NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO (11) **174350** (13) B

(51) Int Cl[5] C 12 N 9/18

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr 914029
(22) Inng. dag 14.10.91
(24) Løpedag 06.01.87
(41) Alm. tilgj. 08.07.87
(44) Utlegningsdato 10.01.94
(62) Avdelt fra 870040

(86) Int. inng. dag og søknadsnummer
(85) Videreføringsdag
(30) Prioritet 07.01.86, GB, 8600245

(71) Patentsøker Gist-brocades NV, P.O. Box 1, NL-2600 MA Delft, NL
Shell Internationale Research Maatschappij BV, P.O. Box 162, NL-2501 Den Haag, NL

(72) Oppfinner Mauro Attilio Bertola, Delft, NL
Arthur Friedrich Marx, Delft, NL
Hein Simon Koger, Spaarndam, NL
Wilhelmus Johannes Quax, Voorschoten, NL
Cornelis Jacobus van der Laken, Leiden, NL
Gareth Thomas Phillips, Sittingbourne, Kent, England, GB
Brian William Robertson, Kent, England, GB
Peter Douglas Watts, Sittingbourne, Kent, England, GB

(74) Fullmektig Jan Helgerud, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **Mikrobiell esterase**

(56) Anførte publikasjoner Biochim. Biophys. Acta, 429 (1), 191-197, 1976.

(57) Sammendrag

Mikrobiell esterase med evnen til stereoselektiv hydrolyse av naproksenester til naproksen med minst 95 vekt-% S-konfigurasjon, idet esterasen har:

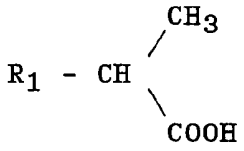
- en spesifikk aktivitet på minst 0,1 enheter pr. mg protein;
- et isoelektrisk punkt på 5,4;
- en tilsynelatende molekylvekt tilsvarende spor 8 i figur 8, bestemt ved bruk av 12,6% SDS-PAGE (polyakrylamidgel-elektroforese) ifølge Laemmli;
- en HPLC-SEC-profil tilsvarende esteraseaktiviteten i figur 1 analysert på en preparativ HPLC-SEC (størrelses-ekskluderingskromatografi)-kolonne;
- en pH-avhengighet for hydrolysen av S-naproksen metylester som vist i figur 2; og
- en temperaturavhengighet for hydrolysen av S-naproksen-metylester som vist i figur 3.

Foreliggende oppfinnelse angår en mikrobiell esterase.

Nærmere bestemt angår oppfinnelsen en mikrobiell esterase som karakteriseres ved evnen til stereoselektiv hydrolyse av naproksenester til naproksen med minst 95 vekt-% S-konfigurasjon, idet esterasen har:

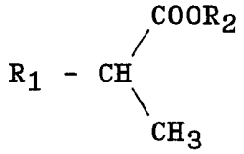
- en spesifikk aktivitet på minst 0,1 enheter pr. mg protein;
- et isoelektrisk punkt på 5,4;
- en tilsynelatende molekylvekt på 31 000;
- en HPLC-SEC-profil tilsvarende esteraseaktiviteten i figur 1, analysert på en preparativ HPLC-SEC-kolonne;
- et pH-optimum mellom 6,5 og 10,0; og
- et temperaturoptimum mellom 25 og 45°C.

Den mikrobielle esterase ifølge foreliggende oppfinnelse finner anvendelse i den fremgangsmåte som er beskrevet i NO-søknad 870040 for fremstilling av en farmasøytisk aktiv forbindelse i stereospesifikk form og med formelen I



(I)

eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller en ester derav, der R_1 betyr en eventuelt substituert arylgruppe som en fenyl- eller naftylgruppe, og der fremgangsmåten omfatter å underkaste en forbindelse med formel II



(II)

der R_1 er som angitt ovenfor og R_2 er en C_{1-8}-alkylgruppe, påvirkning av en mikroorganisme eller stoffer avledet derfra, med esteraseevne til stereoselektiv hydrolyse av forbindelse

(II) til forbindelse (I), med minst 80 vekt-% S-konfigurasjon, i et egnet medium, at forbindelse (I) eventuelt separeres og den gjenværende del hydrolyseres for å fremstille forbindelse (I) med minst 80 vekt-% i R-konfigurasjon, og hvis ønskelig, å omdanne forbindelsen med formel (I) til et farmakologisk akseptabelt salt eller en ester, idet mikroorganismen eventuelt immobiliseres enten som levende celle eller som en drept celle, og at stoffet med evnen til å omdanne forbindelse (II) til en forbindelse (I) eventuelt settes fri fra mikroorganismen og benyttes som sådant.

Det er kjent at mange biologisk aktive forbindelser eksisterer som en blanding av stereoisomerer. Til nu ble disse blandinger hyppig benyttet som sådanne i landbruks- og farmasøytiske formål. Vanligvis lå den biologiske aktivitet i en stereoisomer slik at var det en blanding av to stereoisomerer, ble blandingens potens i beste fall redusert til det halve. Ytterligere en hovedgrunn for bruk av blandinger av stereoisomerer er at separeringsomkostningene for stereoisomerene overskrider den potensielle fordel av en mulig aktivitetsøkning. Imidlertid er det klart at moderne farmakologer blir stadig mer klar over andre implikasjoner ved administrering av blandinger der en av stereoisomerene må anses som en urenhet som ikke behøver å ha den ønskede terapeutiske virkning, men også kan ha andre uønskede fysiologiske virkninger inkludert toksisitet.

Mer spesielt er det oppdaget at in vitro anti-inflammatorisk aktivitet ved naproksen så vel som ibuprofen ligger i S-enantiomeren (optisk aktiv stereoisomer) som er opptil 150 ganger mer aktiv enn antipoden, slik det er kjent fra S. Adams et al., "J. Pharm. Pharmac.", 28 (1976) 256 og A.J. Hutt og J. Caldwell, "Clinical Pharmacokinetics", 9 (1984) 371.

S. Iriuchijima og A. Keiyu ("Agric. Biol. Chem.", 45 (1981) 1389 viste at utvalgte mikroorganismer er i stand til å

hydrolysere metylestrene av naproksen og ketoprofen, men med lav omdanningsgrad. Aspergillus sojae hydrolyserte preferensielt metylesteren av R-naproksen og ga naproksen 95 vekt-% R-konfigurasjon, mens Mycobacterium smegmatis fortrinnsvis hydrolyserte metylesteren av S-ketoprofen og ga ketoprofen med kun 59 vekt-% S-konfigurasjon.

I DE-søknad 33 45 660 er fremstilling av S-naproksen fra racemiske naproksenestere beskrevet. Imidlertid blir ifølge denne søknad S-naproksenet ikke direkte dannet fra den racemiske blanding av naproksenesterne, men dannes ved forsåpning eller ved enzymatisk hydrolyse av S-naproksenesteren som forblir i reaksjonsblandingen efter at esteren av R-naproksen enzymatisk er hydrolysert og det dannede R-naproksen separeres fra esteren av S-naproksen.

I en nyere publikasjon (Qu-Ming et al., "Tetrahedron Letters", vol. 27, nr. 16 (1986) s. 17-63) beskrives et enzympreparat fra Candida cylindracea som er i stand til å omdanne S-naproksenester stereoselektivt. Forfatterne har vist at Candida lipase som er til stede i preparatet, er ansvarlig for naproksenesterhydrolysen. Imidlertid er den spesifikke aktivitet for det rensede lipase-preparat ekstremt lav (3×10^{-8} mol/min./mg lipase under de angitte betingelser).

Mer spesielt fremstilles ved fremgangsmåten ifølge NO-søknad 870040 naproksen hovedsakelig i S-konfigurasjon.

Som antydet ovenfor angår oppfinnelsen et enzym som er minst 10 ganger mer aktivt enn den ovenfor nevnte Candida cylindracea lipase og fortrinnsvis 100 ganger mer aktivt.

Innføring av nytt genetisk materiale i mikroorganismer for å gi dem evnen til steroselektiv omdanning av forbindelse II til forbindelse I kan gjennomføres ved å transformere det klonede gen som koder en substans ansvarlig for den stereo-

selektive hydrolyse, et esterase-enzym fra en hvilken som helst av de avsøkte mikroorganismer til en annen mikroorganisme, spesielt ti Escherichia coli. Andre mikroorganismer kan tilhøre genus Saccharomyces, Kluyveromyces, Aspergillus, Escherichia, Pseudomonas og Streptomyces. Klonede gener kan velges på grunn av evnen til å kode et enzym i stand til hydrolysering av en ester, fortrinnsvis β-naftyl-acetat- og naproksenester. Alternativt kan de velges ved krysshybridisering med et allerede selektert gen som koder en esterase. Den siste antagelse er basert på den observasjon at relaterte mikroorganismer viser homologi i DNA-sekvensen med tilsvarende enzymer (Ihara et al., 1985, "J. Biochem.", 98, s. 95) og søkerens egen observasjon at plasmid pNAPT-7 (se eksempel 11) viser krysshybridisering med kromosomalt DNA avledet fra andre Bacillus-arter. Dette medfører innføring av multiple og/eller modifiserte genekopier som koder esterase inn i en mikroorganisme med den fordel at man øker aktiviteten til mikroorganismen, eller de stoffer som avledes derfra, i omdanningsprosessen av forbindelse II til forbindelse I. Mikroorganismen kan for eksempel være Bacillus subtilis.

Mikroorganismene kan fordelaktig immobiliseres, for eksempel med en polymergel. Dette kan skje med levende og/eller drepte celler, alternativt kan imidlertid esteraseenzymet renses til en viss grad hvis en høyere spesifikk aktivitet er nødvendig.

Derfor er uttrykket "mikroorganisme eller stoffer avledet derfra" ment å omfatte mikroorganismer, levende eller drepte, ekstrakter derav, eventuelt i konsentrert form eller renset.

Mere spesielt omfatter mikroorganismene for hydrolyse av etyl- og metylesteren av naproksen[etyl-2-(6-metoksy)-2-naftyl)propionat og metyl-2-(6-metoksy-2-naftyl)propionat, henholdsvis til S-naproksen[2-(6-metoksy-2-naftyl)propionsyre] og hydrolyse av etyl- og metylesteren av ibuprofen-[etyl-2-(4-isobutyl-1-fenyl)propionat og metyl-2-(4-isobutyl-

1-fenyl)propionat, henholdsvis til S-ibuprofen[2-(4-isobutyl-1-fenyl)propionsyre], kulturer av
Bacillus subtilis, Bacillus Licheniformis (en prøve er deponert ved ATCC under nr. 11945),
Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putia (en prøve er deponert ved IFO under nr. 12996),
Pseudomonas riboflavina (en prøve er deponert ved IFO under nr. 13584),
Pseudomonas ovalis (en prøve er deponert ved IAM under nr. 1049),
Pseudomonas aeruginosa (en prøve er deponert ved IFO under nr. 13130),
Mucor angulimacrosporus (en prøve er deponert ved IAM under nr. 6149),
Arthrobacter paraffineus (en prøve er deponert ved ATCC under nr. 21218),
stamme is III-25 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 666.86),
stamme LK 3-4 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 667.86),
stamme Sp 4 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 668.86),
stamme Thai III 18-1 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 669.86) og
stamme Thai VI 12 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 670.86).

Fordelaktig omfatter kulturer av artene Bacillus subtillus kulturer av
artene Bacillus species Thai 1-8 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 679.85),
artene Bacillus species In IV-8 CBS (en prøve er deponert ved CBS under nr. 680.85),
artene Bacillus species Nap 10-M (en prøve er deponert ved CBS under nr. 805.85),
artene Bacillus species Sp III-4 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 806.85),

Bacillus subtilis 1-85 (Yuki, S., 1967, "Jpn. J. Genet.", 42, s. 251),
Bacillus subtilis 1-85/p NAPT-7 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 673.86),
Bacillus subtilis 1A-40/pNAPT-8 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 674.86) og
Bacillus subtilis 1A-40/pNAPT-7 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 675.86).

Fordelaktig inkluderer kulturer av Pseudomonas fluorescens en kultur av
artene Pseudomonas species Kor I-6 (en prøve er deponert ved CBS under nr. 807.85)
Pseudomonas fluorescens species deponert ved IFO under nr. 3081.

I denne forbindelse betyr IFO Institute for Fermentation;
IAM betyr Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan.

