

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1017258

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1017258

51 Int.Cl.⁷
C12N11/02, C12P7/00

22 Ingediend: 01.02.2001

41 Ingeschreven:
02.08.2002

47 Dagtekening:
02.08.2002

45 Uitgegeven:
01.10.2002 I.E. 2002/10

73 Octrooihouder(s):
Technische Universiteit Delft te Delft.

72 Uitvinder(s):
Paloma López Serrano te Delft
Linqui Cao te Delft
Frederik van Rantwijk te Waddinxveen
Roger Arthur Sheldon te Rijswijk

74 Gemachtigde:
Drs. A. Kupecz c.s. te 1000 HB Amsterdam.

54 Werkwijze voor het maken van vernette enzymaggregaten.

57 De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van vernette enzym-aggregaten (CLEA's) welke de stappen omvat van

- a) het precipiteren van een opgelost enzym aanwezig in een vloeibaar medium;
- b) het vernetten met een vernettingsmiddel, en
- c) optioneel, het wassen van het vernette enzymaggregaat.

Volgens de uitvinding wordt ten minste één behandeling uitgevoerd gekozen uit de groep bestaande uit I) het uitvoeren van stap a) in aanwezigheid van een verbinding gekozen uit de groep bestaande uit i) een kroon-ether, en ii) een oppervlakte-actieve stof, en II) het uitvoeren van stap c) met een tweede vloeistof die voor wat betreft de organische samenstelling verschilt van de vloeistof.

NL C 1017258

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

Werkwijze voor het maken van vernette enzymaggregaten

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van vernette enzymaggregaten welke de stappen omvat van

- a) het precipiteren van een opgelost enzym aanwezig in een vloeibaar medium;
- b) het vernetten met een vernettingsmiddel, en
- c) optioneel, het wassen van het vernette enzymaggregaat.

Een dergelijke werkwijze is in het vak algemeen bekend. Deze wordt gebruikt om enzympreparaten te bereiden voor het uitvoeren van verschillende enzym-gekatalyseerde reacties. Zo beschrijven bijvoorbeeld Cao, Cao L. et al. (Organic Letters vol. 2 (10) blz. 1361-1364, 2000) de bereiding van op penicillineacylase gebaseerde aggregaten. De beschreven vernette aggregaten zijn minder actief dan het natieve enzym.

Het doel van de onderhavige uitvinding is om een werkwijze te verschaffen die het mogelijk maakt aggregaten te verkrijgen met een verhoogde enzymactiviteit.

Hiertoe wordt de uitvinding gekenmerkt doordat ten minste één behandeling wordt uitgevoerd gekozen uit de groep bestaande uit I) het uitvoeren van stap a) in aanwezigheid van een verbinding gekozen uit de groep bestaande uit i) een kroonether, en ii) een oppervlakte-actieve stof, en II) het uitvoeren van stap c) met een tweede vloeistof die voor wat betreft de organische samenstelling verschilt van de vloeistof.

Aanvraagster heeft verrassenderwijs gevonden dat een dergelijke behandeling kan resulteren in een vernet enzymaggregaat (CLEA) met een verhoogde activiteit. Ofschoon de onderhavige uitvinding deze verhoogde activiteit voor een bepaald enzym dat wordt gebruikt om een bepaalde reactie te katalyseren noch garandeert, noch een voorspelling van een verbeterde activiteit mogelijk maakt, verschaft de uitvinding een extra parameter die kan worden gecontroleerd om een beter aggregaat te bereiken. Dat wil zeggen dat, voor een bepaald enzym, met weinig moeite en onder gebruikmaking van eenvoudige en routinematige experimenten onderzocht kan worden of de

katalytische activiteit ervan onder gebruikmaking van de behandeling kan worden verbeterd. Uit een reeks van enzymen die in staat zijn de gewenste reactie te katalyseren, kan eenvoudig en met weinig moeite de beste CLEA worden geselecteerd.

