(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/73490 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12P 35/02, C12N 9/80

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04337

(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Mai 2000 (13.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 24 632.7 28. Mai 1999 (28.05.1999) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder: BONGS, Jürgen; Hildastrasse 32, D-65189 Wiesbaden (DE). MEIWES, Johannes; Theodor-Fliedner-Strasse 39, D-65510 Idstein (DE). KRUSE, Wolfgang; Brückenstrasse 29, D-65719 Hofheim (DE). KOLLER, Klaus-Peter; Carl-Orff-Weg 12, D-65812 Bad Soden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

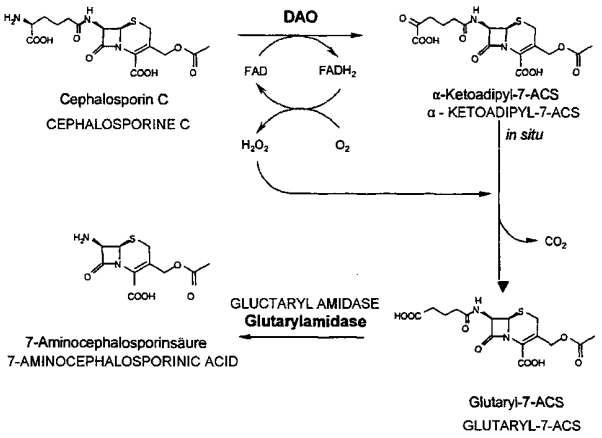
(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DELAYING THE DEACTIVATION OF GLUTARYL AMIDASE DURING AN ENZYME CATALYSIS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERZÖGERUNG DER DESAKTIVIERUNG VON GLUTARYLAMIDASE WÄHREND EINER ENZYMKATALYSE

REACTION SCHEME FOR THE ENZYMATIC SYNTHESIS OF 7-ACS
Reaktionsschema zur enzymatischen Synthese von 7-ACS



(57) Abstract: The invention relates to a method for delaying the deactivation of glutaryl amidase during an enzyme catalysis. The enzyme catalyst is separated off by filtration after maximum reaction of the substrate and can be re-used in a subsequent reaction feed. However, the activity of the enzyme catalyst is reduced with each reaction cycle. This inactivation of the enzyme catalyst can be slowed down by bringing it into contact with a thiol during the reaction.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/73490 A1

europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung während einer Enzymkatalyse von Glutarylamidase. Der Enzymkatalysator wird nach maximalem Umsatz des Substrats über Filtration abgetrennt und kann in einem folgenden Reaktionsansatz wiederverwendet werden. Dabei verliert der Enzymkatalysator bei jedem Reaktionszyklus an Aktivität. Die Inaktivierung des Enzymkatalysators kann verlangsamt werden, indem er während der Umsetzung mit einem Thiol in Kontakt gebracht wird.

Beschreibung

Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase während einer Enzymkatalyse

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase während einer Enzymkatalyse.

Die enzymatische Synthese der Antibiotikum-Vorstufe 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACS) erfolgt – wie in Fig. 1 dargestellt – in zwei Reaktionsschritten. Zunächst wird Cephalosporin C unter Einwirkung von D-Aminosäureoxidase (DAO) zu α-Ketoadipyl-ACS oxidiert. Diese Verbindung wird im nachfolgenden Schritt durch durch die Glutarylamidase (GAE) zu 7-ACS hydrolisiert. 7-ACS ist von großem kommerziellem Interesse für die Produktion semisynthetischer Cephalosporinantibiotika.

Die Synthese erfolgt mit den in der Regel auf Trägern immobilisierten Enzymen D-Aminosäureoxidase bzw. Glutarylamidase. Diese Enzyme werden nach Beendigung der Reaktion von der Produktlösung abgetrennt und können erneut bei der nächsten Charge eingesetzt werden. Die mehrfache Benutzung der Enzyme führt allerdings zu deren Desaktivierung und entspricht einem Enzymverbrauch.

