

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 448 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1506/97
(22) Anmeldetag: 09.09.1997
(42) Beginn der Patentdauer: 15.04.2001
(45) Ausgabetag: 26.11.2001

(51) Int. Cl.⁷: **C12P 35/06**

(56) Entgegenhaltungen:
EP 0474211 (HOECHST, 1992)
AT 401269B (ASAHI KASEI, 1996)

(73) Patentinhaber:
BIOCHEMIE GMBH
A-6250 KUNDL, TIROL (AT).

(72) Erfinder:
REICHERT ARNO DR.
RATTENBERG, TIROL (AT).
RIETHORST WAANDER DR.
BREITENBACH A. INN, TIROL (AT).

(54) ENZYMATISCHES OXYDATIONSVERFAHREN ZUR UMSETZUNG VON CEPHALOSPORIN C IN
GLUTARYL-7-AMINOCEPHALOSPORANSÄURE

(57) Die Erfindung betrifft ein verbessertes enzymatisches Verfahren zur Oxidation von Cephalosporin C zu Glutaryl-7-ACA, bei dem eine D-Aminosäureoxidase-haltige Mischung verwendet wird, deren Esteraseaktivität desaktiviert wurde.

AT 408 448 B

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein verbessertes enzymatisches Verfahren zur Oxidation von Cephalosporin C (= Ceph C) zu Glutaryl-7-aminocephalosporansäure (= Gl-7-ACA). Dabei wird Ceph C in wäßriger Lösung von einer D-Aminosäureoxidase-haltigen Mischung (= DAO-haltige Mischung) zu Gl-7-ACA umgesetzt. Die DAO-haltige Mischung wird aus *Trigonopsis variabilis* (= *T. variabilis*) bereitet, wobei die eingesetzte DAO-Mischung durch das beschriebene Verfahren von störender O-Acetyl-Cephalosporin-C-Esteraseaktivität (= Esteraseaktivität) befreit werden, ohne daß dabei die DAO-haltige Mischung an Oxidaseaktivität verliert.

Gl-7-ACA ist ein Zwischenprodukt zur Herstellung der 7-Aminocephalosporansäure (= 7-ACA) aus Ceph C. D-Aminosäureoxidase katalysiert die Umsetzung von Ceph C mit Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und der thermisch instabilen α -Keto adipoyl-7-ACA, welche durch Wasserstoffperoxid zu Gl-7-ACA und CO_2 oxidiert wird.

In verschiedenen Verfahren wurde bisher die Ausbeute der Gl-7-ACA-Bildung mit *T. variabilis* verbessert. So kann durch Minderung der Katalaseaktivität das Wasserstoffperoxid der Oxidase-reaktion erhalten werden. Dadurch verläuft die Oxidation des Zwischenproduktes α -Keto adipoyl-7-ACA vollständiger. EP 409 521, US 3 801 458 A, US 3 821 209 A und AT 401 269 B offenbaren eine solche Katalase-Inhibierung durch Laugenbehandlung, Inkubation bei 50°C, Zugabe von Azid, Ascorbat oder 3-Amino-1,2,3-triazol. Darüberhinaus wird das durch die Katalase verbrauchte Wasserstoffperoxid nachdosiert (JP 52 125 696 A, JP 55 035 119 A und DE 40 28 119 A). Schließlich wird in EP 583 817 die Verwendung katalasefreie Mutanten genannt, die gleichzeitig mehrere Kopien der chromo-somalen DNA zur Steigerung der Oxidaseleistung enthalten.

Eine weitere wichtige unerwünschte Nebenreaktion ist die Desacetylierung zu den 3-Hydroxymethyl-derivaten des Ceph C und der Gl-7-ACA (nachfolgend steht DA für Desacetyl). Zum Teil läuft diese Reaktion nicht-enzymatisch und kann daher durch geeignete Wahl allgemeiner Reaktionsparameter beeinflusst werden. Daneben enthalten die DAO-haltigen Mischungen aber auch eine Esteraseaktivität, deren selektive Inhibition zu einer bedeutenden Steigerung der Produktqualität und Ausbeute führt.