5 Omdat de CLEA onoplosbaar is, kan deze met een tweede vloeistof die volledig waterig, organisch of een mengsel daarvan is, worden gewassen. Na de behandeling kan de CLEA worden gevriesdroogd of als een suspensie worden opgeslagen voor later gebruik.

10 Overbeeke P.L.A. et al. beschrijven in J. of Mol. Cat. B: Enzymatic 10, blz. 385-393 (2000) een werkwijze waarin een lipase wordt gekristalliseerd onder invloed van PEG in aanwezigheid van 2-methyl-2,4-pentaandiol, en de gevormde kristallen worden vernet. Daarentegen maakt de onderhavige
15 uitvinding gebruik van een precipitatiemiddel om aggregaten te vormen, in plaats van kristallen.

Bij voorkeur worden stap a) en stap b) tegelijk uitgevoerd.

Dit maakt een vereenvoudigde werkwijze mogelijk, die
20 minder tijd en moeite vergt.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm wordt de verbinding na vernetten verwijderd.

Het is niet nodig dat de oppervlakte-actieve stof en/of de kroonether tijdens de katalytische reactie die door
25 de CLEA wordt uitgevoerd aanwezig is om de hoge activiteit te handhaven. Derhalve kan de verbinding worden verwijderd, in het geval deze de te katalyseren reactie stoort of om andere redenen. Verwijderen kan worden bewerkstelligd onder gebruikmaking van elke in het vak bekende werkwijze, in het bijzonder
30 door middel van dialyse of wassen onder gebruikmaking van centrifugatie.

Volgens een belangrijke toepassing van de uitvinding is het enzym een lipase,

Bijgevolg heeft de uitvinding ook betrekking op een
35 werkwijze voor het uitvoeren van een lipase-gekatalyseerde reactie, waarbij de reactie is gekozen uit de groep bestaande uit i) transesterificatie; ii) interesterificatie; iii) hydrolyse; iv) esterificatie; v) ammoniolyse; vi) aminolyse; en

vii) perhydrolyse, welke werkwijze wordt gekenmerkt doordat een vernet lipase-aggregaat wordt bereid volgens de uitvinding, en het genoemde vernette lipase-aggregaat in contact wordt gebracht met een substraat.

- 5 De onderhavige uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden:

VOORBEELD 1

Bereiding van vernette lipasen

- 10 - *R. miehei* lipase Lipozyme (Novo Nordisk)
 - *Candida antarctica* lipase B SP525 (Novo Nordisk)
 - *P. alcaligenes* lipase (Gist-brocades).

WERKWIJZE Ia) In aanwezigheid van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Water)

- 0,5 ml stockenzymoplossing (Lipozyme of SP525, Novo
 15 Nordisk, Kopenhagen, Denemarken) of 50 mg PaL enzympoeder
 (PaL is *P. alcaligenes* lipase (Gist-Brocades, Delft, Nederland)), worden opgelost in 1 ml kaliumfosfaatbuffer, (100 mM, pH 7) in een centrifugebuis van 10 ml. 550 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ werd
 toegevoegd gevolgd door 1 ml van een precipiterende oplossing
 20 A die bestaat uit 550 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (het precipitatiemiddel) in
 kaliumfosfaatbuffer (100 mM, pH 7), en 80 μl glutaardialdehyde
 (25% oplossing in water). Het mengsel wordt gedurende 17
 uur bij 4°C (kamertemperatuur voor SP525) geroerd. 3 ml H_2O
 wordt aan het mengsel toegevoegd en vervolgens gecentrifu-
 25 geerd. De bovenvloeistof wordt gedecanteerd en het residu
 wordt gewassen, gecentrifugeerd en nog 3 keer gedecanteerd
 met H_2O (5 ml per keer). Het uiteindelijke enzympreparaat
 wordt in 5 ml H_2O bewaard. Indien nodig wordt de vaste stof
 door middel magneetroeren gedispergeerd.

