, koentsyymejä, kasvisoluja, eläinsoluja, bakteereja, hiivoja, sieniä, kudosviljelmiä tai näiden seoksia. Entsyymejä voidaan lisätä reaktioseokseen vesiliuoksena tai jauheen muodossa, edullisesti jälkimmäisenä. Soluja voidaan lisätä kostean pastan tai kuivien osasten muodossa.

Kuten yllä on todettu,käytetään edullisesti kondensointiainetta polyalkyleeni-imiiniketjujen kondensoinnin aikaansaamiseksi polykarboksyylihappojen välityksellä. Yleensä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista kondensointiainetta, joka katalysoi tai mahdollistaa amiinien ja karboksyylihappojen välisen reaktion. Esimerkkejä tällaisista kondensointiaineista ovat N-etyyli-5-fenyyli-isoatsolium-3-sulfonaatti, n-etoksikarbonyyli-2-etoksi-1,2-dihydrokinoliini ja erilaiset karbodi-imidit. Karbodi-imidikondensointiaineet ovat edullisia ja tällaisia aineita ovat yleensä sellaiset yhdisteet, joilla on kaava R'-N=C=N-R", jossa R' ja R" tarkoittavat 3-20 hiiliatomia, edullisesti noin 5-12 hiiliatomia sisältäviä hiilivetyryhmiä. Tällaisia karbodi-imidikondensointiaineita ovat 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi, disykloheksyylikarbodi-imidi, 1-sykloheksyyli-3-(2-morfolinoetyyli)-karbodi-imidimeto-p-tolueenisulfonaatti ja niiden suolat. Karbodi-imidikondensointiaineita lisätään reaktioseokseen kondensoivassa määrin, joka tavallisesti on olennaisesti stökiömetrinen määrä; esimerkiksi noin 0,2-3 kertaa, edullisesti noin 0,5-1,5 kertaa stökiömetrinen määrä. Jokainen karbodi-imidimolekyyli reagoi polykarboksyylihapon yksittäisen happoryhmän kanssa. Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään tavallisesti esimerkiksi moolisuhdetta noin 2:1 karbodi-imidin ja dikarboksyylihapon välillä; jos ylimäärin polykarboksyylihappoa käytetään seoksen huokoisuuden lisäämiseksi käytetään kuitenkin paljon alhaisempia moolisuhteita. Kun kondensointiainetta lisätään huoneen lämpötilassa, tapahtuu merkittävää polymerointia 30 sekunnin sisällä ja on yleensä täydellinen noin kahden tunnin sisällä.

Esillä olevan keksinnön erityisiin suoritusmuotoihin voi lisäksi kuulua seoksen jälkikäsittely amiiniristikytkentäaineella lisäkestävyyden ja -lujuuden aikaansaamiseksi. Tällaisia ristikytkentäaineita ovat glutaaridialdehydi, di-isosyanaatit, polyisosyanaatit, 2,4,6-trikloori-S-triatsiini, bisoksiraani, bisimidaatti, divinyylisulfoni, 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni ja sentapaiset. Glutaaridialdehydi on edullinen tässä mielessä.

Esillä olevan keksinnön mukaisia selostettuja menetelmiä käyttämällä on mahdollista immobilisoida hyvin lukuisia biologisia aineita uusien biokatalyyttisten seosten aikaansaamiseksi. Alla olevissa esimerkeissä on immobilisointimenetelmää selostettu yksityiskohtaisemmin.

Esimerkki I

Polyetyleeni-imiiniä (4,0 g 30 %:sta vesiliuosta) sekoitettiin meripihkahapon kanssa (2 g). Seoksen lämpötila nousi 45°C:een ja sen annettiin jäähtyä 22°C:een. Tällä kohtaa saatu seos oli vesiliukoinen esipolymeeri. Soluvapaa vesipitoinen aspartaasiliuos valmistettiin US-patenttihakemuksen n:o 311 618 esimerkin 1 ensimmäisen kappaleen menetelmien mukaisesti. Yksi ml aspartaasiliuosta lisättiin sen jälkeen vesiliukoiseen esipolymeeriseokseen, joka sen jälkeen kondensoitiin lisäämällä 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidihydrokloridia jauheen muodossa. Kondensointiaineen lisäys johti polymerointiin 30 sekunnin sisällä antaen kiinteän biologisen aineseoksen geelin muodossa. Geeli jauhettiin sen jälkeen huhmareissa petkereellä pienien osasten aikaansaamiseksi.