I henhold til den foretrukne utførelsesform må en mikroorganisme som har evnen til å omdanne forbindelse II til forbindelse I med minst 80 vekt-% S-konfigurasjon, dyrkes ca. 0,5 til 10 dager. Herefter blir cellene suspendert i et flytende næringsmedium og forbindelse II underkastes påvirkning av cellene. Alternativt blir cellene avlivet, for eksempel ved suspendering i et lyserende medium og forbindelse II underkastes påvirkning av stoffer avledet fra cellene.

Efter den ovenfor nevnte dyrking i ca. 0,5 til 10 dager kan cellene isoleres fra dyrkingsmediet før suspendering i det flytende næringsmedium eller suspendering av cellene i et lyserende medium.

For å dyrke mikroorganismene som benyttes for selektiv hydrolyse av forbindelse II, kan det benyttes vanlige

dyrkingsmedier som inneholder assimilerbare karbonkilder som for eksempel glukose, laktat, sukrose, og så videre, en nitrogenkilde som for eksempel ammoniumsulfat, ammoniumnitrat, ammoniumklorid, og så videre, med et middel for en organisk næringskilde som for eksempel gjær- eller maltekstrakt, pepton, kjøttekstrakt, og så videre, og en uorganisk næringskilde som for eksempel fosfat, magnesium, kalium, sink, jern og andre metaller i spormengder.

Som et foretrukket dyrkingsmedium benyttes et Jap-medium som eventuelt er anriket med en eller flere bestanddeler. Et Jap-medium med følgende sammensetning kan benyttes: soyabønnemel (30 g/l), natriumnitrat (7,5 g/l), jern(II)sulfat·7_H20 (0,28 g/l), natriumcitrat (6 g/l) og fruktose (12,5 g/l), idet pH-verdien justeres til 7,2. Før bruk ble mediet sterilisert i 20 minutter ved 120°C.

Et annet foretrukket dyrkingsmedium er et TSB-medium 2X, eventuelt anriket med en eller flere bestanddeler. Et medium bestående av 60 g/l trypticase soyabuljong "Oxoid" kan benyttes. Før bruk ble mediet sterilisert i 20 minutter ved 120°C. Et annet foretrukket medium er 2xTY, eventuelt anriket med en eller flere bestanddeler. Et medium bestående av 30 g/l "Difco" trypton, 20 g/l "Difco" gjærekstrakt, 3 g/l NaCl, 1 g/l $(NH_4)_2HPO_4$ og 1 g/l $(NH_4)_2SO_4$ ved pH 6,8 kan benyttes. Før bruk ble mediet sterilisert i 30 minutter ved 110°C. Som et mer foretrukket kulturmedium blir et skummetmelk-medium, eventuelt anriket med en eller flere bestanddeler, benyttet. Et skummetmelk-medium med følgende sammensetning ble benyttet: 10% skummet melk fra skummetmelk-pulver som var sterilisert i 30 minutter ved 110°C før bruk.

Som anrikninger til skummetmelk-mediet kan for eksempel 0,5% laktat eller PSIII-salter eller kombinasjoner derav benyttes. PSIII-saltmedium med følgende sammensetning ble benyttet: kaliumdihydrogenfosfat (2,1 g/l), ammoniummonohydrogenfosfat (1,0 g/l), ammoniumsulfat (0,9 g/l), kaliumklorid (0,2 g/l),

natriumcitrat (0,29 g/l), kalsiumsulfat·$2H_2O$ (0,005 g/l), magnesiumsulfat·$7H_2O$ (0,2 g/l), ammonium(II)sulfat·$6H_2O$ (2,5 mg/l), sinksulfat·$7H_2O$ (0,5 mg/l), mangankloride·$4H_2O$ (0,3 mg/l), kobbersulfat·$5H_2O$ (0,15 mg/l), natriummolybdat·$2H_2O$ (0,055 mg/l) og kaliumjodid (0,1 mg/l), idet pH-verdien ble justert til 6,8. Før bruk ble PSIII-saltmediet sterilisert i 20 minutter ved 120°C.

En temperatur mellom 0 og 45°C og en pH-verdi mellom 3,5 og 9 opprettholdes under dyrkingen av mikroorganismene. Fortrinnsvis dyrkes mikroorganismene ved en temperatur mellom 20 og 37°C og en pH-verdi mellom 5 og 9.

De aerobe betingelser som er nødvendige under dyrkingen av mikroorganismene kan tilveiebringes i henhold til en hvilken som helst av de velkjente prosedyrer, forutsatt at tilførselen av oksygen er tilstrekkelig til å møte de metaboliske krav til mikroorganismene. Dette oppnås på mest hensiktsmessig måte ved å tilføre oksygen, hensiktsmessig i form av luft og eventuelt samtidig å ryste eller røre reaksjonsvæsken. Under omdanning av forbindelse II til forbindelse I kan mikroorganismene være i voksen tilstand ved bruk av et som ovenfor nevnt vanlig dyrkingsmedium eller kan preserveres i et hvilket som helst system (medium eller buffer) som forhindrer nedbrytning av enzymene.

Under omdanningen av forbindelse II til forbindelse I kan et vanlig dyrkingsmedium benyttes inneholdende en assimilerbar karbonkilde når dette er nødvendig (for eksempel glukose, laktat, sukrose, og så videre), en nitrogenkilde hvis dette er nødvendig (for eksempel ammoniumsulfat, ammoniumnitrat, ammoniumklorid, og så videre), med et middel for en organisk næringsmiddelkilde når dette er nødvendig (for eksempel gjær–, malt-, kjøttekstrakt eller pepton, og så videre), og en uorganisk næringskilde hvis dette er nødvendig, (for eksempel fosfat, magnesium, kalium, sink, jern og andre metaller i spormengder).

Fortrinnsvis blir det under omdanningen av forbindelse II til forbindelse I benyttet et Jap-medium som beskrevet ovenfor, eventuelt anriket med en eller flere bestanddeler. Aller helst benyttes et skummetmelk-medium som beskrevet ovenfor, eventuelt anriket med en eller flere bestanddeler.

Mikroorganismene kan holdes i ikke-voksende tilstand, for eksempel ved å utelukke kilden for assimilerbart karbon eller ved å utelukke nitrogenkilden. En temperatur mellom 0 og 45°C og en pH-verdi mellom 3,5 og 9,0 opprettholdes under dette trinn.

Fortrinnsvis holdes mikroorganismene ved en temperatur mellom og 37°C og en pH-verdi mellom 5 og 8. De aerobe betingelser som er nødvendige under dette trinn, kan tilveiebringes ved en hvilken som helst av de kjente prosedyrer forutsatt at tilførselen av oksygen er tilstrekkelig til å møte mikroorganismens metabolske krav. Dette oppnås vanligvis best ved å tilføre oksygen, hensiktsmessig i form av luft og eventuelt samtidig og ryste eller å røre reaksjonsblandingen. Forbindelsen I som fremstilles av mikroorganismene eller stoffer avledet derfra, kan som nevnt ovenfor gjenvinnes og renses i henhold til en hvilken som helst av de prosedyrer som er kjent for slike produkter.

Mikroorganismene kan holdes på agar-stykker, frosset i 50% glyserol eller lyofilisert. Hvis nødvendig, kan forkulturer av mikroorganismene fremstilles i henhold til en hvilken som helst av de kjente prosedyrer, for eksempel kan mikroorganismene inkuberes i buljong eller i BHI i 24 timer ved 30°C i en rotasjonsryster. Et buljongmedium med følgende sammensetning kan benyttes: 9 g/l "Oxoid" Lab Lemco L 29-kjøttekstrakt, 10 g/l Bactopepton og 5 g/l natriumklorid, pH justert til 7,6. Før bruk ble dette medium sterilisert i 20 minutter ved 120°C.

Et BHI (hjerne-hjerte-infusjons) medium inneholdende 0,037 g/l "Oxoid" BHI, derefter pH justert til 7,0, kan benyttes. Før bruk ble dette medium sterilisert i 20 minutter ved 120°C.

Enzymet som er ansvarlig for hydrolysen av S-naproksenmetylester av Bacillus Thai I-8 er karakterisert. Det er funnet at esteraseaktiviteten ikke henger sammen med lipaseaktiviteten som er til stede i mikroorganismen. Således synes den lave hydrolysegrad til den gale isomer av naproksen, hovedsakelig å skyldes den kontaminerende lipase-aktivitet til Bacillus-stammen. Den rensede naproksen-esterase av Thai I-8 har en signifikant høyere enantiomerselektivitet enn det totale cellelysat til Bacillus.

E. coli/pNAPT-7 og Bacillus/pNAPT-7, begge stammer med et plasmid inneholdende Thai I-8-esterase, produserer en signifikant mengde S-naproksenesterase. Overraskende er det protein som har esteraseaktiviteten som bekreftet ved SDS-PAGE, HPLC-SEC og isoelektrisk fokusering, langt på vei det protein med den høyeste konsentrasjon i cellelysatet i mikroorganismene.

Selv om det er kjent at genkloning kan forbedre eksprimeringsnivået til et enzym, er mengden forbedring når det gjelder esterase meget overraskende. Meget ofte måtte man ta i betraktning problemer som ukorrekt folding, proteinnedbrytning og intracellulære presipitering ved kloning i genet for et enzym (Harris, T.J.R., 1983, "Genetic Engineering", 4, Academic Press). Meget uventet syntes ingen av disse problemer å oppstå ved kloning av esterasegener.

I foreliggende beskrivelse er S-spesifisiteten definert som:

$$\frac{S\ (\text{dannet})}{R\ (\text{formet}) + S\ (\text{dannet})}$$

Oppfinnelsen skal beskrives nærmere under henvisning til eksemplene uten at disse skal begrense oppfinnelsens ramme.

EKSEMPEL 1

Transformering av RS-naproksen-etylester til S-naproksen ved bruk av Bacillus Thai I-8, Bacillus In IV-8, Bacillus Nap 10 M, Bacillus Sp III-4, Bacillus Licheniformis (ATCC 22945) og Pseudomonas Kor I-6

Bacillus Thai I-8, Bacillus In IV-8, Bacillus Nap10 M, Bacillus Sp III-4, Bacillus Licheniformis (ATCC 11945) og Pseudomonas Kor I-6 ble alle inkubert i 25 ml 10 %-ig skummet melk, holdt i 500 ml kolber og inkubert i 48 timer ved 30°C p en rotasjonsryster. Efter denne dyrkingsperiode ble 100 mg av etylesteren av naproksen oppløst i 500 mg soyaolje, holdt ved 110°C i 1 time for sterilisering og tilsatt til hver av kulturene. Avhengig av mikroorganismene ble det benyttet 2 til 5 kulturer. Disse ble inkubert i ytterligere 24 timer ved 30°C på rotasjonsrysteren. Derefter ble kulturene surgjort med orto-fosforsyre til en verdi på 2 til 3, det ble tilsatt en liten mengde ammoniumsulfat og 20 ml kloroform eller etylacetat pr. 25 ml medium ble tilsatt for ekstraheringen. Ekstraktene ble analysert ved TLC. For analyse med TLC ble det eluert silikagelplater (silikagel 60 med fluorescerende indikator F_{254}) med kloroform + 1% eddiksyre for å bevirke separering av etylesteren av naproksen og naproksen. Rf-verdiene som ble funnet var 0,7 etylester av naproksen og 0,2 naproksen. Den organiske fase ble derefter fordampet og naproksen renset fra den resulterende olje ved eluering med eter på en silikagelkolonne. De oppnådde resultater er angitt i tabell 1.

Optisk dreining ble målt i et Perkin-Elmer 141-polarimeter i 1 eller 10 cm celle med volum 0,5-5 ml, holdt ved romtemperatur. Dreiningen ble notert ved 589 nm (natrium-D-linjen).

Den optiske dreining ble målt ved å oppløse de dannede produkter, opptil 50 mg, i 5 ml metanol. Kommersiell S-naproksen (Secifarma) har en $[\alpha]_D^{rt}$-verdi på +60°.

TABELL 1

Mikrobiologisk hydrolyse av etyl-2-(6-metoksy-2-naftyl)-propionat til 2-(6-metoksy-2-naftyl)propionsyre, omdanning av substratet og optisk aktivitet for produktet.