- 30 WERKWIJZE Ib en Ic) In aanwezigheid van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en
 oppervlakte-actieve stof

- Werkwijze Ia) werd herhaald, met dit verschil dat de
 precipiterende oplossing A daarenboven 25 mg natriumdodecyl-
 sulfaat (SDS) (werkwijze Ib) of 25 mg Triton X-100 (TR)
 35 (werkwijze Ic) bevatte.

WERKWIJZE Id) In aanwezigheid van dimethoxyethaan (DME)

0,5 ml stockenzymoplossing (Lipozyme of SP525) of 50 mg PaL enzympoeder wordt in een centrifugebuis van 10 ml gebracht, waarna 1 ml kaliumfosfaatbuffer (100 mM, pH 7), 3 ml DME en 80 μ l glutaardialdehyde worden toegevoegd. Het mengsel wordt gedurende 17 uur bij 4°C geroerd (kamertemperatuur voor SP525).

Aan het mengsel wordt 1 ml DME toegevoegd en het wordt vervolgens gecentrifugeerd. De bovenvloeistof wordt gedecanteerd en het residu wordt gewassen, gecentrifugeerd en nog 3 keer gedecanteerd met DME (elke keer 5 ml). Het uiteindelijke enzympreparaat wordt bewaard in 5 ml DME. Indien nodig wordt de vaste stof gedispergeerd door middel van magnetetroeren.

WERKWIJZE Ie) In aanwezigheid van DME en een kroonether

Werkwijze Id) werd herhaald, met het verschil dat een hoeveelheid van 6,9 mg van de kroonether dibenzo-18-crown-6 werd toegevoegd te zamen met 3 ml DME.

Vernette lipase preparaten werden in suspensie bewaard, hetzij in water of DME, als preparaten Ia-e.

VOORBEELD 2

Activiteitsexperimenten

De activiteit van de met behulp van de bereidingen 1a-e) bereide CLEA's werden getest middels drie reacties. Deze reacties werden hetzij uitgevoerd in een waterige oplossing, of in een organische oplossing.

Voor de testen IIb en IIc werd voorafgaande aan het uitvoeren van de assay de volgende algemene procedure gevolgd:

- Van waterige suspensies werd 0,5 ml monster aan CLEA suspensie gevriesdroogd in een 2 ml Eppendorf cup elk.
- Van organische suspensies werd telkens 0,5 ml monster aan CLEA suspensie gecentrifugeerd in een 2 ml Eppendorf cupje, en de bovenvloeistof werd gedecanteerd.
- Natief enzym, gebruikt als controle, werd direct van de

stockoplossing (50 μ l) genomen, of als een poeder (5 mg), zonder verdere behandeling.

Voor de experimenten IIb en IIc werden de analyses uitgevoerd onder gebruikmaking van een GC Varian Star 3600
5 gaschromatograaf (Varian). Kolom: CP WAX 52 CB 50 m x 0,53 mm. Dragergas: stikstof.

Test IIa) Hydrolyse van p-nitrofenylpropionaat (uitgevoerd in water)

Het enzympreparaat (50 μ l) werd gesuspenderd in 0,5
10 ml water (1,5 ml in het geval van SP525) en 200 μ l (50 μ l in geval van SP525) van de suspensie werd toegevoegd aan 2,5 ml esteroplossing (0,4 mM p-nitrofenylpropionaat in water bij 25°C). Meting van de absorptietoename bij 348 nm (verschijnen van p-nitrofenol) bij de hydrolyse van p-nitrofenylpropionaat
15 werd gevolgd onder gebruikmaking van een Cary 3-Bio UV spectrofotometer van Varian. De waarden zijn gegeven als percentage van de activiteit van het natieve enzym.

Het resultaat is samengevat in Tabel 1.