EP 409 521 offenbart die Desaktivierung der Esterase durch Aceton. Dabei werden Zellen von *T. variabilis* in 20%iger wäßriger Acetonlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Esteraseaktivität nimmt dabei auf unter 90% der Ausgangsaktivität ab und die eingesetzten Zellen werden zugleich permeabilisiert. Durch die Erzeugung von Mehrfachkopien der chromosomalen DNA in der Zelle wird in EP 583 817 das Verhältnis von DAO- zu Esteraseaktivität soweit begünstigt, daß die Nebenproduktbildung durch die Esterase an Bedeutung stark abnimmt. Schließlich offenbart AT 401 269 ein Verfahren zur nahezu vollständigen Inaktivierung der Esteraseaktivität permeabilisierter Zellen durch Inkubation bei Raumtemperatur in 1,5 mM CuSO_4 -Lösung. Weiters wird in diesem Patent aufgezeigt, daß durch mutagene Agenzien, Röntgen- oder UV-Bestrahlung Zellen erzeugt werden können, welche zwar DAO-Aktivität zeigen, aber frei von Esteraseaktivität sind. Bei Lee et.al, Biotechnol. Letters 16, 467-472 (1994) wird dagegen an DAO in zellfreiem Extrakt von *Rhodospiridium toruloides* die Esteraseaktivität durch rasches Abkühlen und Erwärmen zwischen 0 und 55°C gesenkt. Der dort ebenfalls beschriebene Versuch, die Esteraseaktivität durch Imidazol bzw. Phenylmethylsulfonsäurefluorid (im folgenden PMSF genannt) zu inhibieren, wird aber wegen der starken Verluste an DAO-Aktivität und der geringen Wirkung auf die Esteraseaktivität verworfen.

Mit den genannten Methoden verbinden sich einige Nachteile, die ihren Einsatz erschweren. So ist Aceton ein leichtbrennbares Lösungsmittel, das zudem aus dem Zellbrei nach Abschluß der Inaktivierung mit hohem Aufwand entfernt werden muß. Zudem ist die mit Aceton erreichte Beseitigung der Esteraseaktivität nicht vollständig. Die weiters genannte Verwendung genetisch veränderter Organismen beinhaltet dagegen die komplizierte Erzeugung geeigneter Stämme und verbindet sich zudem mit dem Risiko der genetischen Instabilität der gewonnenen Organismen. Allein der Einsatz von CuSO_4 zur Inhibition der Esteraseaktivität erscheint als eine einfach zu realisierende Methode. Dennoch ist die Wirkung des CuSO_4 auf die Esteraseaktivität nicht hinreichend, und wegen des Schwermetalls Kupfer ist die Abwasserbeseitigung problematisch.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes enzymatisches Oxidationsverfahren zur Umsetzung von Ceph C in Gl-7-ACA, wobei eine wäßrige Lösung von Ceph C mit einer DAO-haltigen Mischung in Kontakt gebracht wird und wobei die DAO-haltige Mischung frei von Esteraseaktivität ist. Die Inhibition der Esteraseaktivität wird dabei durch die Inkubation von immobili-

sierten bzw. nicht immobilisierten permeabilisierten oder teilweise zerstörten Zellen, zellfreien Extrakten und teilweise aufgereinigten zellfreien Extrakten mit Phenylmethansulfonsäurefluorid (= PMSF) in wäßriger Lösung erreicht. Die Esteraseaktivität wird dabei überraschenderweise vollständig zerstört, ohne daß die Oxidaseaktivität beeinträchtigt wird. PMSF ist bekanntlich ein irreversibler Inhibitor von Serin-Hydrolasen. Seine Wirkung beruht auf der Sulfonylierung des Serins im katalytischen Zentrum des Enzyms. Das PMSF wird als geringe Menge in ethanolischer Lösung vergleichsweise geringen Volumens eingesetzt. Im Laufe der Inkubation wird überschüssiges PMSF rückstandslos in die unbedenkliche Phenylmethansulfonsäure umgesetzt, und das Lösungsmittel Ethanol verbleibt in der DAO-haltigen Mischung, da es die weiteren Prozessschritte nicht stört.