Esimerkki II

Esimerkin I osasmainen biologinen aineyhdistelmä asetettiin 50 ml:aan liuosta, jossa oli 1 mooli ammoniumfumaraattia, 1 mmooli magnesiumsulfaattia, pH 8,5 ja seosta sekoitettiin 30 min. Liuos suodatettiin ja menettelytapa toistettiin kahdesti, jolloin toista sekoitusta jatkettiin 16 h.

Osaset asetettiin sen jälkeen 35 ml:aan samaa ammoniumfumaraattisubstraattiliuosta 37°C:ssa. Tunnin jälkeen havaittiin, että biologisesti aktiiviset osaset olivat muuntaneet 1509 µmoolia ammoniakkifumaraattia L-asparagiinihapoksi. Osaset puhdistettiin sen jälkeen tuoreella substraatilla, kuivattiin osittain ja asetettiin taas 35 ml:aan ammoniumfumaraattisubstraattiliuosta 37°C:ssa. Jälleen yhden tunnin jälkeen oli 1509 µmoolia ammoniumfumaraattia muuttunut L-asparagiinihapoksi, mikä viittaa siihen, että yhdistelmän biologinen aktiivisuus oli säilynyt.

Esimerkki III

Polyetyleeni-imiiniä (6 g) sekoitettiin jauhetun meripihkahapon (3 g) kanssa ja annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan. Kosteaa solutahnaa, jossa oli noin 75 paino-% vettä valmistettiin tuoreesta asparagiinipitoisesta E. colista seuraavaan tapaan. Fermentaatioväliainetta valmistettiin liuottamalla yhteen litraan vettä 24 g hiivauutetta, 30 g fumaarihappoa, 2 g natriumkarbonaattia, 2 mM magnesiumsulfaattia ja 0,1 mM kalsiumkloridia ja pH säädettiin arvoon noin 7,2 ammoniumhydroksidilla. Tämä väliaine ympättiin yhdellä ml:lla E. coliviljelmää (ATCC n:o 31976), jota oli inkuboitu 12-16 h 37°C:ssa peptoniväliaineessa, jossa oli 0,5 % mononatriumglutamaattia. Ympätty väliaine inkuboitiin 12-14 h 37°C:ssa. Solut erotettiin sentrifugoimalla 5000 kierr/min 30 min. Kolme grammaa kosteaa solutahnaa lisättiin tasaisesti esipolymeeriin. Sen jälkeen lisättiin ja sekoitettiin noin minuutin ajan 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidikloridia (EDAC-HCl),(2 g). Saatu seos polymeroitiin. Seistyään huoneolosuhteissa 2 h jauhettiin polymeroitu seos osasiksi. Geeliosaset liuotettiin sen jälkeen vesiliuoksessa, jossa oli 1,5 M ammoniumfumaraattia, pH 8,5 22°C:ssa. Tämä liuotus toistettiin tuoreella substraatilla, sen jälkeen geeli puhdistettiin kolmannella substraattialikvootilla. Geelin asparagiiniaktiivisuus analysoitiin viittaamalla fumaarihapon häipyminen spektrofotometrillä 240 nm:ssä. Geeliosasia sekoitettiin jatkuvasti huoneen lämpötilassa panosreaktorissa tunnin ajan substraatin (75 ml) läsnäollessa. Noin 98 %:n konversio havaittiin, joka vastasi reaktion tunnettua tasapainoa. Reaktio uudistettiin samoilla tuloksilla. Taulukko I esittää ammoniumfumaraatin pitoisuuden alenemista ajan myötä kahdelle panosreaktiolle.