20

Tabel 1

Hydrolyse van p-nitrofenylpropionaat in water

Enz	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Natief
Lipozyme	152	<u>218</u>	44	0	0	100
SP525	93	40	129	151	<u>177</u>	100

25 % activiteit van actief enzym

Test IIb) Transesterificatie van ethyloctanoaat met octanol (uitgevoerd in diisopropylether)

0,5 ml diisopropylether wordt toegevoegd aan het Ep-
30 pendorf cupje dat het enzym bevat. 50 mg geactiveerde zeoliet NaA (Aldrich) wordt toegevoegd. 0,5 ml van een oplossing van 86 mM ethyloctanoaat, 400 mM octanol, en 50 mM decaan in diisopropylether wordt toegevoegd en bij kamertemperatuur geroerd. Op het aangegeven tijdstip wordt het reactiemengsel
35 gecentrifugeerd, en een monster (100 μ l), opgelost in 0,5 ml DME, genomen en met behulp van GC geanalyseerd.

Het resultaat is samengevat in Tabel 2.

Table 2

Transesterificatie van ethyloctanoaat met octanol in i-Pr₂O

5

Enz	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Natief
Lipozyme	0,16	3,48	0,33	23,79	18,89	0,16
Pal	0,15	7,11	<u>24,18</u>	0,11	0,27	17,55

Activiteit uitgedrukt als μmol octyloctanoaat geproduceerd in 24 u.

10 Test IIc) Hydrolyse van ethyloctanoaat (uitgevoerd in DME/watermengsel)

50 μl H₂O en 0,95 ml oplossing van 43 mM ethyloctanoaat, en 25 mM decaan worden toegevoegd aan een Eppendorf cup die het enzym bevat en bij kamertemperatuur geroerd. Op
 15 het opgegeven tijdstip wordt watervrij Na₂SO₄ aan het reactiemengsel toegevoegd, geschud en gecentrifugeerd. Vervolgens wordt een monster (100 μl) genomen, opgelost in 0,5 ml DME, met behulp van GC geanalyseerd.

Het resultaat is samengevat in tabel 3

20

Tabel 3

Hydrolyse van ethyloctanoaat in DME/water

Enz	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Natief
Lipozym 24u	24,34	<u>40,48</u>	25,37	22,85	22,73	16,34
Pal. 3u	35,82	32,02	<u>40,26</u>	0,49	0,37	3,34

25

Activiteit uitgedrukt als μmol octaanzuur geproduceerd in 24 of 3 u.

Zoals blijkt uit de bovenstaande resultaten kan het toevoegen van een oppervlakte-actieve stof of een kroonether
 30 volgens de onderhavige uitvinding een gunstig effect hebben

op de enzymactiviteit.

VOORBEELD 3

Wastest

5 Werkwijze Ia werd herhaald onder gebruikmaking van SP525. De bovenvloeistof werd gedecanteerd en de pellet gere-suspendeerd in 5 ml water, gecentrifugeerd en de bovenvloeistof wordt gedecanteerd.

10 De verkregen pellet wordt onderworpen aan dezelfde wasprocedure met 3 x 5 ml water of DME. Na de laatste wasstap wordt de CLEA IN 5 ml van hetzelfde oplosmiddel bewaard.

De twee CLEA's werden getest onder gebruikmaking van de transesterificatie van ethyloctanoaat met octanol (zoals beschreven in test IIc).

15 0,5 ml DME werd toegevoegd aan 50 μ l enzympreparaat in een 2 ml Eppendorf. Het met alleen water gewassen enzym was eerder gevriesdroogd in de Eppendorf cup. 50 mg geactiveerd zeoliet NaA wordt toegevoegd. 0.5 ml oplossing van 86 mM ethyloctanoaat, 400 mM octanol, en 50 mM decaan in DME
20 wordt toegevoegd en bij kamertemperatuur geroerd. Na 1 uur wordt het reactiemengsel gecentrifugeerd, een monster (100 μ l) wordt genomen, opgelost in 0,5 ml DME, en met behulp van GC geanalyseerd.