Mikroorganismer	Total mengde tilsatt ester(mg)	Ester gjenvunnet efter inkubering (mg)	Dannet naproksen (mg)	$[\alpha]_D^{rt}$
Bacillus Thai I-8	400	i.b.*	23**	+57°
Bacillus In IV-8	500	210	75	+60°
Bacillus Licheniformis ATCC 11945	200	53	32	+52°
Bacillus Sp III-4	400	i.b.*	33**	+37°
Bacillus Nap 10M	200	110	30	+44°
Pseudomonas Kor I-6	200	93	25	+43°

*i.b. = ikke bestemt
**mengde tilbake efter isolering.

EKSEMPEL 2

Enantiomer fordeling av R- og S-naproksen annet ved mikrobiell hydrolyse

Alle prøver ble gjennomført med 25 ml av et medium i 100 ml baffel-kolber som beskrevet i eksempel 1. Alle medier ble inokulert fra kulturer, dyrket på forhånd i 24 timer i BHI-medium.

Analysen ble gjennomført efter 1 time og 24 timer ved bruk av ca. 20 mg av etylesteren av racemisk naproksen oppløst i soyaolje.

Ekstraktene ble analysert ved HPLC. Esteren og syren ble separert på en silisiumdioksydkolonne (CP-Sper-Si, Chrompack). Den mobile fase var isooktan:etylacetat:maursyre (875 ml:125 ml:3,5 ml).
Strømningshastigheten var 1,7 ml/min. og retensjonstidene ble funnet å være 3,8 minutter for etylesteren av naproksen og 9,0 minutter for naproksen.

Naproksen ble derivatisert for å bestemme den enantiomere renhet. Naproksenprøver som ble derivatisert inn i naftalenmetylamider ble separert på en chiral DNBPG-kolonne som ble eluert med isooktan:kloroform:metanol (900 ml:70 ml:30 ml) ved en strømningshastighet på 2 ml/min.

Retensjonstidene for det derivatiserte S-naproksen og R-naproksen var 28,1 henholdsvis 30,7 minutter.

Derivatiseringsprosedyre:
2 ml ekstrakt ble tørket under en N_2-strøm.
Den tørkede prøve ble omsatt med 200 µl benzen + 10 µl tionylklorid i 10 minutter ved 60°C.

Reaksjonsblandingen ble tørket under N_2.

200 µl 5 %-ig naftalenmetylamin oppløst i tørr diklormetan ble tilsatt og reaksjonen ble gjennomført i 1 time ved romtemperatur.

Reaksjonsblandingen ble tørket igjen under N_2 og så ekstrahert med 2 ml isooktan:kloroform (2:1, v/v og 2 ml HCl, 1N).
Den organiske fase ble analysert på HPLC.
Resultatene er vist i tabell 2.

EKSEMPEL 3

Transformering av metylesteren av R,S-naproksen til S-naproksen med forskjellige mikroorganismer.

Alle prøver ble gjennomført med 25 ml medium i 100 ml kolber som beskrevet i eksemplene 1 og 2. I stedet for etylesteren ble imidlertid metylesteren av racemisk naproksen nu tilsatt til kulturene. De benyttede medier ble inokulert fra kulturer dyrket på forhånd i 24 timer i BHI-medium.

Resultatene er gitt i tabell 3.

TABELL 3

Mikroorganisme	Dannet naproksen (mg/kultur)	%S	%R
Bacillus Thai I-8	6,9	96	4
Bacillus In IV-8	2,0	90	10
Bacillus Licheniformis (ATCC 11945)	8,6	98	2
Bacillus Nap 10M	3,2	99	1
Bacillus Sp III-4	5,8	82	18

TABELL 2

Enantiomerfordeling av R- og S-naproksen dannet ved mikrobiell hydrolyse

Mikroorganisme	Inkuberings-	Dannet	Dannet	%
%			tid	
R-naproksen S-naproksen	(timer) R-naproksen (mg/kultur)	(mg/kultur)		S-naproksen
Bacillus Thai I-8	1	1,26	0,014	99	1
	24	7,14	0,59	92	8
Bacillus IN IV-8	1	0,48	0,008	98	2
	24	4.18	0,40	91	9
Bacillus Licheniformis (ATCC 11945)	1	0,28	0,014	95	5
	24	4,76	0,086	98	2
Pseudomonas Kor I-6	24	2,8	0,07	98	2
Bacillus Nap 10M	24	1,3	0,01	99	1
Bacillus Sp III-4	24	2,5	0,3	89	11

174350

EKSEMPEL 4

Transformering av etylesteren av S-naproksen til S-naproksen ved bruk av Bacillus Thai I-8, Bacillus In IC-8 og Bacillus Licheniformis (ATCC 11945)

Alle prøver ble gjennomført med 25 ml medium i 100 ml kolber som beskrevet i eksempel 1. Alle medier ble inokulert fra kulturer dyrket på forhånd i 24 timer i et BHI-medium.

Mengdene av etylesteren av S-naproksen som hydrolyseres er angitt i tabell 4.

TABELL 4

Mengder av etylester av S-naproksen, hydrolysert i løpet av 24 timer i et anriket skummetmelk-medium (PSIII og laktat ble tilsatt)

Mikroorganisme	Gjenværende ester efter 24 timer (mg)*	Dannet naproksen
Bacillus Thai I-8	7,9	18,6
Bacillus In IV-8	15,0	10,5
Bacillus Licheniformis ATCC 11945	11,6	10,2

* ca. 30 mg ester ble tilsatt til hver kultur på 25 ml.

EKSEMPEL 5

Transformering av etylesteren av racemisk naproksen til S-naproksen ved hjelp av Bacillus-arter Thai I-8, dyrket i en fermenter

Bacillus-arter Thai I-8 ble dyrket på forhånd i 24 timer i et BHI-medium. Derefter ble 50 ml kultur inokulert i en 10 l Eschweiler-fermenter inneholdende 10% skummetmelk-medium eller 10% skummetmelk-medium anriket med PSIII-salter og 5 g/l laktat.

Man benyttet de følgende fermenteringsbetingelser:

Volum: 5 l medium

Temperatur: 30°C

Omrøringshastighet:	500 omdr./min.
Luftstrøm:	50 l/time
Antiskummingsmiddel:	Kontrollert ved automatisk tilsetning av "Pluronic L 81"
pH:	Ikke regulert (holdt fri mellom pH-verdier på 6 og 9).

Mikroorganismene ble dyrket i 70 timer og i løpet av denne tid ble diverse prøver tatt og analysert med henblikk på aktivitet i forbindelse med etylesteren av naproksen. Analysen ble gjennomført ved inkubering av en 25 ml prøve i 1 time ved 30°C i en kolbe hvor til det var satt 20 mg etylester av racemisk naproksen, oppløst i soyaolje. Efter denne inkuberingsperiode ble prøvene ekstrahert, derivatisert og analysert ved HPLC.

Efter 24 timer forble tørrvekten til mikroorganismene og den volumetriske aktivitet, konstant. pH-verdien i kulturen økte i løpet av perioden fra 6,0 til 7,8 når skummet melk ble benyttet og fra 6,0 til 8,4 når anriket skummet melk ble benyttet.

Resultatene er oppsummert i tabell 5.

TABELL 5

Resultater av fermentering av Bacillus-art Thai I-8 ved bruk av skummet melk og anriket skummet melk.

	Skummetmelk-kultur	Skummetmelk-kultur anriket med PSIII og laktat
Tørrvekt	1,2 - 1,3 g/l	2,5 - 2,6 g/l
Volumetrisk aktivitet	30 mg naproksen dannet/l/time	53 mg naproksen dannet/l/time
Enantiomer-fordeling	95% S, 4% R	91% S, 9% R

EKSEMPEL 6

Transformering av etylesteren av racemiske naproksen til S-naproksen med Bacillus-arter In IV-8, dyrket i en fermenter

Man benyttet samme metode som i eksempel 5 med Bacillus-art In IV-8. Prøvene ble tatt i løpet av 70 timers inkuberingsperioden og analysert som beskrevet ovenfor. I løpet av denne periode forble tørrvekten så vel som den volumetriske aktivitet i det vesentlige konstant. pH-verdien endret seg i løpet av perioden fra 6,4 til 7,9 i skummetmelk-kulturen og fra 6,2 til 8,4 i kulturen med anriket skummet melk.

Resultatene er oppsummert i tabell 6.

TABELL 6

Resultater av fermentering av Bacillus-art In IV-8 ved bruk av skummet melk og anriket skummet melk.

	Skummetmelk-kultur	Skummetmelk-kultur anriket med PSI, PSIII og laktat
Tørrvekt	0,7 g/l	2,5 g/l
Volumetrisk aktivitet	10 mg naproksen dannet/l/time	25 mg naproksen dannet/l/time
Enantiomer-fordeling	94% S, 6% R	Ikke bestemt

EKSEMPEL 7

Transformering av etylesteren av R,S-ibuprofen til S-ibuprofen med forskjellige mikroorganismer

Alle prøver ble gjennomført med 25-100 ml medium i 100-500 ml kolber som beskrevet i eksemplene 1 og 2. Mediene ble inokulert fra kulturer dyrket på forhånd i 24 timer i et rikt komplekst medium, for eksempel BHI, og dyrket i 48 timer. Derefter, og avhengig av kulturvolumet, ble 20 eller 80 µl

etylester av racemiske ibuprofen tilsatt til kulturene og inkubert i 24 timer.

Kulturene ble ekstrahert med CH_2Cl_2 efter surgjøring til pH 2,5 med H_3PO_4 og tilsetningen av en liten mengde ammoniumsulfat. Ibuprofen som var til stede i ekstraktene ble derivatisert til et naftalen-metylamidderivat for å bestemme enantiomer-renheten.

Til 3 ml ekstrakt ble det tilsatt 200 µl av en oppløsning av 2-brom-1-metylpyridinjodid, oppløst i 50 mg/ml dimetylformamid, og 200 µl av en oppløsning av 1-naftalen-metylamin oppløst i 100 mg/ml CH_2Cl_2 og det hele ble tillatt omsetning i 5 minutter ved 22°C. Reaksjonsblandingen ble tørket under N_2 ved 60°C. Den gjenværende rest ble oppløst i 3 ml isooktan:CH_2Cl_2 (2:1 v/v) og ekstrahert efter tilsetning av 2 ml 1N H_2SO_4.

Det organiske sjikt ble analysert ved HPLC ved bruk av en chiral DNBPG-kolonne som eluert med isooktan:isopropylalkohol:metanol (97:2:1 v/v) eller i de tilfeller der urenheter forstyrret analysen, med isooktan:isopropylalkohol:metanol (98:1:1 v/v).

Resultatene er gitt i tabell 7.

TABELL 7

Mikroorganisme	Dannet ibuprofen mg/kultur	%S	%R	Kulturvolum (ml)
Arthrobacter paraffineus ATCC 21218	9,8	85	15	25
Bacillus Licheniformis* ATCC 11945	0,8	99	1	25
Bacillus subtilis In IV-8* CBS 680.85	0,4	89	11	25

Mikroorganisme	Dannet ibuprofen mg/kultur	%S	%R	Kultur-volum (ml)
Bacillus subtilis Nap 10-M CBS 805.85	1,4	92	8	25
Bacillus subtilis Sp III-4 CBS 806.86	4,2	88	12	25
Bacillus subtilis Thai I-8 CBS 679.85	4,3	96	4	25
Mucor angulimacrosporus IAM 6149	4,3	96	4	25
Pseudomonas aeruginosa IFO 13130	5,5	81	9	25
Pseudomonas fluorescens IFO 3081	3,4	≥95	≤5	25
Pseudomonas fluorescens Kor I-6/CBS 807.85	3,9	94	6	100
Pseudomonas ovalis IAM 1049	1,6	98	2	100
Pseudomonas putida IFO 12996	1,6	≥95	≤5	25
Pseudomonas riboflavina IFO 13584	0,7	98	2	100
Streptomyces flavovirens IFO 3412	0,6	≥95	≤5	25
Stamme is III-25 CBS 666.86	1,0	82	18	100
Stamme LK 3-4 CBS 667.86	0,4	≥95	≤5	25
Stamme SP 4 CBS 668.86	0,9	95	5	25
Stamme Thai III 18-1 CBS 669.86	7,0	87	13	25
Stamme Thai VI 12 CBS 670.86	8,6	97	3	25

De angitte verdier er middelverdiene for forsøk gjennomført i duplikat. Der mikroorganismene har en *-henvisning ble disse verdier oppnådd fra et enkelt forsøk. I dette tilfellet ble kun 10 µl ibuprofen oppløst i 50 µl tetradekan tilsatt til kulturene.