Die vorliegende Erfindung liefert durch die einfache und vollständige Inhibierung der Esteraseaktivität mittels PMSF-Inkubation der DAO-haltigen Mischung sehr gute GI-7-ACA-Ausbeuten hoher Qualität.

Nach der vorliegenden Erfindung wird Ceph C als wäßrige Lösung von Ceph-C-Natriumsalz oder als Ceph-C-haltige Fermentationsbrühe, worin Zellen und Feststoff beseitigt sind, verwendet. Bevorzugt wird die DAO-haltige Mischung aus *T. variabilis*-Zellen gewonnen, die durch eine Inkubation bei Raumtemperatur und alkalische Einwirkung von ihrer Katalaseaktivität befreit worden sind. Nach der 1-10%igen Zugabe von ethanolischer PMSF-Lösung (10 g PMSF/1000 ml Ethanol) in die neutral gepufferte DAO-haltige Mischung wird dann die Esteraseaktivität vollständig und irreversibel inhibiert. Die 1%ige Zugabe der PMSF-Lösung wird dabei bevorzugt, aber auch höhere PMSF-Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die Oxidaseaktivität.

Die so gewonnene DAO-haltige Mischung wird dann in einer wäßrigen Reaktionslösung mit Ceph C suspendiert, in die Luft oder Sauerstoff unter Druck oder drucklos eingeblasen wird. Die Reaktion kann im neutralen Bereich bei 10-30°C durchgeführt werden. Ihr Verlauf wird mit HPLC verfolgt, sodaß bei Erreichen einer zufriedenstellenden GI-7-ACA-Ausbeute die Reaktion abgebrochen werden kann. Die gewonnene GI-7-ACA kann durch übliche Methoden gereinigt oder aber direkt zur weiteren Verarbeitung als Lösung eingesetzt werden.

Die Oxidaseaktivität wird mit Ceph C als Substrat gemessen. 0.5-2 g der DAO-haltigen Mischung (Zellen sollen vorher permeabilisiert werden) werden in einer 20 mM Ceph C pH 8.0 bei 25°C unter Sauerstoffstrom mit einem Rührer suspendiert. Die Zunahme an GI-7-ACA wird mit HPLC gemessen.

In den nachfolgenden Beispielen, die die Erfindung näher erläutern, ihren Umfang aber in keiner Weise einschränken sollen, erfolgen alle Temperaturangaben in Celsiusgraden.

Beispiel 1 (Zellsuspension):

Zellen von *T. variabilis* ATCC 58536 werden aus einer Fermentationsbrühe durch Zentrifugation abgeerntet (Kubicek-Pranz, E.M. et al., Formation of D-amino acid oxidase in the yeast *Trigonopsis variabilis*. Can. J. Microbiol 1985, 31, pp 624-628). 10 g des gewonnenen Zellpellets (530 U Oxidase) werden im Volumen von 50 ml mit Wasser suspendiert und anschließend für 90 Minuten bei pH 11 (Natronlauge) und Raumtemperatur inkubiert (490 U Oxidase = 100 %). Danach wird der pH mit Phosphorsäure wieder auf 7.0 gestellt. In diese Lösung werden nun 500 µl einer ethanolischen Lösung mit 10 mg PMSF/ml Ethanol gegeben, und bei Raumtemperatur 3 Stunden inkubiert (450 U Oxidase = 92 %). 10 g Ceph C werden in 1000 ml Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 7.5 gestellt. Die PMSF-behandelte *T. variabilis*-Suspension wird dazugegeben und die Mischung unter Sauerstoffbelüftung 180 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die danach erreichte GI-7-ACA-Menge entspricht 91% der Ceph-C-Ausgangsmenge. Die Summe der Desacetylierungsprodukte ist mit 3% bezogen auf die Ceph-C-Ausgangsmenge identisch mit der Anfangsmenge.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine GI-7-ACA-Menge erreicht, die 88% der Ceph-C-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 6% der Ceph-C-Ausgangsmenge.