Tabel 4

25

Transesterificatie van ethyloctanoaat met octanol (in DME)

Bewerkingsoplosmiddel	Activiteit
Water	5,41
DME	14,03

30 Activiteit uitgedrukt als μ mol octyloctanoaat geproduceerd in 1 u.

CONCLUSIES

1. werkwijze voor het bereiden van vernette enzymaggregaten welke de stappen omvat van

- a) het precipiteren van een opgelost enzym aanwezig in een vloeibaar medium;
- 5 b) het vernetten met een vernettingsmiddel, en
- c) optioneel, het wassen van het vernette enzymaggregaat, **met het kenmerk**, dat ten minste één behandeling wordt uitgevoerd gekozen uit de groep bestaande uit I) het uitvoeren van stap a) in aanwezigheid van een verbinding gekozen uit de
- 10 groep bestaande uit i) een kroonether, en ii) een oppervlakte-actieve stof, en II) het uitvoeren van stap c) met een tweede vloeistof die voor wat betreft de organische samenstelling verschilt van de vloeistof.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**,
15 dat stap a) en stap b) tegelijk worden uitgevoerd.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, **met het kenmerk**, dat de verbinding na vernetting wordt verwijderd.

4. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het enzym een lipase is.

20 5. Werkwijze voor het uitvoeren van een lipase-gekatalyseerde reactie, waarbij de reactie is gekozen uit de groep bestaande uit i) transesterificatie; ii) hydrolyse; en iii) ammoniolyse, **met het kenmerk**, dat een vernet lipase-aggregaat wordt bereid volgens conclusie 4, en het genoemde
25 vernette lipase-aggregaat in contact wordt gebracht met een substraat.

RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Van belang zijnde literatuur			
Categorie ¹	Vermelding van literatuur met aanduiding, voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde tekstgedeelten of figuren.	Van belang voor conclusie(s) Nr.:	International Patent Classification (IPC)
Y	EP-A 1.088.887 (DSM N.V)	1-5	C12N 11/02
	----		C12P 7/00
Y	US-A 4.532.212 (Shell Oil Compagny)	1-5	

Y	US-A 4.665.028 (Novo Industri A/S)	1-5	
	----		Onderzochte gebieden van de techniek, gedefinieerd volgens IPC 7
Y	JP-A 8.113.593 (Umemoto M); Abstract	1-5	C12N

Y	JP-A 8.114.599 (Umemoto M); Abstract	1-5	

Y	US 2001/0.006.804-A1 (Katsishi Asai)	1-5	

Y	CN-A 1.144.807 (Xi Nan Agricultural Univ.); Abstract	1-5	
	----		Computerbestanden
A	US-A 4.323.650 (United Kingdom Atomic Energy Authority)		Epodoc, WPI, PAJ

A	US-A 4.738.925 (Union Carbide Corp.)		

A	EP-A 1.087.018 (Degussa-Hüls AG)		

Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op:

Omvang van het onderzoek: volledig

Onderzochte conclusies: alle

Niet (volledig) onderzochte conclusies met redenen: ²

Datum waarop het onderzoek werd voltooid: 4 oktober 2001

Vooronderzoeker: Drs. R.B. Boers

¹ Verklaring van de categorie-aanduiding: zie apart blad.

² Op grond van artikel 3:45 j° de artikelen 6:4 en 6:7 van de Algemene wet bestuursrecht, kan aanvrager tegen de niet-eenheidsbeslissing bezwaar maken bij het Bureau voor de Industriële Eigendom, binnen 6 weken na de bekendmaking van deze beslissing.

13.