EKSEMPEL 8

Transformering av metylesteren av S-ibuprofen til S-ibuprofen med forskjellige mikroorganismer

Alle forsøk ble gjennomført som beskrevet i eksempel 7. I stedet for etylesteren av racemisk ibuprofen, tilsatte man metylesteren av racemisk ibuprofen til kulturene.

Resultatene er gitt i tabell 8.

TABELL 8

Mikroorganisme	Dannet ibuprofen mg/kultur	%S	%R	Kultur-volum (ml)
Arthrobacter paraffineus ATCC 21218	9,1	87	15	25
Bacillus Licheniformis* ATCC 11945	1,5	99	1	25
Bacillus subtilis In IV-8* CBS 680.85	0,5	90	10	25
Bacillus subtilis Nap 10-M CBS 805.85	2,2	93	7	25
Bacillus subtilis Sp III-4 CBS 806.86	5,5	89	11	25
Bacillus subtilis Thai I-8 CBS 679.85	5,7	97	3	25
Mucor angulimacrosporus IAM 6149	6,1	93	7	25
Pseudomonas fluorescens IFO 3081	3,1	93	7	25
Pseudomonas putida IFO 12996	0,7	≥95	≤5	25

Mikroorganisme	Dannet ibuprofen mg/kultur	%S	%R	Kultur-volum (ml)
Pseudomonas riboflavina IFO 13584	1,3	88	12	25
Streptomyces flavovirens IFO 3412	0,2	≥95	≤5	25
Stamme LK 3-4 CBS 667.86	0,2	≥95	≤5	25
Stamme Thai III 18-1 CBS 669.86	3,1	88	12	25
Stamme Thai VI 12 CBS 670.86	4,0	≥93	≤7	25

De angitte verdier er middelverdiene for forsøk gjennomført i duplikat. Der mikroorganismene har en *-henvisning ble disse verdier oppnådd fra et enkelt forsøk. I dette tilfellet ble kun 10 µl ibuprofen oppløst i 50 µl tetradekan tilsatt til kulturene.

EKSEMPEL 9

Karakterisering av naproksen-metylesterase, til stede i Bacillus subtilis Thai I-8 (CBS 679.85)

Bacillus Thai I-8 ble dyrket i en Eschweiler-fermenter inneholdende 10% skummet melk, se eksempel 5.

Efter 28 timers dyrkning ble cellene samlet ved sentrifugering. Cellene ble oppløst i 0,1M Tris HCl pH 8,0 og behandlet med lysozym (0,5 mg/ml lysozym, 4 mg/ml EDTA) i 18 timer ved romtemperatur fulgt av DN'ase-behandling (0,01 mg/ml DN'ase, 3,5 mg/ml $MgCl_2$) i en time ved samme temperatur.

Efter sentrifugering ble proteindelen av supernatanten presipitert ved 70 %-ig ammoniumsulfat-metning. Efter sentrifugering ble pelleten oppløst i 0,01M MOPS (3-(N-

morfolino)propansulfonsyre) buffer pH 7,5 og dialysert i 18 timer mot den samme buffer inneholdende 0,02% NaN_3 som preserveringsmiddel.

Sluttoppløsningen ble analysert på en preparativ HPLC-SEC (størrelsesutelukkelseskromatografi)-kolonne (TSK 2000 SW, 600 x 21,5 mm) som ble eluert med 0,1M natriumacetat ved pH 5,5 og en strømningshastighet på 6 ml/min. Fra og med 10 minutter på kolonnen ble fraksjoner på 1 ml samlet og prøvet med henblikk på nærværet av lipase og S-naproksen-metyl-esterase-aktivitet.

Lipase-aktiviteten ble analysert i 0,1M MOPS pH 7,5 med 1 mg/ml p-nitrofenyllaurat som substrat. Lipase-aktiviteten som tilsvarer dannelsen av p-nitrofenol kan måles ved 405 nm.

S-naproksen-metylesterase ble analysert i 0,1M MOPS, pH 8,0 med 20 mg S-naproksen-metylester/ml. Efter 18 timers inkubering ble mengden S-naproksen som var dannet er holdt ved HPLC som beskrevet i eksempel 2.

Figur 1 viser HPLC-SEC-profilen for Bacillus Thai I-8-cellelysat. S-naproksen-metylesterasen, (fraksjon 37), er klart separert fra lipase-aktiviteten i fraksjon 31, i denne mikroorganisme.

I tabell 9 ble den enantiomere selektivitet for cellelysatet og fraksjon 31 og 38 ble HPLC-SEC sammenlignet. Esterase-aktiviteten på R- og S-naproksen-metylester ble prøvet på samme måte som beskrevet ovenfor.

Den tilsynelatende molekylvekt for proteinfraksjonen inneholdende S-naproksen-esteraseaktiviteten ble bedømt ved bruk av en proteinblanding av kjent molekylvekt som standard til 27000.

pH-avhengigheten av hydrolysen av S-naproksen-metylester under analysebetingelsene er vist i figur 2. De benyttede buffere var 0,1M fosforsyre (pH-området 5,5-7,5) 0,1M Tris-HCl (pH-område 7,5-9,0) og 0,1M glycin (pH-område 9,0-10,0).

Innflytelsen av temperaturen på esterasereaksjonen er vist i figur 3.

Ved en temperatur over 45°C finnes det så å si ikke enzymatisk hydrolyse. Hydrolysen ved 37°C er grovt regnet to ganger høyere enn ved 25°C.

TABELL 9

	Enzym-aktivitet	S-naproksen dannet fra S-ester (mM)	R-naproksen dannet fra R-ester (mM)	S-spesifisitet (%)
Thai-cellelysat		2,891	0,087	97,1
Fraksjon 31	"lipase"	0,090	0,119	43,1
Fraksjon 38	"esterase"	5,264	0,064	98,8

EKSEMPEL 10

Molekylkloning av genet som er ansvarlig for den stereoselektive omdanning av R,S-naproksenester

Et plasmid, pNAPT-2, inneholdende et kromosomalt DNA-fragment av Bacillus subtilis Thai I-8 CBS 679.85) ble preparert som fremstilt ovenfor.

Generelle kloningsteknikker ble benyttet som beskrevet i håndboken til T. Maniatis et al., 1982, "Molecular Cloning", Could Spring Harbour Laboratory. Alle DNA-modifiserende enzymer ble oppnådd fra kommersielle leverandører og de ble benyttet i henhold til produsentenes instruksjoner. Mate-

rialer og apparaturer for DNA-separering og rensing ble benyttet i henhold til leverandørinstruksjoner.

Den positive seleksjonsvektor pUN121 (Nilsson et al., 1983, "Nucleic Acids Res.", 11, s. 8019) ble benyttet. Denne vektor er et ampicillin-resistensgen, et tetracyklin-resistensgen og et C_1-repressorgen. Transkripsjon av tetracyklingenet forhindres ved genproduktet av C_1-repressorgenet. Innskyting av fremmed DNA til Bcl1-setet til C_1-repressorgenet resulterte i en aktivering av tetracyklingenet. Dette tillater en positiv selektering av rekombinanter på ampicillin/tetracyklin-agarplater.

Partielt Sau3A-fragmentert Bacillus subtilis Thai 1-8 DNA ble blandet med Bcl1-fragmentert pUN121 DNA. Efter resirkulering ved bruk av polynukleotidligase, ble DNA-blandingen innført i E. coli DH1(ATCC 33849) ved bruk av den $CaCl_2$-transformeringsprosedyre som beskrevet ovenfor (T. Maniatis et al., 1982).

1000 E. coli-kolonier som var resistente mot ampicillin og tetracyklin ble oppnådd. Alle transformanter ble lagret og replika-plattert i henhold ti J.P- Gergen et al., ("Nucleic Acids Res.", 7, s. 2115, 1979). Replikerte kolonier ble bedømt ved bruk av et mykt agaroverlegg basert på en tidligere beskrevet prosedyre for å påvise esteraseaktivitet (T.B. Higert og J. Spizizen, 1973, "J. Bacteriol.", 114, s. 1184). En blanding av i det vesentlige 0,5% lavtsmeltende agarose, 0,5M kaliumfosfat (pH 7,5), 0,5 mg/l β-naftylacetat og 0,5 mg/ml hurtigblått separeres over transformantene. I løpet av få minutter ble kolonier med esterase- eller lipaseaktivitet purpurfarvet. Slike kolonier ble dyrket over natt i 2 x YT (16 g/l Bactotryptone, 10 g/l gjærekstrakt, 5 g/l NaCl) medium og derefter analysert med henblikk på evnen til å omdanne S-naproksenester til S-naproksen (metoden ifølge eksempel 1). En E. coli-transformant var i stand til å omdanne S-naproksenesteren. Plasmidet som ble isolert fra

denne transformant og som ble kalt pNAPT-2 er angitt i figur 4. Størrelsen er 9,5 kb.

Aktiviteten til E. coli/pNAPT-2 og E. coli/pNAPT-7 (analysert i henhold til eksempel 12), dyrket over natten i 2 x YT-medium som vist i tabell 10. E. coli-celler med kun plasmidet pUN121 var ikke i stand til å hydrolysere S- eller R-naproksenester. Dette viser at all informasjon som var nødvendig for S-naproksen-hydrolyse ligger i 5 kb Bacillus subtilis Thai I-8 DNA-innskuddet.

En prøve på E. coli DH1 med plasmidet pNAPT-2 er deponert ved CBS under nr. 671.86).

TABELL 10

	Aktivitet (enh./l)*	S-spesifisitet (%)
E. coli/pUN121	0	-
E. coli/pNAPT-2	45	>95
E. coli/pNAPT-7	761	99,4

* enh. = enhet, se eksempel 12.

EKSEMPEL 11

Forbedring av esterase-aktiviteten ved innføring av multippel-genkopier i Bacillus subtilis

Det esterase-kodende plasmid pNAPT-2 har et 5 kb Bacillus subtilis Thai I-((CBS 679.85), DNA-innskudd. Fordi dette er mer enn den minimumsstørrelse som er forventet for et gen som koder et protein på ca. 30 kb, er det sannsynlig at innskuddet kan forkortes uten å miste esterase-aktiviteten. For å prøve denne mulighet ble HindIII-restriksjonsenzymfragmenter av pNAPT-2 ligert inn i pPNeo/ori. Dette ble gjennomført som beskrevet nedenfor. pPNeo/ori ble konstruert ved å

ligere 2,7 kb ExoR1-Sma1-restriksjonsfragmentet av pUC19, (C. Yanisch-Perron et al., "Gene" 33, s. 103, 1985) til 2,5 kb EcoR1-SnB1-restriksjonsfragment av pUB110 (T.C. Gryczan et al., "J. Bacteriol.", 134, s. 318, 1978). Det resulterende shuttleplasmid, pPNeo/ori (5,2 kb) har kapasiteten til å replikere både i E. coli og i Bacillus-arter på grunn av nærværet av pUC19-opprinnelsen og pUB110-opprinnelsen. I tillegg bærer pPNeo/ori et gen som koder ampicillin-motstandsevne og et gen som koder neomycin-motstandsevne (C. Yanisch-Perron et al., 1985, M. Matsumura et al., "J. Bacteriol.", 160, s. 423, 1984).

For subkloning ble HindIII-nedbrutt pNAPT-2 blandet med HindIII-nedbrutt pPNeo/ori og ligert. Blandingen ble trans-formert til E. coli JM101 hsds som beskrevet (Maniatis et al., 1982). E. coli JM101 hsds ble oppnådd fra Phabagen-samlingen (aksessnr. PC 2493 fra Utrecht i Holland). Kolonier i stand til å hydrolyse β-naftylacetat ble selektert som beskrevet i eksempel 10. Fra to positive kolonier ble plasmid-DNA isolert og karakterisert i detalj ved bestemmelse av diverse restriksjonsenzym-erkjennelsesposisjoner. Det fysikalske kart for disse plasmider, pNAPT-7 og pNAPT-8, er gitt i figur 5 og 6. Aktiviteten til E. coli/pNAPT-7 og E. coli/pNAPT-8 overfor S-naproksen-metylester ble bestemt (tabell 11).

Man kan se at begge plasmider bærer 2,2 kb HindIII-HindIII-fragmenter av pNAPT-2 som innskudd, selv om deres orientering er motsatt. Det går også frem at genet for esterase må være lokalisert innen 2,0 kb-delen av Thai I-8 DNA.