Aus der Literatur ist bekannt, daß strukturverändernde Oxidationen an Proteinen durch den Einsatz von Thiolreagenzien wie z.B. *2-Mercaptoethanol* (P.Golini et al. Enzyme and Microbial Technology, 17, 1995, 324-329; Int. J. Peptide Protein Res., 48, 1996, 532-538) unterdrückt werden können.
Beispielsweise lässt sich die D-Aminosäureoxidase (DAO) durch Thiole regenerieren. Das Flavoprotein DAO katalysiert die stereospezifische Deaminierung von D-Aminosäuren zu den entsprechenden α-Ketosäuren und Ammonium beispielsweise wie in Fig. 1 gezeigt die Umsetzung von Cephalosporin C zu α-Ketoadipyl-7-Aminocephalosporinsäure (α-Ketoadipyl-7-ACS). α-Ketoadipyl-7-ACS decarboxyliert in situ zu Glutaryl-7-ACS (P.Golini et al. Enzyme and Microbial

Technology 17, 1995, 324 – 329). Bei der technische Anwendung erfolgt der Einsatz häufig nicht in gelöster Form sondern immobilisiert durch Bindung an Polymere wie z. B. aminoalkylierte Polymere oder oxiranaktivierte Polymere. Dadurch kann der Enzymkatalysator nach der Reaktion durch Filtration abgetrennt werden und steht für eine Wiederverwendung zur Verfügung. Der immobilisierte DAO-Katalysator unterliegt einer partiellen Inaktivierung. Wird der einmal verwendete Enzymkatalysator in einer weiteren Reaktion unter sonst gleichen Bedingungen wieder eingesetzt, verlängert sich die Reaktionszeit, die zur maximalen Umsetzung des Substrats nötig ist. Diese bei jeder Wiederverwendung auftretende Verlängerung der Reaktionszeit ist ein Maß für die Stabilität des Katalysators im Herstellprozess von z. B. Glutaryl-7-ACS. Das Ausmaß der Änderung der Reaktionszeit bis zum maximalen Substratumsatz ermittelt über mehrere Produktionszyklen wird als operationelle Stabilität bezeichnet. Die operationelle Stabilität der immobiliserten DAO lässt sich verbessern, wenn der Enzymkatalysator nach der Reaktion durch Filtration vom Reaktionsgemisch abgetrennt und mit einem Thiol, beispielsweise 2-Mercaptoethanol, versetzt wird. DAO enthält einige leicht oxidierbare Sulfhydrylgruppen, überwiegend als funktionelle Gruppen der Cystein-Aminosäuren des Proteins. Die Wirkung von 2-Mercaptoethanol beruht auf der reduzierenden Wirkung des Thiols gegenüber den oxidationsempfindlichen Sulfhydrylgruppen der Cysteine. Die Regeneration dieser oxidierten Sulfhydrylgruppen resultiert in einer deutlichen Verbesserung der operationellen Stabilität. Im besonderen Falle der DAO muss die Regenerierung nach Abtrennung des Enzyms vom Reaktionsgemisch erfolgen, da während der Enzymkatalyse H_2O_2 entsteht. Dieses würde als starkes Oxidationsmittel ein zugesetztes Thiol inaktivieren.

Die Zugabe von Thiol kann die Aktivität von Proteinen auch reduzieren. Auch dieser Effekt kann mit dem Vorhandensein von Cysteinresten erklärt werden. Ein Beispiel dafür ist die Aminoacylase. Die Aminoacylase ist ein dimeres Enzym mit einem Zn^{2+}-Atom pro Untereinheit. Jede Untereinheit des Enzyms enthält 2 Cystein SH-Gruppen und 2 Disulfid-Bindungen. Die chemische Modifizierung der SH-Gruppen wie das Aufbrechen der Disulfid-Bindungen kann zu einer Inaktivierung des Enzyms führen Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol die Aktivität

der Aminoacylase reduziert wird, wohingegen nach Entfernung des 2-Mercaptoethanol durch Dialyse oder Gelfiltration die ursprüngliche Enzymaktivität fast komplett wiederhergestellt werden kann (W. Kördel u. F. Schneider Biochem. Biophys. Acta 445, 1976, 446 – 457).