Taulukko I

Substraattipitoisuuden aleneminen ajan funktiona

Reaktio-aika (min)	mg/ml ammoniumfumaraattia	
	Ajo 1	Ajo 2
0	174,0	174,0
15	77,9	78,6
30	37,6	36,5
60	1,8	2,7

Esimerkki IV

Puolet esimerkin III panosreaktioihin käytetystä geelistä panostettiin halkaisijaltaan 0,9 cm:n kolonniin. Saatu petitilavuus oli 14 cm^3. 1,5 M ammoniumfumaraattiliuosta (22°C; pH 8,5) pumpattiin kolonnin läpi (ylävirtaan) nopeudella 1 tilavuusvirtaus (SV) tunnissa (14 cm^3/h) jatkuvasti 70 päivää. Näytteitä poistovirrasta analysoitiin ammoniumfumaraatin häipymisen suhteen. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa II. Kolonnin muuntonopeus alussa oli 190 g ammoniumfumaraattia/l patjatilavuutta/h 22°C:ssa ja nopeus laski 168 g:aan/l/h 70 päivän jatkuvan toiminnan jälkeen. Tämä edustaa ainoastaan 12 %:n tuotantotappiota.

Taulukko II

Päivä	Prosentuaalinen konversio
1	95,4
2	95,9
22	96,8
38	93,1
70	84,2

Esimerkki V

PEI (3 grammaa) sekoitettiin 1,4 g:n kanssa meripihkahappoa ja annettiin seistä huoneen lämpötilassa. Tähän seokseen sekoitettiin 1 1/2 grammaa talteenotettuja hiivasoluja, Rhodotorula rubra (ATCC 4056), jotka sisälsivät fenyylialaniiniammoniakki-lyaasiaktiviteettia. Sen jälkeen lisättiin 1 g 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidihydrokloridia ja sekoitettiin minuutin ajan. Saatu seos polymeroitui jäykäksi geelimäiseksi aineeksi. Geeli jauhettiin huhmareissa petkeleellä ja liuotettiin sen jälkeen, pestiin ja liuotettiin uudelleen substraattiliuokseen, joka sisälsi t-kanelihappoa ja ammoniumhydroksidia pH-arvossa 9,5. Pesty aine säilytti punaisen värinsä, kun taas pesuliuos oli visuaalisesti väritän ja kirkas, mikä osoitti, että punaiset R. rubra-solut pysyivät yhdistelmäosasissa. 39 tunnin jälkeen suodatettiin saatu reaktioseos ja suodatteen L-fenyylialaniini analysoitiin. Fenyylialaniinin pitoisuus suodat-

teessa todettiin suurin piirtein 0,5 grammaksi/litra.

Esimerkki VI

Suoritettiin koesarja polykarboksyylihapon vaikutuksien tutkimiseksi järjestelmässä. Kussakin kokeessa seurattiin esimerkin III menettelytapaa, seuraavilla poikkeuksilla: käytettiin 3 g PEI:tä, 2 g polykarboksyylihappoa, 1,5 g EDAC.HCl:ää ja 1 g E. coli-solutahnaa. Erillinen immobilisointireaktio suoritettiin kullekin seuraavista polykarboksyylihapoista: atselaiini-, 1,11-undekaanidioni-, 1,12-didekaanidioni-, trauma-, pentadekaanidioni-, heksadekaanidioni-, sebasiini-, suberiini-, glutaari-, maloni- ja pimelliinihappo. Jokainen polykarboksyylihappo immobilisoi tehokkaasti solut. Saaduista yhdistelmistä valittiin kuusi, ulottuen molekyylipainoltaan alhaisista korkeisiin (glutariini-, pimelliini-, sebasiini-, 1,11-undekaanidioni-, 1,12-dodekaanidioni- ja suberiinihappo) niiden biologisten aktiviteettien testaamiseksi analyyttisesti. Kaikki kuusi yhdistelmää konvertoivat tehokkaasti ammoniumfumaraattia asparagiinihapoksi.