Efter ekstrahering fra E. coli JM101 hsds ble plasmidene pNAPT-7 og pNAPT-8 transformert til protoplaster av Bacillus subtilis 1-85 og Bacillus subtilis 1 A-40 (S. Chang og S.N. Cohen, "Mol. Gene Genet." 168, s. 111, 1979). Bacillus subtilis 1-85 (Yuki, S., 1967, "Jpn. J. Genet.", 42, s. 251)

og Bacillus subtilis 1A40 (Bacillus Stock Center B.G.S.C. 1A40) er beskrevet.

Neomycin-resistente kolonier ble prøvet på evnen til å hydrolysere S-naproksen-metylester efter fermentering i 2 x YT-buljong i henhold til den metode som er beskrevet (se eksempel 12). I tabell 11 er aktivitetene vist. Man kan se at forbedringen som oppnås ved innføring av multippelgenkopier er ca. 300 ganger. Således er evnen til mikroorganismene og derfra avledede stoffer, til bruk i prosesser for å hydrolysere S-naproksenester, sterkt forbedret.

Selv om det er kjent at genkloning kan forbedre eksprimeringsnivået for et enzym, er økningsgraden i tilfellet esterase meget overraskende. Meget ofte oppstår problemer som ukorrekt folding, protein-nedbrytning og intracellulær precipitering resultatet når man kloner genet for et enzym (Harris, T.J.R., 1983 "Genetic Engineering" 4, Academic Press). Overraskende nok syntes ingen av disse problemer å opptre ved kloning av esterasegener.

TABELL 11

	Aktivitet (enh./l)
E. coli JM101 hsds/pNAPT-7 (CBS ...	1064
E. coli JM101 hsds/pNAPT-8 (CBS 672.86)	1160
Bacillus subtilis 1-85/pNAPT-7 (CBS 673.86)	1011
Bacillus subtilis 1A40/pNAPT-7 (CBS675.86)	965
Bacillus subtilis 1A40/pNAPT-8 (CBS 674.86)	1228
E. coli JM101 hsds/pUN 121	0,0
Bacillus subtilis 1-85	8,0
Bacillus subtilis 1A40 (BGSC 1A40)	0,0
Bacillus subtilis Thai I-8 (CBS 679.85)	3,5

EKSEMPEL 12

Karakterisering av naproksen-metylesterasen av E. coli JM 101 hsds/pNAPT-7

1 liter fermenteringsbuljong av E. coli JM 101 hsds/pNAPT-7 fra eksempel 11 ble benyttet. Buljongen ble sentrifugert. Pelleten ble suspendert i 0,1 M Tris-HCl-buffer pH 8,0 og inkubert med 1 mg/ml lysozym, 4 mg/ml EDTA i nærvær av 1% v/v oktanol i 60 minutter ved 30°C. DNA ble hydrolysert ved 0,02 mg/ml DN'ase i nærvær av 15 mM Mg^{2+} (30 minutter ved 22°C).

Efter sentrifugering ble proteindelen av supernatanten precipitert ved 60% ammoniumsulfat-metning. Efter sentrifugeringen ble pelleten oppløst i 10 mM MOPS pH 7,5 og konsentrert 10 ganger ved ultrafiltrering (Amicon YM 10). Den spesifikke aktivitet til E. coli pNAPT-7-retentatet på S-naproksen-metylester (analysert i 0,1 M MOPS pH 7,5) ved 25°C i nærvær av 20 mg S-naproksen-metylester pr. ml, 2% "Tween", 1 mg/ml BSA (Bovin serum albumin) ble funnet å være 1,6 enheter pr. mg protein. I hele foreliggende beskrivelse er 1 enhet (enh.) definert som den mengde enzym som hydrolyserer 1×10^{-6} mol S-naproksen-metylester pr. minutt under de angitte betingelser. Tween tilsettes for å forbedre oppløseligheten av den sterkt hydrofobe ester og BSA for å unngå inaktivering av enzymet ved en spesifikk adsorpsjon. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt i henhold til Bradford med BSA som standard.

E. coli pNAPT-7-retentatet ble efter ultrafiltrering analysert på HPLC-SEC-systemet som beskrevet i eksempel 9.

Fra 15 minutter av på kolonnen ble fraksjonene 2 ml samlet og prøvet med henblikk på S-naproksenesterase-aktivitet, se eksempel 9.

Figur 10 viser OD-280 nm-absorbans og esterase-aktiviteten til HPLC-fraksjonene. S-naproksenesterase-aktiviteten (fraksjon 26) faller sammen med en topp i absorbansprofil-

eluatet. Retensjonstiden for Bacillus subtilis Thai I-8-esterase, analysert på nøyaktig samme måte, var den samme (resultatene er ikke vist).

Figur 8 viser en 12,6% SDS-PAGE i henhold til Laemmli av E. coli pNAPT-7 retentatet og av fraksjon 26 av HPLC-SEC.

Spor 4 inneholder E. coli JM 101 hsds/pUN 121. PAGE (polyakrylamidgelelektroforese) viser klart at det mest utpregede proteinbånd i E. coli pNAPT-7-retentatet er det eneste proteinbånd som er detekterbart i fraksjon 26 efter HPLC-SEC og er fraværende i E. coli.

Figur 9 viser et isoelektrofokuserende gel (LKB Ampholine PAG-plate, pH 3,5-9,5) av E. coli pNAPT-7-retentatet. I A ble proteinet flekket med Serva Blå R. I B ble esterase-aktiviteten for de samme prøver synliggjort ved hjelp av β-naftylacetat/FB (Fast Blue RR salt)-metoden som beskrevet i eksempel 10. Det vises at det mest utpregede proteinbånd i A synes å være ansvarlig for den høyeste esteraseaktivitet.

EKSEMPEL 13

Transformering av etylesteren av ibuprofen til ibuprofen ved hjelp av E. coli JM 101 hsds/pNAPT-7

E. coli-pNAPT-7-cellelysatet ble efter ammoniumsulfatprecipitering og ultrafiltrering prøvet på hydrolyse av etylesteren av R- og S-ibuprofen.

Enzymaktiviteten ble analysert ved 25°c i 0,1 MOPS-buffer, pH 7,5 med 0,3 mg R- eller S-ibuprofen-etylester/ml, 2% "Tween" og 1 mg/ml BSA. Efter 2 timers inkubering ble reaksjonen stanset ved tilsetning av acetonitril.

Reaksjonsblandingen ble analysert på en HPLC-reversfasekolonne (Chrompack Plygosil 60D-10CN, 250 x 4,6 mm), eluert med 34% acetonitril, 0,05 M fosforsyre, pH 3,0 ved en strømningshastighet på 1,5 ml/min. Retensjonstidene for R- og

S-ibuprofen og etylesteren av R- og S-ibuprofen var 5,98 minutter henholdsvis 11,08 minutter. Resultatene er oppsummert i tabell 12.

Hydrolysen av etylesteren av S-ibuprofen er 60% av den hydrolyserende aktivitet av metylesteren av S-naproksen, prøvet under de samme betingelser.

TABELL 12

Substrat	Estergruppe	Aktivitet (enh./l)	S-spesifisitet (%)
S-ibuprofen	etyl	39600	95,3
R-ibuprofen	etyl	1865	
S-naproksen	metyl	65000	

EKSEMPEL 14

Karakterisering av S-naproksenesterasen av Bacillus 1-85/pNAPT-7

Bacillus 1-85/pNAPT-7 ble dyrket i en 5 liters Eschweiler-fermenter i 2 x TY-medium.

Cellepastaen ble isolert ved sentrifugering. Pelleten ble oppløst i 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 og lysert i henhold til den metode som er beskrevet i eksempel 9.

Efter sentrifugering ble supernatanten bragt til 60% ammoniumsulfat-metning og sentrifugert igjen. Pelleten ble oppløst i 0,02 M MOPS, pH 7,5, og ultrafiltrert ved bruk av en analytisk HPLC-SEC-kolonne (TSK 2000 SW, 2 ganger 300 x 7,5 mm), eluert med 0,01 M MES (2-(N-morfolino)etansulfonsyre), pH 5,6 og 0,1 M NaCl ved en strømningshastighet på 1 ml/min. Fra og med 10 minutter ble det samlet 1 ml fraksjoner av kolonne-eluatet og disse ble prøvet på S-

naproksen-metylesterase-aktivitet ved bruk av den metode som er beskrevet i eksempel 12.

Figur 7 viser OD-280 nm-profilen og esterase-aktiviteten av fraksjonene. Retensjonstiden for S-naproksenesterasen tilsvarer en tilsynelatende molekylvekt på 27.000. Den spesifikke aktivitet for de forskjellige proteinprøver er oppsummert i tabell 13. Esterase-aktiviteten ble analysert som beskrevet i eksempel 12.

Den enantiomere selektivitet for Bacillus pNAPT-7-retentatet er vist i tabell 14. Aktiviteten er analysert som beskrevet i eksempel 12.

I figur 8 er 12,6% SDS-PAGE i henhold til Laemmli vist for Bacillus pNAPT-7 og fraksjonene 5 og 7 fra HPLC-SEC som representerer henholdsvis lipase- og S-naproksenesterase-aktiviteten. Hovedproteinbåndet i Bacillus-retentatet er det eneste protein som er til stede i fraksjon 7 og er fraværende i fraksjon 5 (lipaseaktivitet). Proteinbåndet i spor 8 tilsvarer en tilsynelatende molekylvekt på 31.000.

I figur 9 vises en isoelektrisk fokuserende gel av Bacillus pNAPT-7 og fraksjon 7 (se for teknisk beskrivelse eksempel 12). I Bacillus pNAPT-7-retentatet har lipaseaktiviteten et isoelektrisk punkt, IEP, på 4,5 og er den dominerende aktivitet til naftylacetatsubstratet. I fraksjon 7 av HPLC-SEC har proteinbåndet på samme måte en IEP på 5,4 som faller sammen med den naftylacetathydrolyserende aktivitet som vist i del B. Det skal bemerkes at β-naftyl-hurtigblå-analysen reagerer meget mer følsomt med en lipase enn med en esterase.

OD 280 nm-toppen, fraksjon 7, ved HPLC-SEC, synes å inneholde naproksenesterasen og består av et hovedproteinbånd på SDS-PAGE. Isoelektrofokuseringsgelen bekrefter at hovedprotein-båndet i fraksjon 7 har esteraseaktiviteten. Dette betyr at kloningen av esteraseaktiviteten av Bacillus subtilis Thai I-

8 både i E. coli og Bacillus resulterer en drastisk økning i esteraseproduksjonen. Således er naproksenesterasen i E. coli pNAPT-7 og Bacillus pNAPT-7 blitt det protein som har den høyeste konsentrasjon i cellelysatet av begge mikro-organismer.

TABELL 13

Prøve	u/ml	Protein-konsentrasjon (mg/ml)	u/mg protein
Bacillus 1-85/pNAPT-7*	196	120	1,2
Fraksjon 6 HPLC-SEC	6,7	1,1	6,1
Fraksjon 7 HPLC-SEC	6	0,95	6,3
Bacillus Thai I-8*	0,221	107	0,002

* Cellelysat efter lysering, ammoniumsulfatpresipitering og ultrafiltrering.

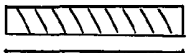
TABELL 14

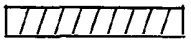
	Tilsatt metylester	Aktivitet (enh./l)	S-spesifisitet (%)
Bacillus 1-85 7pNAPT-7	S-naproksen	105.000	99,4
	R-naproksen	577	

Forklaring til figurene

Figur 1 HPLC-SEC-profil av Bacillus Thai I-8-cellelysat

————: OD 280 nm

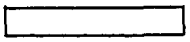
: lipaseaktivitet

: naproksen-metylesterase-aktivitet

Figur 2 pH-verdiens avhengighet av hydrolysen av S-naproksen-metylester under de analysebetingelser som er gitt i eksempel 9.

Figur 3 Innflytelse av temperaturen på esterasereaksjonen □ = 25°C, + = 30°C, ◇ = 37°C, △ = 45°C og x = 60°C

Figur 4 Restriksjonskartet for pNAPT-2
Et antall restriksjonsenzym-erkjennelsesseter er bestemt i plasmid pNAPT-2 som har en størrelse på 9,4 kb.