Da offensichtlich die Wirkung des Thiols durch die Oxidation bzw. Reduktion von Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten vermittelt wird, sollte folglich die Zugabe von Thiolen zu Enzymen, von denen bekannt ist, dass sie keine Cysteinreste enthalten, zu keiner Änderung der Enzymaktivität führen.

Im Rahmen der mehrfachen Benutzung von GAE bei katalytischen Umsetzungen des Katalysators kommt es wie eingangs für die Synthese von 7-ACS beschrieben (vgl. Fig. 1) zu einer Desaktivierung des Enzyms, die einem Verbrauch entspricht. Die Stabilität des Katalysators korreliert mit wichtigen Produktionskosten des Prozesses wie dem Zeitbedarf, dem Abfallaufkommen und den Katalysatorkosten. Ein mit dem vorstehend für DAO beschriebenes vergleichbares, zur Stabilisierung von GAE bzw. zur Erhöhung deren operationellen Stabilität geeignetes Verfahren ist bisher nicht bekannt. Das Enzym GAE besteht aus 2 Peptidketten (Protein A und B). Die Interaktion der Ketten erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, sowie hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen von Proteindomänen.

Die Klonierung des Gens aus Pseudomonas sowie die Expression in E. coli wurde z.B in EP-P-0504798 (US5830743) sowie EP-A-0708180 (US5766881) beschrieben. Die Verwendung von Mikroorganismen oder Enzymen aus diesen zur Herstellung von 7-ACS findet sich in EP-A-0275901 (US4990444) sowie EP 0525861 B1 (US5332663). Ein Reinigungsverfahren für das Enzym ausgehend von einem überproduzierendem E. coli Stamm ist beschrieben in D. Bianchi et al., Enzyme and Microbiological Technology 20, 1997, 368 – 372.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase während einer Enzymkatalyse bereitzustellen.

Wie der Aminosäureanalyse (Tabelle 1) zu entnehmen ist, fehlt der Glutarylamidase (GAE) die Aminosäure Cystein. Der Einsatz von Thiolreagenzien

zur Stabilisierung sollte demnach bei diesem Biokatalysator keine Steigerung der operationellen Stabilität bewirken. Überraschenderweise konnte im Experiment das Gegenteil bewiesen werden. Der Zusatz unterschiedlicher thiolhaltiger Reagenzien (z.B. *2-Mercaptoethanol, Cystein*) führte bei der GAE je nach Konzentration zu einer drastischen Steigerung der operationellen Stabilität.

Demgemäß wird die Aufgabe der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zur Verzögerung der Inaktivierung während einer Enzymkatalyse von Glutarylamidase, welches sich dadurch auszeichnet, dass das Enzym mit mindestens einem Thiol in Kontakt gebracht wird. Wahlweise kann das Enzym dabei in freier oder in an ein Trägermaterial gebundener Form vorliegen. Ein bevorzugtes Trägermaterial ist beispielsweise ein oxiran-aktiviertes Polyacrylat.

Unter Thiol oder Mercaptan wird eine chemische Verbindung wie 2-Mercaptoethanol, Glutathion oder die Aminosäure Cystein verstanden, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass sie eine Thiolgruppe (-SH) im Molekül enthalten. Trägergekoppelte GAE besteht aus dem Enzymkatalysator GAE, der beispielsweise an oxiran-aktivierte oder auch aminoalkylierte Polyacrylate (=Träger) gebunden vorliegt. Ein Verfahren zur Herstelllung trägergekoppelter GAE findet sich in D. Bianchi et al., Enzyme and Microbiological Technology 20, 1997, 368 – 372. Beispiele für Träger sind Eupergit®, Amberlite® XAD7 oder Duolite® A365 (alle Röhm und Haas).