Beispiel 2 (Zellhomogenat):

Zellen von *T. variabilis* ATCC 58536 werden aus einer Fermentationsbrühe durch Zentrifugation abgeerntet (Kubicek-Pranz, E.M. et al., Formation of D-amino acid oxidase in the yeast *Trigonopsis variabilis*. Can. J. Microbiol 1985, 31, pp 624-628). 10 g des gewonnenen Zellpellets (530 U Oxidase) werden im Volumen von 50 ml mit Wasser suspendiert und anschließend für 90 Minuten bei pH 11 (Natronlauge) und Raumtemperatur inkubiert. Die so erhaltene Zellsuspension wird homogenisiert (385 U Oxidase = 100 %) und dann auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 mit PMSF behandelt (372 U Oxidase = 96 %). Der so erhaltene Zellextrakt wird wie in Beispiel 1 mit Ceph C umgesetzt. Die danach erreichte GI-7-ACA-Menge entspricht 93% der Ceph-C-Ausgangsmenge. Die Summe der Desacetylierungsprodukte verhält sich wie in Beispiel 1.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine GI-7-ACA-Menge erreicht, die 89% der Ceph-C-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 7% der Ceph-C-Ausgangsmenge.

Beispiel 3 (Zellimmobilisat):

Zellen von *T. variabilis* ATCC 58536 werden aus einer Fermentationsbrühe durch Zentrifugation abgeerntet (Kubicek-Pranz, E.M. et al., Formation of D-amino acid oxidase in the yeast *Trigonopsis variabilis*. Can. J. Microbiol 1985, 31, pp 624-628). 10 g des gewonnenen Zellpellets (530 U Oxidase) werden im Volumen von 50 ml mit Wasser und 2 g Polyethylenimin (Molmasse 600.000 - 1.000.000) suspendiert und anschließend für 90 Minuten bei pH 11 (Natronlauge) und Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der pH mit Phosphorsäure wieder auf 8.5 gestellt und die Lösung mit 50 ml Toluol so gerührt, daß eine stabile Emulsion feiner Tröpfchen entsteht. Durch Zugabe von 8 ml 25%iger Glutardialdehydlösung erstarren die Tröpfchen zu festen sphärischen Partikel. Dieses Zellimmobilisat wird mit Wasser gewaschen (290 U Oxidase = 100 %). Das Immobilisat wird dann in 50 ml 20 mM Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert, wie unter Beispiel 1 beschrieben mit 500 µl PMSF-Lösung versetzt und 180 Minuten inkubiert. Die Gesamtaktivität beträgt 305 U Oxidase (= 105 %). Der so gewonnene Katalysator wird dann wie unter Beispiel 1 beschrieben in Ceph-C-Lösung eingesetzt. Die danach erreichte GI-7-ACA-Menge entspricht 92% der Ceph-C-Ausgangsmenge. Die Summe der Desacetylierungsprodukte bleibt wie in Beispiel 1 unverändert.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine GI-7-ACA-Menge erreicht, die 89% der Ceph-C-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 7% der Ceph-C-Ausgangsmenge.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Enzymatisches Oxidationsverfahren zur Umsetzung von Cephalosporin C in Glutaryl-7-aminocephalosporansäure, wobei eine wäßrige Lösung von Cephalosporin C mit einer D-Aminosäureoxidase-haltigen Mischung in Kontakt gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß die D-Aminosäureoxidase-haltige Mischung durch Zusatz von Phenylmethansulfonsäurefluorid irreversibel von O-Acetyl-Cephalosporin-C-Esteraseaktivität befreit worden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibierung der Esteraseaktivität der D-Aminosäureoxidase-haltigen Mischung bei Phenylmethansulfonsäurefluorid-Konzentrationen von 5-10000 ppm durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die D-Aminosäureoxidase-haltige Mischung aus immobilisierten oder nicht immobilisierten Zellen oder immobilisierten und nicht immobilisierten zellfreien Extrakten oder teilweise aufgereinigten Zellextrakten erhalten wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die D-Aminosäureoxidase-haltige Mischung aus permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen erhalten wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die D-Aminosäureoxidase-haltige Mischung durch die Inkubation mit Phenylmethansulfonsäurefluorid vor oder während des Oxidationsverfahrens irreversibel die O-Acetyl-Cephalosporin-C-Esteraseaktivität verliert.