: pUN 121 DNA

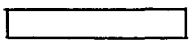

: Thai I-8 DNA-innskudd

Posisjonen ved hvilken partielt Sau3a-nedbrutt Thai I-8 DNA ble ligert til pUN 121 er antydet ved Bcl1/Sau3a.

Figurene 5 og 6. Restriksjonskart for pNAPT-7 og pNAPT-8.
2,2 kb HindIII-fragmentet av pNAPT-2 ble klonet inn i pPNeo/ori. De resulterende plasmider, pNAPT-7 og pNAPT-8, er analysert i detalj med diverse restriksjonsenzymer. Begge plasmider hadde en størrelse på 7,3 kb. Man kan se at pNAPT-8 bærer 2,2 HindIII-fragmentet i en orientering motsatt den til pNAPT-7.

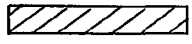

: pUC 19 DNA


: pUB 110 DNA


: pUN 121 DNA


: Thai I-8 DNA

Figur 7 OD-280 nm-adsorbans og esterase-aktiviteten til HPLC-SEC-fraksjonene


: S-naproksen-metylesterase-aktivitet

: OD-280 nm

Figur 8 et 12,6% SDS-PAGE ifølge Laemmli av E. coli pNAPT-7 retentat og av fraksjon 26 av HPLC-SEC.

Spor 1, 5 og 9: molekylvektsmarkører
Spor 2: E. coli pNAPT-7 retentat
Spor 3: E. coli pNAPT-7 retentat efter HPLC-gelfiltrering, aktiv fraksjon 26
Spor 4: E. coli/pUN-121 vertsstamme
Spor 6: Bacillus subtilis 1-85 med pNAPT-7
Spor 7 og 8: Bacillus subtilis 1-85 med pNAPT-7 efter HPLC-gelfiltrering, fraksjonene 5 og 7
Spor 10: Bacillus Thai I-8 retentat.

Figur 9 En isoelektrofokuserende gel (LKB Ampholine PAG-plate , pH 3,5-9,5) av E. coli pNAPT-7-retentat
A. Efter flekking med Serva Blå
B. Efter β-naftylacetat/FBB-flekking

Spor 1: Markør proteiner med kjent IEP
Spor 4: E. coli pNAPT-7-retentat
Spor 3: Bacillus subtilis 1-85 med pNAPT-7-retentat
Spor 2: som spor 3 efter HPLC-gelfiltrering, aktiv fraksjon

Figur 10 OD-280 nm-profilen og esteraseaktiviteten til HPLC-SEC-fraksjonene
: S-naproksen-metylesterase-aktivitet
: OD 280 nm

P a t e n t k r a v

1.
Mikrobiell esterase, k a r a k t e r i s e r t v e d evnen til stereoselektiv hydrolyse av naproksenester til naproksen med minst 95 vekt-% S-konfigurasjon, idet esterasen har:

- en spesifikk aktivitet på minst 0,1 enheter pr. mg protein;
- et isoelektrisk punkt på 5,4;
- en tilsynelatende molekylvekt på 31 000;
- en HPLC-SEC-profil tilsvarende esteraseaktiviteten i figur 1, analysert på en preparativ HPLC-SEC-kolonne;
- et pH-optimum mellom 6,5 og 10,0; og
- et temperaturoptimum mellom 25 og 45°C.

2.
Esterase ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at esterresten i naproksenesteren er en eventuelt substituert alkylgruppe.

3.
Esterase ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den kan oppnås fra Bacillus-specier og fortrinnsvis Bacillus subtilis.

4.
Esterase ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at har en spesifikk aktivitet på minst 1 enhet/mg protein.