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase während einer Enzymkatalyse, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das Enzym mit mindestens einem Thiol in Kontakt gebracht wird.
In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist die Glutarylamidase an einen polymeren Träger gekoppelt, bei welchem es sich insbesondere um ein oxironaktiviertes Polyacrylat handeln kann. Bevorzugt wird als Thiol 2–Mercaptoethanol verwendet, welches vorzugsweise im Konzentrationsbereich 1 bis 100 mM verwendet wird. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des

Verfahrens wird als Thiol Cystein eingesetzt, welches bevorzugt im Konzentrationsbereich 1 bis 100 mM zur Anwendung kommt.

Ein wie vorstehend bezeichnetes Thiol kann kontinuierlich oder diskontinuierlich verwendet werden. Bei der kontinuierlichen Verwendung ist das Thiol während der Reaktion zugegen, während bei der diskontinuierlichen Verwendung die Behandlung zwischen den Reaktionsschritten erfolgt. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird als Substrat Glutaryl–7–Aminocephalosporinsäure verwendet. Die Glutaryl–7–cephalosporinsäure liegt bevorzugt im Bereich von 5–500 mM vor.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung eignet sich insbesondere zur Herstellung von 7–Aminocephalosporinsäure unter Verwendung von Glutarylamidase als Enzymkatalysator, wobei die Desaktivierung der Glutarylamidase wie vorstehend beschrieben erfolgt.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung mindestens eines Thiols zur Verzögerung der Desaktivierung der Glutarylamidase gemäß einem Verfahren wie im vorhergehenden beschrieben.

Beispiele:

Eine praktische Anwendungsmöglichkeit für eine Enzymkatalyse mittels Glutarylamidase besteht beispielsweise in der Herstellung von 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACS) aus Glutaryl-7-aminocephalosporinsäure (vgl. Fig. 1). Die Enzymkatalyse wurde dabei wie folgt durchgeführt:
Das Substrat *Glutaryl-7-Aminocephalosporinsäue* (*G-7-ACS*) wurde in einer Konzentration von 40 mM bei 40 °C und pH 8,3 in einem Reaktionsvolumen von 120 ml mit der immobilisierten *GAE (aus Pseudomonas diminuta)* umgesetzt. Mit Hilfe eines automatisierten, peripheren Systems bestand die Möglichkeit, für den Prozess relevante Parameter (pH, Temperatur) on-line zu messen und durch eine geeignete Regelungsmimik zu kontrollieren. Der auf Grund der Reaktion auftretende pH-Shift

ins Saure wurde durch Autotitration mit Lauge somit aufgefangen. Die Geschwindigkeit der Laugenzugabe korrelierte mit der Reaktionsgeschwindigkeit und konnte als Maß für den Umsetzungsgrad des Substrates (*G-7-ACS*) bewertet werden. Die PC-gestützte Datenverarbeitung erlaubte die on-line Bestimmung des Umsatzes und ergab das Abbruch-Kriterium der Reaktion. Der Abbruch der Reaktion wurde vorgenommen, als der maximalen Umsatz erreicht war. Das Erreichen des maximalen Umsatzes zeigte sich daran, dass keine Laugenzugabe mehr erforderlich war. Nach Erreichen des maximalen Umsatzes wurde der Katalysator von der Produktlösung über ein Filter getrennt und anschließend frische Substratlösung eingefüllt. Die Reaktionszeiten der einzelnen, aufeinanderfolgenden Umsetzungen (= Batches) konnten als Funktion der Batches aufgetragen werden. Über lineare Regression ergab sich eine Steigung der Geraden (= X-Koeffizient [min/Batch]), die als Maß für die Katalysatordesaktivierung bewertet werden konnte. Je kleiner dieser Wert, desto höher war die operationelle Stabilität des Katalysators.