Categorie van de vermelde literatuur:

- X: op zichzelf van bijzonder belang zijnde stand van de techniek
- Y: in samenhang met andere geciteerde literatuur van bijzonder belang zijnde stand van de techniek
- A: niet tot de categorie X of Y behorende van belang zijnde stand van de techniek
- O: verwijzend naar niet op schrift gestelde stand van de techniek
- P: literatuur gepubliceerd tussen voorrrangs- en indieningsdatum
- T: niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding
- E: colliderende octrooiaanvraag
- D: in de aanvraag genoemd
- L: om andere redenen vermelde literatuur
- &: lid van dezelfde octrooifamilie; corresponderende literatuur

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE
STAND VAN DE TECHNIEK, UITGEVOERD IN OCTROOIAANVRAGE NR. 1017258**

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooigeschriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau 8 oktober 2001

De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële Eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

In het rapport genoemd octrooi- geschrift	datum van publicatie	overeenkomend(e) geschrift(en)	datum van publicatie
EP1088887 A	2001-04-04		
US4532212 A	1985-07-30		
		DK316984 A	1984-12-30
		DK165411B B	1992-11-23
		DK165411C C	1993-04-13
		AU2997684 A	1985-01-03
		JP60036498 A	1985-02-25
		JP5085559B B	1993-12-07
		JP1874334C C	1994-09-26
		EP0136728 AB	1985-04-10
		AT26986T T	1987-05-15
		DE3463509D D	1987-06-11
		CA1228041 A	1987-10-13
		NZ208701 A	1987-10-30
		AU569896 B	1988-02-25
US4665028 A	1987-05-12		
		BE897926 A	1984-04-05
		DK442883 A	1984-04-07
		DK148513B B	1985-07-22
		DK148513C C	1985-12-23
		FI833615 A	1984-04-07
		FI85284B B	1991-12-13
		FI85284C C	1992-03-25

In het rapport genoemd octrooi- geschrift		datum van publicatie	overeenkomend(e) geschrift (en)	datum van publicatie
			DE3336257 AC	1984-04-12
			FR2534272 AB	1984-04-13
			NL8303415 A	1984-05-01
			NL192796B B	1997-10-01
			NL192796C C	1998-02-03
			GB2128620 AB	1984-05-02
			GB2129809 AB	1984-05-23
			JP59130184 A	1984-07-26
			JP4007192B B	1992-02-10
			JP1723280C C	1992-12-24
			ES8504247 A	1985-07-01
			CA1205402 A	1986-06-03
			IT1163947 B	1987-04-08
			KR9007631 B	1990-10-17
			IE56079 B	1991-04-10
JP8113593 A		1996-05-07		
			JP8114599 A	1996-05-07
JP8114599 A		1996-05-07		
			JP8113593 A	1996-05-07
US2001/0006804 A1		2001-07-05		
CN1144807 A		1997-03-12		
US4323650 A		1982-04-06		
			BE830590 A	1975-12-24
			DK285875 A	1975-12-26
			DK148484B B	1985-07-15
			DK148484C C	1985-12-16
			NL7507575 A	1975-12-30
			DE2527884 AC	1976-01-15
			FR2276318 AB	1976-01-23
			JP51019185 A	1976-02-16
			AU8223475 A	1976-12-23
			ZA7503866 A	1977-01-26
			GB1514707 A	1978-06-21
			CA1059936 A	1979-08-07
			AU502784 B	1979-08-09

Algemene informatie over dit aanhangsel is gepubliceerd in de 'Official Journal' van het Europees Octrooibureau nr 12/82 blz 448 ev

In het rapport genoemd octrooi- geschrift		datum van publicatie	overeenkomend(e) geschrift(en)	datum van publicatie
			IT1036359 B	1979-10-30
			IE43057 B	1980-12-17
			CH629251 A	1982-04-15
			US4425434 A	1984-01-10
US4738925	A	1988-04-19		
EP1087018	A	2001-03-28		
			NO20004754 A	2001-03-26
			JP2001120298A	2001-05-08