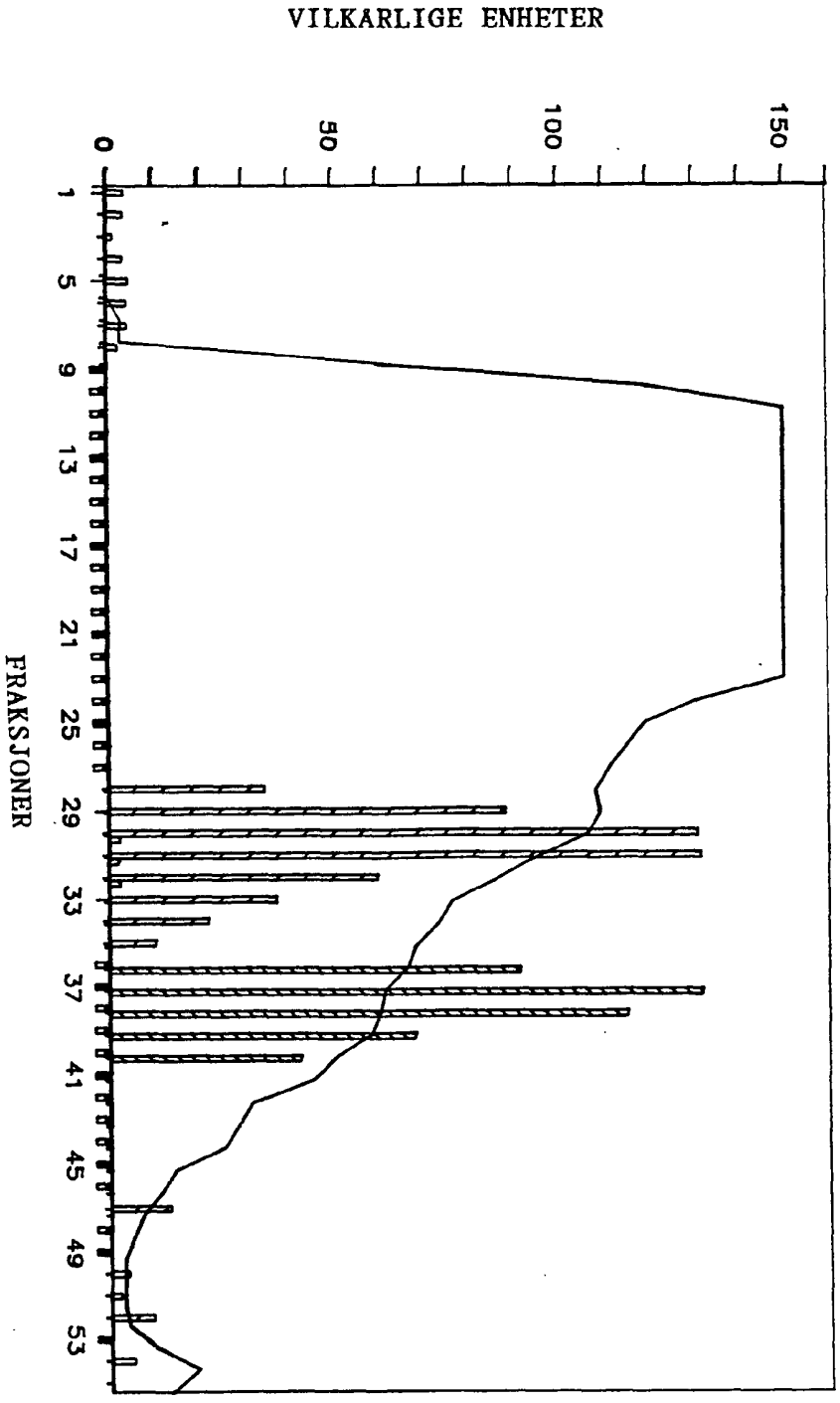

VILKARLIGE ENHETER
0
50
100
150
1
5
9
13
17
21
25
29
33
37
41
45
49
53
FRAKSJONER

FIG. 1

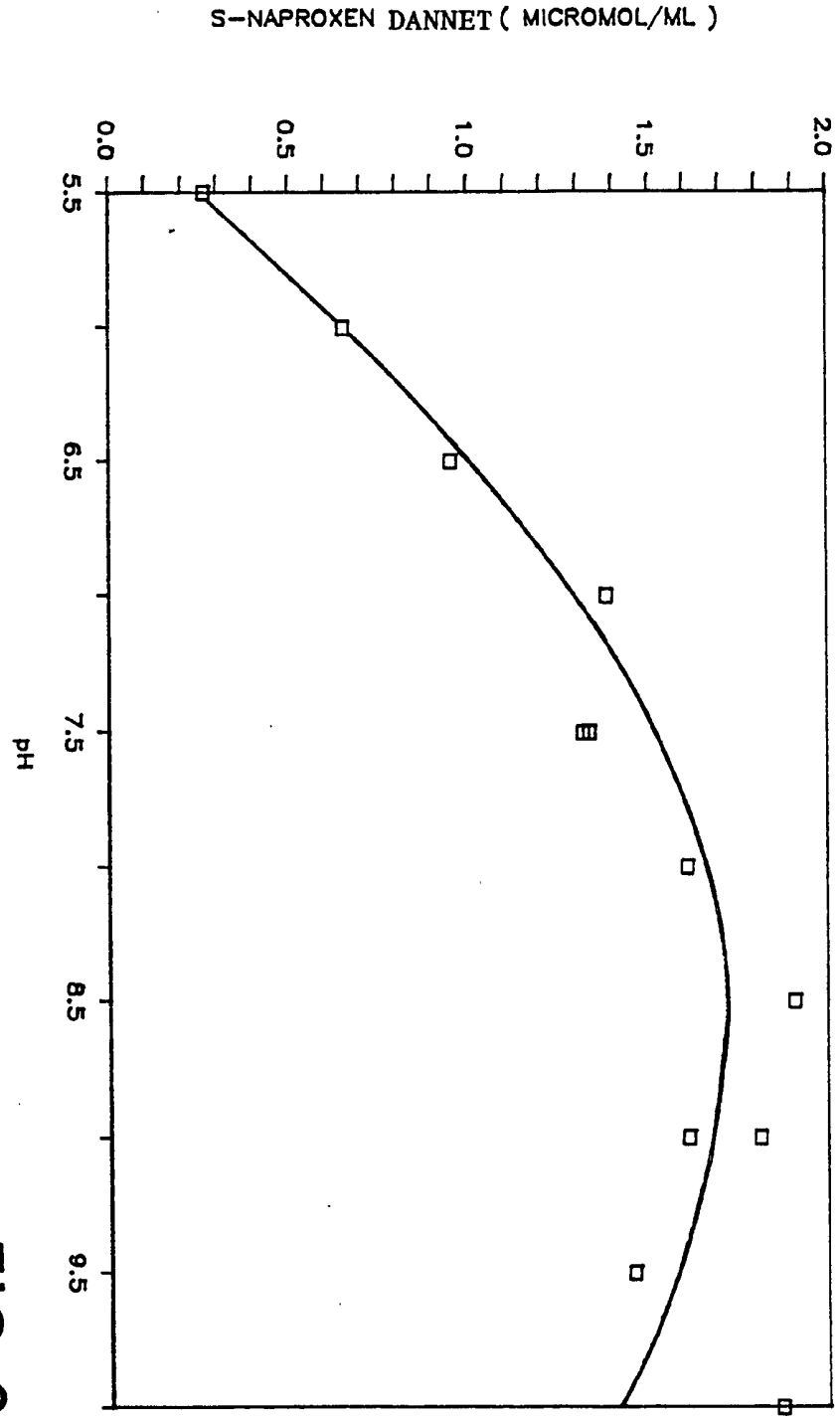


FIG. 2

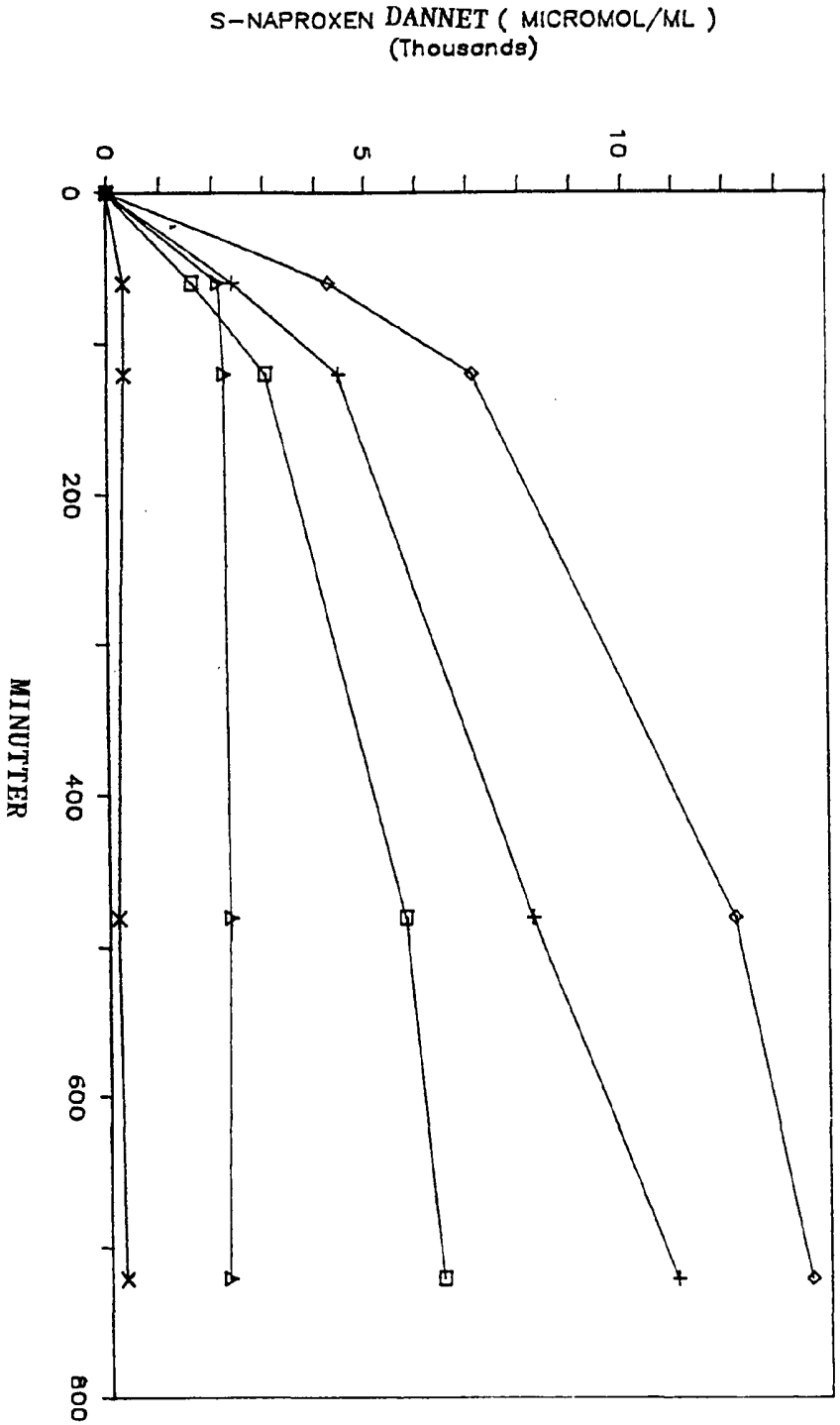

S-NAPROXEN DANNET (MICROMOL/ML)
(Thousands)
0
5
10
0
200
400
600
800
MINUTTER

FIG. 3

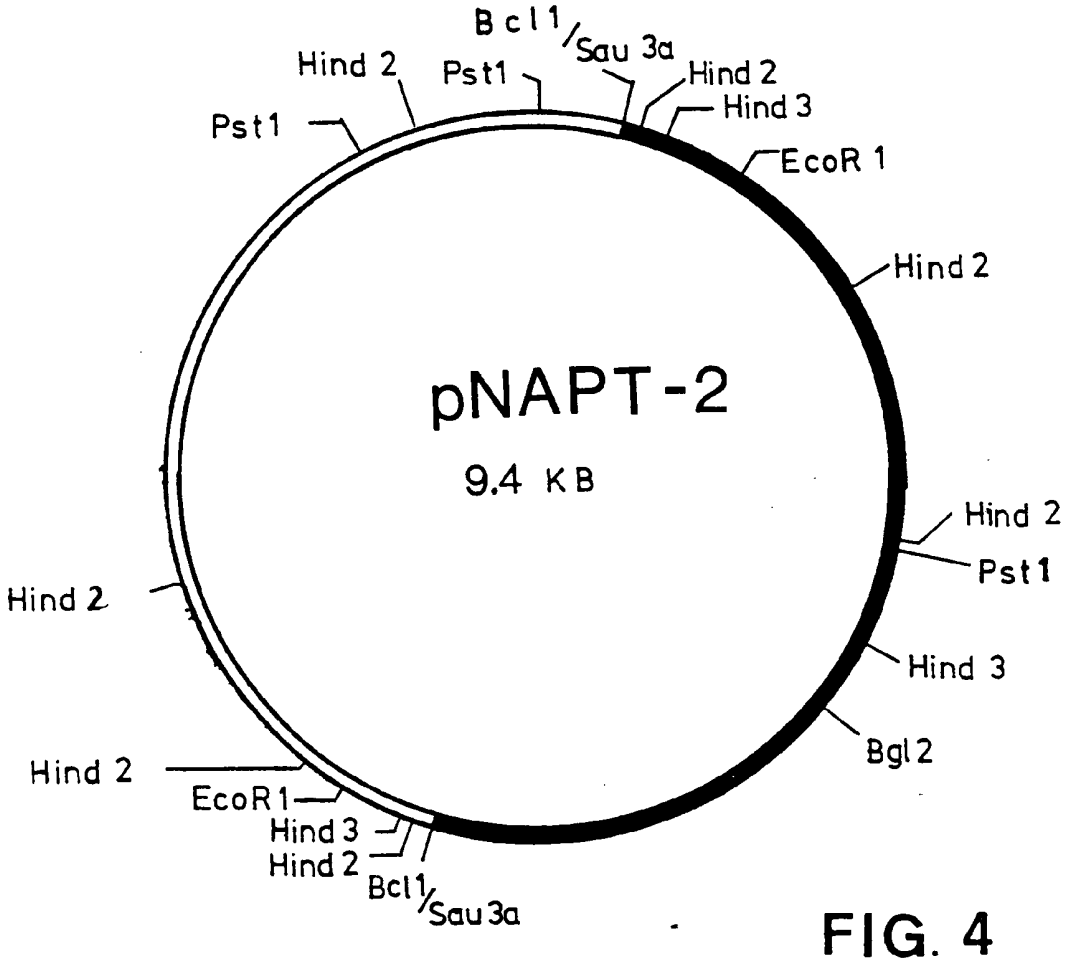

Bcl1/Sau 3a
Hind 2
Pst1
Hind 2
Hind 3
Pst1
EcoR 1
Hind 2
pNAPT-2
9.4 KB
Hind 2
Pst1
Hind 2
Hind 3
Bgl2
Hind 2
EcoR1
Hind 3
Hind 2
Bcl1/Sau3a

FIG. 4

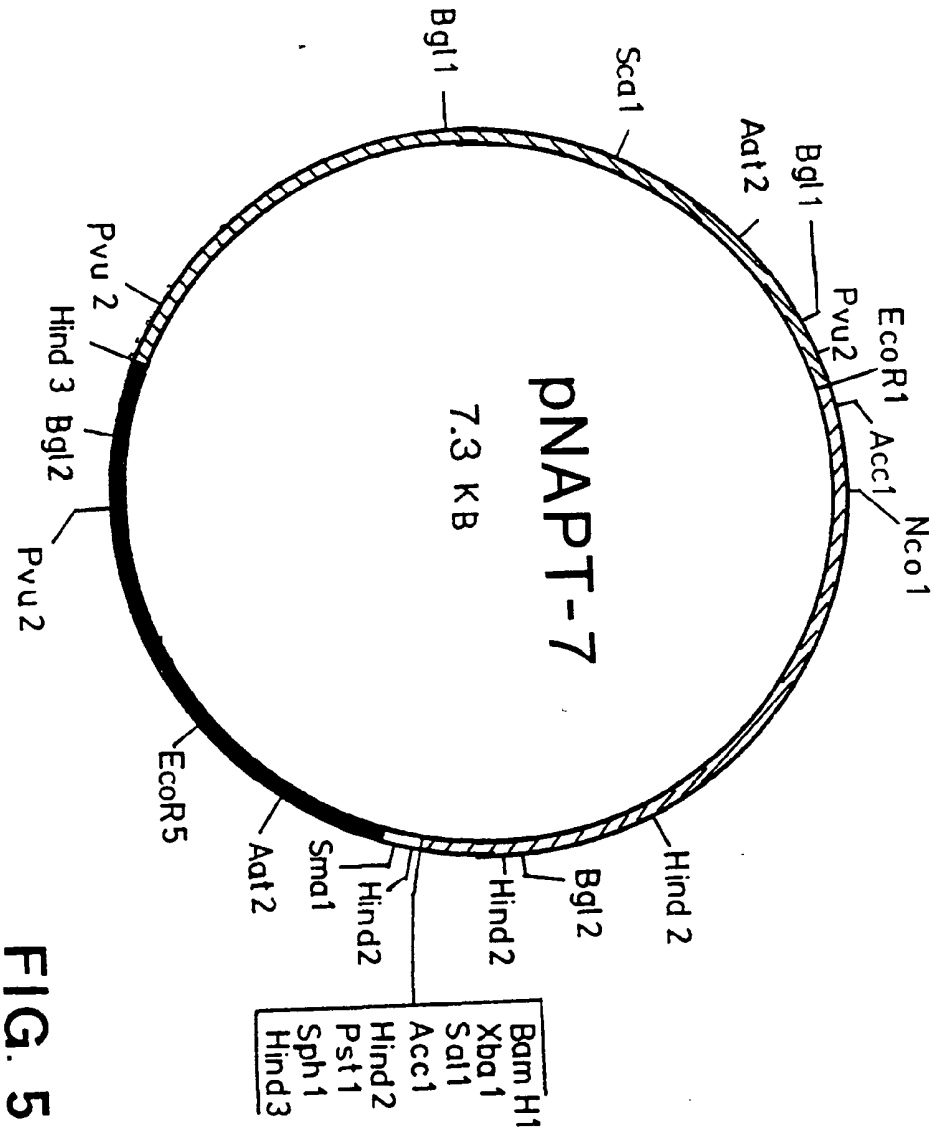

pNAPT-7
7.3 KB
Bgl1
Sca1
Aat2
Bgl1
Pvu2
EcoR1
Acc1
Nco1
Hind 2
Bgl2
Hind2
Sma1
Hind2
Aat2
EcoR5
Pvu2
Hind 3
Bgl2
Pvu 2
Bam H1
Xba 1
Sal1
Acc1
Hind2
Pst1
Sph 1
Hind3