Beispiel 1: Reaktionszeit bis zu quantitativem Umsatz als Funktion der Batch-Nummer *ohne* bzw. *mit* Cystein

In mehreren Versuchsreihen wurde der Substratlösung *Cystein* als Thiolreagenz in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben, und die Reaktion wie beschrieben durchgeführt. Wie in der folgenden Tabelle zu sehen ist, nahm mit steigender *Cystein*-Konzentration die Geradensteigung und damit der X-Koeffizient ab Bei Annahme einer linearen Desaktivierung über die durchgeführten Umsetzungen hinaus ließ sich für jede Messreihe die Anzahl der möglichen Batches bis zur Verdopplung der Reaktionszeit ermitteln. Die Werte sind der nachfolgendenTabelle zu entnehmen. Man erkennt eine deutliche Steigerung der operationellen Stabilität, wenn der Reaktionsansatz zusätzlich Cystein enthält. Dies zeigt sich an der Zunahme der Anzahl durchgeführter einzelner Reaktionsansätze (=Batches), die durchgeführt werden können, bis die Reaktionszeit sich bis zur maximalen Substratumsetzung verdoppelt hat.

Die Reaktionsparameter wurden dabei wie folgt gewählt:

Reaktionsparameter:

V_R	=	120	ml
T	=	40	°C
pH	=	8,3	[Ammoniak 1,66 %]
[G-7-ACS]	=	40	mM [KPP 100 mM]
[Cystein] $_{in\ Substrat}$	=	variabel	
Menge (GAE)	=	500	U

Tabelle zu Beispiel 1: Reaktionszeit bis zu quantitativem Umsatz als Funktion der Batch-Nummer *ohne* bzw. *mit* Cystein

	ohne Cystein	*mit* Cystein [1 mM]	*mit* Cystein [6 mM]	*mit* Cystein [8 mM]	*mit* Cystein [10 mM]
X-Koeffizient [min/Batch]	0,414	0,131	0,077	0,046	0,016
Anzahl der Batches bis zur Verdopplung der Reaktionszeit (bei linearer Desaktivierung) [-]	36	114	195	326	938

Vergleich des X-Koeffizienten (d.i. die Zeitzunahme pro Batch) zum Erreichen quantitativen Umsatzes bzw. Anzahl der Batches bis zur Verdopplung der Reaktionszeit als Funktion der *Cystein*-Konzentration in der Substrat-Lösung

Beispiel 2: Reaktionszeit bis zu quantitativem Umsatz als Funktion der Batch-Nummer *ohne* bzw. *mit* Mercaptoetahnol

2-Mercaptoethanol als Thiolreagenz führt zur Steigerung der operationellen Stabilität der *GAE*. Die folgende Tabelle zeigt den Vergleich der Versuchsläufe mit bzw. ohne

2-Mercaptoethanol. Die Ergebnisse mit Thiol zeigen hinsichtlich der Stabilisierung der operationellen Stabilität einen vergleichbaren Verlauf wie mit Cystein.

Die gewählten Reaktionsparameter wurden folgendermaßen eingestellt:

Reaktionsparameter:

V_R	= 120	ml	
T	= 40	°C	
pH	= 8,3		[Ammoniak 1,66 %]
[G-7-ACS]	= 40	mM	
Menge(GAE)	= 500	U	
[Mercaptoethanol]	= 1	µl/ml	

Tabelle zu Beispiel 2:

Reaktionszeit bis zu quantitativem Umsatz als Funktion der Batch-Nummer *ohne* bzw. *mit* Mercaptoethanol

	ohne Mercaptoethanol	*mit* Mercaptoethanol [1 µl/ml]
X-Koeffizient [min/Batch]	0,44	0,08
Anzahl der Batches bis zur Verdopplung der Reaktionszeit (bei linearer Desaktivierung) [-]	41	225

Vergleich des X-Koeffizienten (d.i. die Zeitzunahme pro Batch, also die Steigung der Geraden) zum Erreichen quantitaiven Umsatzes *ohne* bzw. *mit Mercaptoethanol*

Tabelle 1:

Aminosäureanalyseprotokoll der *GAE*

Summe für die Gesamtsequenz:

Molekulargewicht = 79685.47 Anzahl der Reste = 720

Durchschnittliches Molekulargewicht pro Rest= 110.674 Ladung = -18

Isoelektrischer Punkt = 5.20

Extinktionskoeffizient = 132000

Rest	Anzahl	Molprozent ..
A = Ala	85	11.806
B = Asx	0	0.000
C = Cys	0	0.000
D = Asp	49	6.806
E = Glu	32	4.444
F = Phe	31	4.306
G = Gly	55	7.639
H = His	13	1.806
I = Ile	23	3.194
K = Lys	11	1.528
L = Leu	57	7.917
M = Met	14	1.944
N = Asn	30	4.167
P = Pro	55	7.639
Q = Gln	34	4.722
R = Arg	52	7.222
S = Ser	37	5.139
T = Thr	45	6.250
V = Val	49	6.806
W = Trp	16	2.222
Y = Tyr	32	4.444
Z = Glx	0	0.000
A + G	140	19.444
S + T	82	11.389
D + E	81	11.250
D + E + N + Q	145	20.139
H + K + R	76	10.556
D + E + H + K + R	157	21.806
I + L + M + V	143	19.861
F + W + Y	79	10.972

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase während einer Enzymkatalyse, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym mit mindestens einem Thiol in Kontakt gebracht wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Glutarylamidase an einen polymeren Träger gekoppelt ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als polymerer Träger ein oxiranaktiviertes Polyacrylat verwendet wird.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche nach 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiol 2-Mercaptoethanol verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von 2-Mercatoethanol im Reaktionsansatz im Bereich 1 bis 100 mM liegt.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche nach 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiol Cystein verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Cystein im Bereich 1 bis 100 mM liegt.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Enzymkatalyse mindestens ein Thiol kontinuierlich in der Substratlösung vorliegt.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym nach dessen Abtrennung von der Substratlösung mit mindestens einem Thiol in Kontakt gebracht wird.

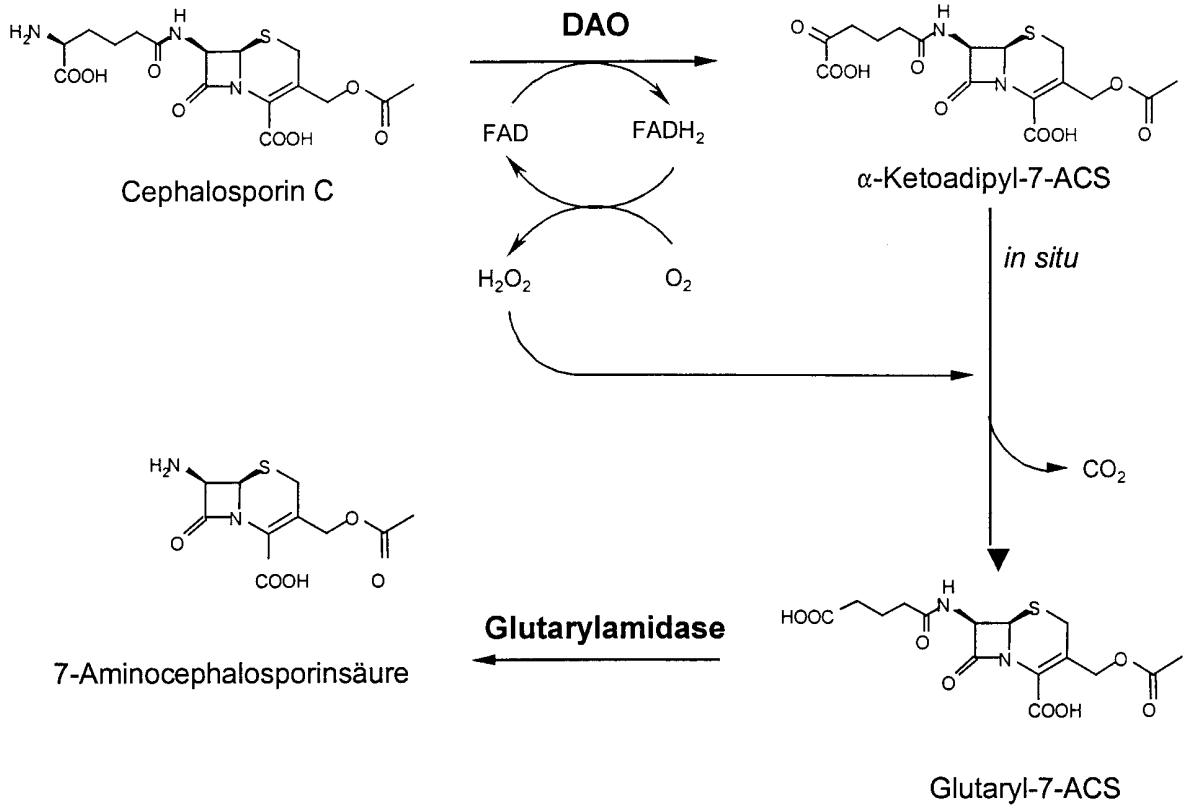
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Glutaryl-7-Aminocephalosporinsäure als Substrat der Enzymkatalyse verwendet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass Glutaryl-7-Aminocephalosporinsäure im Konzentrationsbereich 5 bis 500 mM verwendet wird.