Esimerkki VII

PEI:tä (5 g) sekoitettiin 1 gramman kanssa polyasparagiinihappoa, sen jälkeen 1,5 g EDAC-HCl:ää lisättiin. Polymerointi tapahtui 5 minuutin sisällä muodostaen sitkeän geelimäisen polymeerin, joka oli liukenematon veteen.

Esimerkki VIII

Tryptofaanisyntetaasi (EC 4.2.1.20) on entsyymi, joka on johdettavissa lukuisista mikrobiologisista lähteistä, esimerkiksi Proteus, Erwinia, Escherichia, Pseudomonas ja Aerobacter-mikro-organismeista. /Katso Methods in Enzymology, Chem. Tech. Rev. Academic Press (1980)/. Tätä entsyymiä voidaan käyttää indolin ja seriinin tryptofaanikonversion katalysoimiseksi. Tässä esimerkissä selostetaan E. coli-soluista saadun tryptofaanisyntetaasientsyymiuutteen immobilisointia. PEI:tä (4 g) ja meripihkahappoa (2 g) sekoitettiin ja seoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan.

Puoli ml entsyymiseosta lisättiin seokseen ja sen jälkeen 1,5 g EDAC.HCl. Saatu geeli jauhettiin osasten kanssa ja pestiin perusteellisesti. Saadut osaset lisättiin sen jälkeen substraattiliuokseen, jossa oli 0,05 M L-seriiniä ja 0,05 M indolia. Yhdistelmän todettiin tehokkaasti konvertoivan substraatin L-tryptofaaniksi reaktioseoksessa kahdessa peräkkäisessä ajossa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä biologisen aineen immobilisoimiseksi valmistamalla liukenemattomaksi tehty biologinen seka-aine, t u n n e t t u siitä, että kondensoidaan polyalkyleeni-imiini-polymeeri polykarboksyylihapon kondensoivalla määrällä kondensointiaineen kondensoivan määrän läsnäollessa, jolloin mainittu biologinen aine sekoitetaan mainitun polyalkyleeni-imiinipolymeerin kanssa kondensointireaktion aikana.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiinipolymeeri on polyetyleeni-imiini, polypropyleeni-imiini, polybutyleeni-imiini ja/tai polypentyleeni-imiini.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiinipolymeeri on polyetyleeni-imiini.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polykarboksyylihappo on dikarboksyylihappo.

5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polykarboksyylihappo on adipiini-, atselaiini-, 1,11-undekaanidioni-, 1,12-dodekaanidioni-, trauma-, pentadekaanidioni-, heksadekaanidioni-, sebasiini-, suberiini-, glutaari-, maloni-, pimeliini-, meripihka-, maliini-, maleiini-, glutaami-, asparagiini-, oksaali-, fumaari- ja/tai polyasparagiinihappo.

6. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karboksyylihappo on meripihkahappo.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensointiaine on N-etyyli-5-fenyyli-isoksatsolium-3-sulfonaatti tai N-etoksikarbonyyli-2-etoksi-1,2-dihydrokinoliini.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensointiaine on karbodi-imidikondensointiaine.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbodi-imidikondensointiaine on 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi, disykloheksyylikarbodi-imidi, 1-sykloheksyyli-3-(2-morfolinoetyyli)karbodi-imidimeto-p-tolueenisulfonaatti tai näiden suola.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbodi-imidikondensointiaine on 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi tai sen suola.

11. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensointiaine on 1-etyyli-3,3-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi tai sen suola.

12. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiinin moolisuhde polykarboksyylihappoon on noin 1:20 - 1:0005.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensointiainetta käytetään noin 0,2-3 kertaa stökiömetrinen määrä polykarboksyylihappoon nähden.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kondensointiainetta käytetään noin 0,5-1,5 kertaa stökiömetrinen määrä polykarboksyylihappoon nähden.

15. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3, 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polyalkyleeni-imiiniä ja polykarboksyylihappoa sekoitetaan ensin, sen jälkeen biologinen aine lisätään ja sitten lisätään kondensointiaine.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu biologinen aine on entsyymi.

17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisoitu biologinen aine käsittää kokonaisia soluja.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kokonaiset solut ovat asparagiinia sisältäviä E. coli-soluja.

19. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine on aspartaasi.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine on fenyylialaniiniammoniakkilyaasia.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine käsittää tryptofaanisyntetaasia.

22. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liukenemattomaksi tehtyä biologista ainetta jälkikäsitellään amiiniristikytkentäaineella yhdistelmän lujuuden ja stabiliteetin lisäämiseksi.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että amiiniristikytkentäaine on glutaaridialdehydi, di-isosyanaatti, polyisosyanaatti, 2,4,6-trikloori-S-triatsiini, bisoksiraani, bisimidaatti, divinyylisulfoni- ja/tai 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että amiiniristikytkentäaine on glutaaridialdehydi.

25. Liukenemattomaksi tehty biologinen seka-aine, t u n n e t t u siitä, että se sisältää biologisesti aktiivista ainetta immobilisoituna kondensoituun polyalkyleeni-polymeeriin, jossa polyalkyleeni-imiiniketjuissa olevat aminoryh-

mät on silloitettu polykarboksyylihapolla.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen aine käsittää entsyymejä, mikrobisoluja, antigeeneja, vasta-aineita, antibiootteja, hiilihydraatteja, koentsyymejä, kasvisoluja, eläinsoluja, bakteereja, hiivaa, sieniä ja/tai kudosviljelmiä.

27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen aine koostuu entsyymeistä ja/tai kokonaisista soluista.

28. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen aine on aspartaasia.

29. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine koostuu aspartaasia sisältävistä kokonaisista E. coli-soluista.

30. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine käsittää fenyylialaniiniammoniakli-lyaasia.

31. Patenttivaatimuksen 25 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että biologinen aine sisältää tryptofaanisyntetaasia.

32. Menetelmä asparagiinihapon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että ammoniumfumaraattia sisältävä substraatti saatetaan asparagiinihappoa tuottavissa olosuhteissa kosketukseen liukenemattomaksi tehdyn biologisen aspartaasia tai aspartaasipitoisia mikrobisoluja sisältävän seka-aineen kanssa, joka on immobilisoitu kondensoituun polyalkyleeni-imiinipolymeeriin, jossa aminoryhmät polyalkyleeni-imiinipolymeeriketjuissa on silloitettu polykarboksyylihapolla.

33. Menetelmä fenyylialaniinin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että t-kanelihappoa ja ammoniakkia sisältävä

substraatti saatetaan fenyylialaniinia tuottavissa olosuhteissa kosketukseen liukenemattomaksi tehdyn biologisen fenyylialaniiniammoniakki-lyaasia tai fenyylialaniiniammoniakki-lyaasipitoisten mikrobisolujen aineseoksen kanssa, joka on immobilisoitu kondensoituun polyalkyleeni-imiinipolymeeriin, jossa aminoryhmät polyalkyleeni-imiinipolymeeriketjuissa on silloitettu polykarboksyylihapolla.

34. Menetelmä tryptofaanin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että indolia ja seriiniä sisältävä substraatti saatetaan tryptofaania tuottavissa olosuhteissa kosketukseen liukenemattomaksi tehdyn biologisen tryptofaanisyntetaasia tai tryptofaani-syntetaasipitoisia mikrobosoluja sisältävän aineseoksen kanssa, joka on immobilisoitu kondensoituun polyalkyleeni-imiinin polymeeriin, jossa aminoryhmät polyalkyleeni-imiinipolymeeriketjuissa on silloitettu polykarboksyylihapolla.

Hak.n:o 831203

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

12.11.-84 Pirkko Kaunisto

Allekirjoitus