FIG. 5

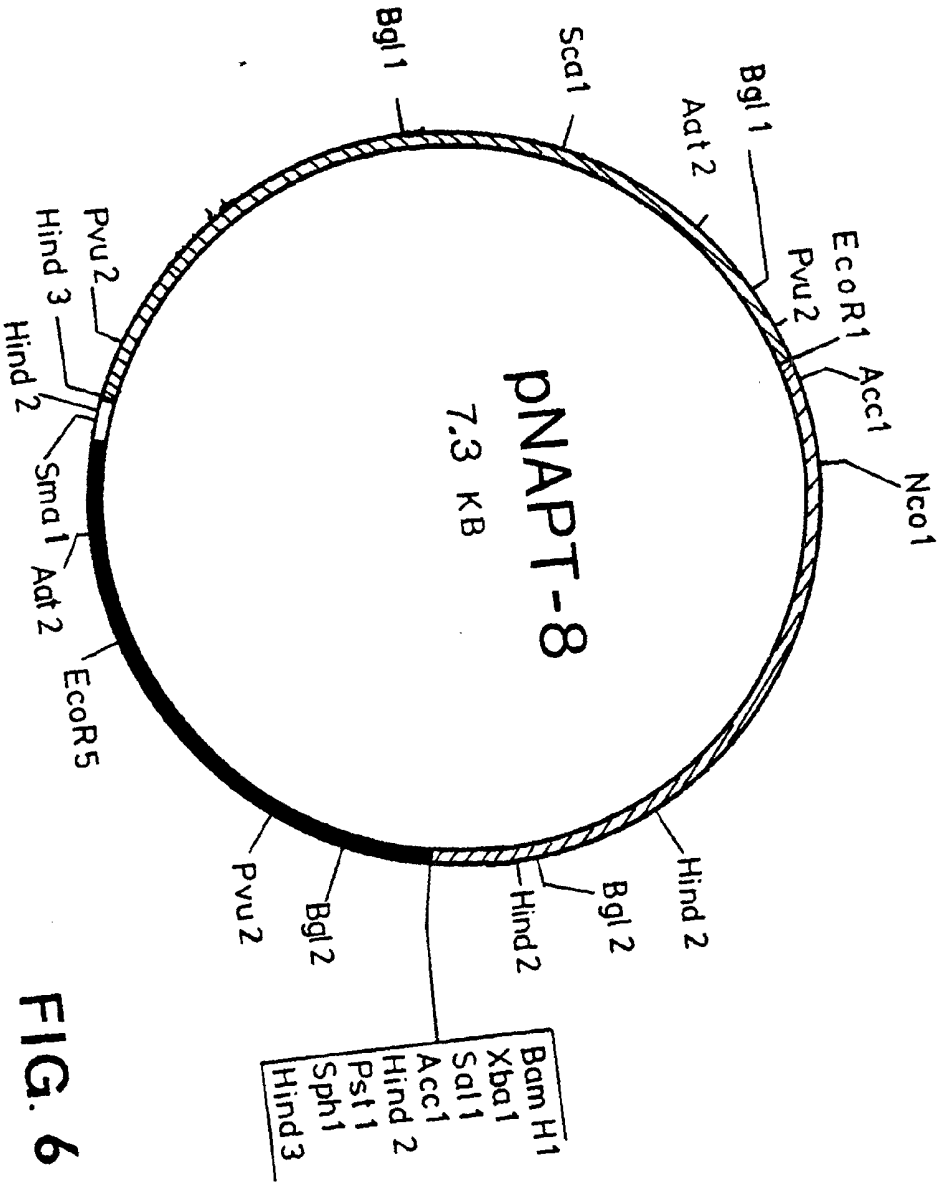

pNAPT-8
7.3 KB
Bgl 1
Sca1
Aat 2
Bgl 1
EcoR1
Pvu 2
Acc1
Nco1
Hind 2
Bgl 2
Hind 2
Pvu 2
Bgl 2
Pvu 2
Hind 3
Hind 2
Sma 1
Aat 2
EcoR5
Bam H1
Xba1
Sal 1
Acc1
Hind 2
Pst 1
Sph1
Hind 3

FIG. 6

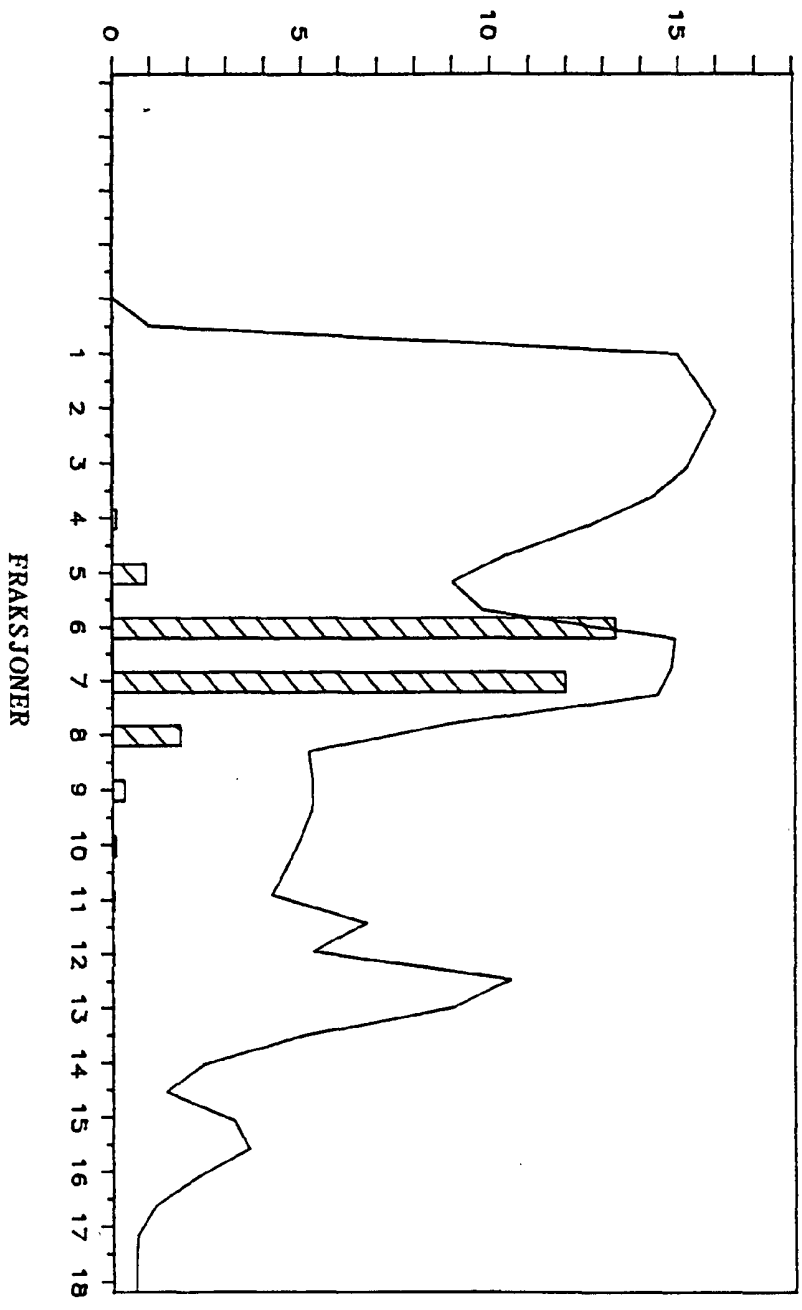

VILKARLIGE ENHETER
0
5
10
15
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
FRAKSJONER

FIG. 7

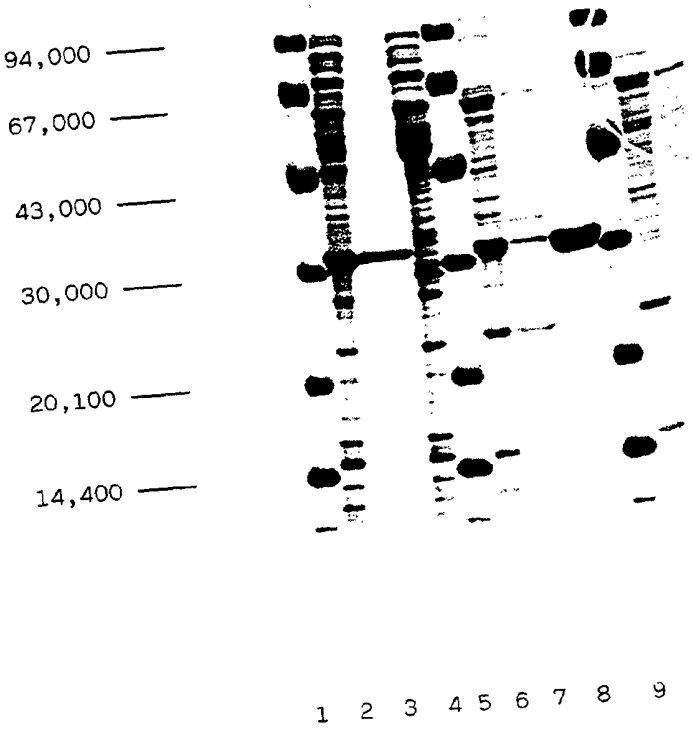


FIG. 8

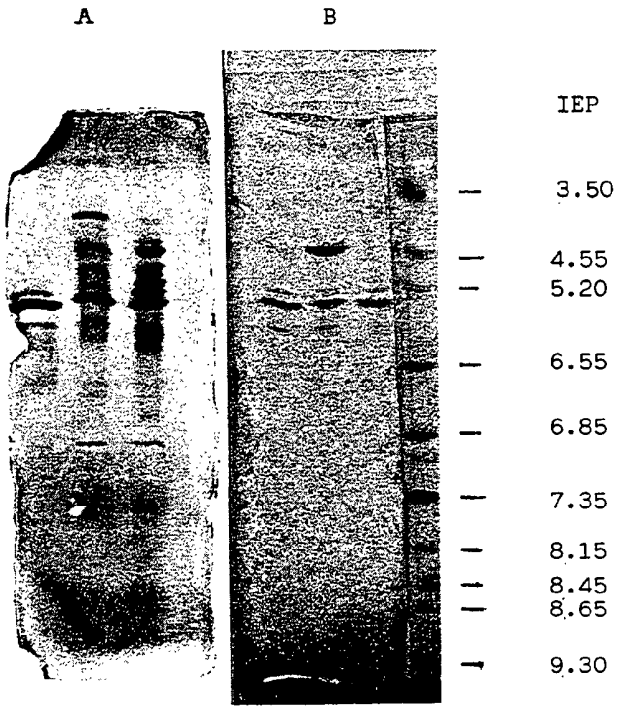


FIG. 9

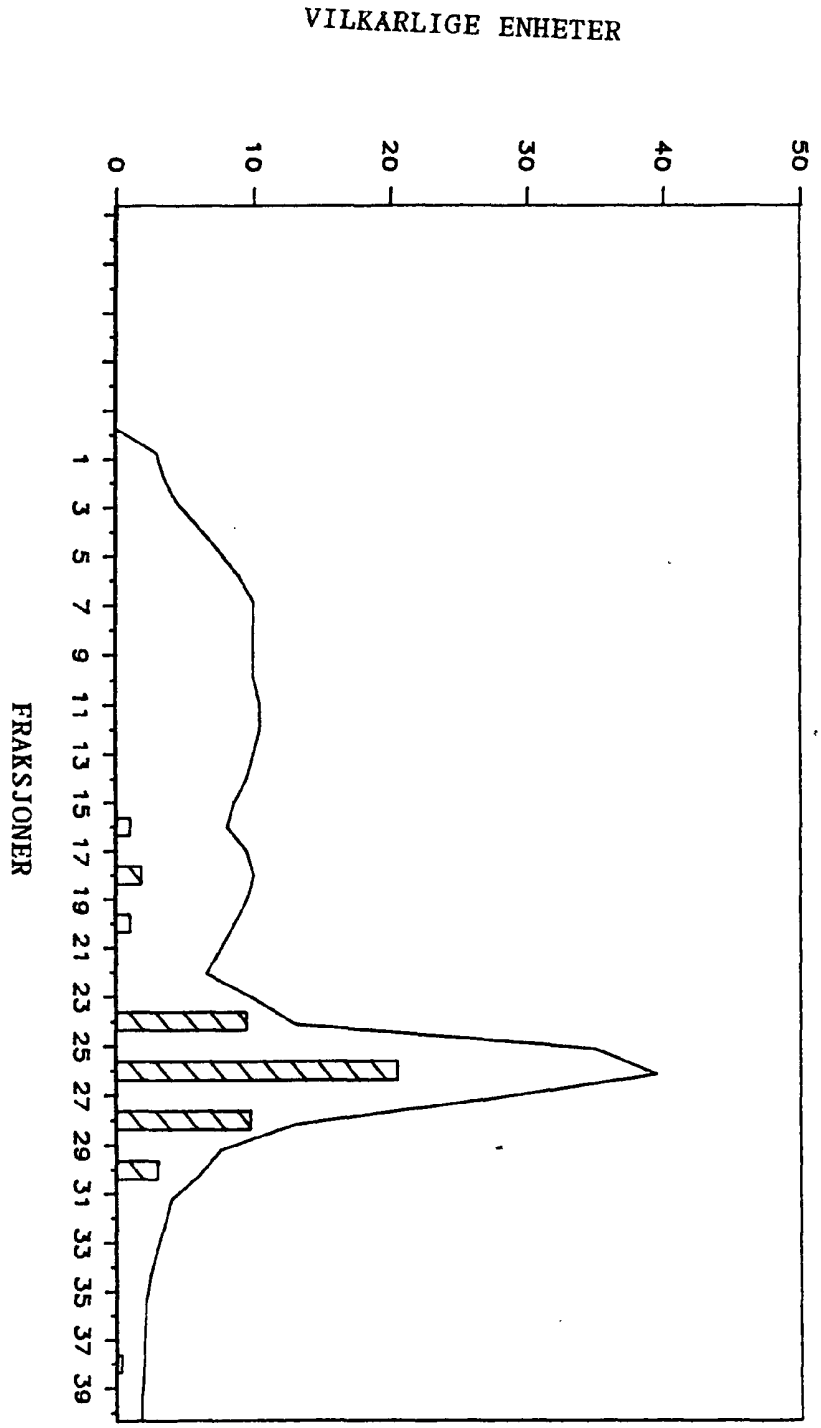

VILKARLIGE ENHETER
0
10
20
30
40
50
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39
FRAKSJONER

FIG. 10