12. Verfahren zur Herstellung von 7-Aminocephalosporinsäure unter Verwendung von Glutarylamidase als Enzymkatalysator, dadurch gekennzeichnet, dass die Desaktivierung der Glutarylamidase mittels eines Verfahrens gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 verzögert wird.

13. Verwendung von mindestens einem Thiol in einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 zur Verzögerung der Desaktivierung von Glutarylamidase.

Fig.1: Reaktionsschema zur enzymatischen Synthese von 7-ACS



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 00/04337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P35/02 C12N9/80

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P. GOLINI ET AL.: "Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 17, no. 4, April 1995 (1995-04), pages 324-329, XP000925668 cited in the application page 324, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 325, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 3 page 325, right-hand column, paragraph 6 page 325, right-hand column, last paragraph -page 326, right-hand column, paragraph 7; figure 2 page 328, left-hand column, paragraph 2; figure 6 --- -/--	1-13

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 July 2000	02/08/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/04337

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EZIO BATTISTEL: "Purification and stability of Glutaryl-7-ACA acylase from Pseudomonas sp." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 69, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 53-67, XP000925667 page 57, paragraph 2 page 60, paragraph 2 page 63, last paragraph -page 65, paragraph 1 ---	1-13
A	ES 2 093 555 A (ANTIBIOTICOS, S.A.) 16 December 1996 (1996-12-16) column 1, line 30 -column 2, line 15 column 3, line 29 - line 67 column 6, line 1 - line 59 column 8, line 68 -column 9, line 19 -----	1-13

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/04337

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2093555 A	16-12-1996	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/04337

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P35/02 C12N9/80

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	P. GOLINI ET AL.: "Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Bd. 17, Nr. 4, April 1995 (1995-04), Seiten 324-329, XP000925668 in der Anmeldung erwähnt Seite 324, rechte Spalte, Absatz 2 - Absatz 3 Seite 325, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, Absatz 3 Seite 325, rechte Spalte, Absatz 6 Seite 325, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 326, rechte Spalte, Absatz 7; Abbildung 2 Seite 328, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 6 --- -/--	1-13

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
26. Juli 2000	02/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Montero Lopez, B

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/04337

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EZIO BATTISTEL: "Purification and stability of Glutaryl-7-ACA acylase from Pseudomonas sp." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 69, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 53-67, XP000925667 Seite 57, Absatz 2 Seite 60, Absatz 2 Seite 63, letzter Absatz -Seite 65, Absatz 1 ---	1-13
A	ES 2 093 555 A (ANTIBIOTICOS, S.A.) 16. Dezember 1996 (1996-12-16) Spalte 1, Zeile 30 -Spalte 2, Zeile 15 Spalte 3, Zeile 29 - Zeile 67 Spalte 6, Zeile 1 - Zeile 59 Spalte 8, Zeile 68 -Spalte 9, Zeile 19 -----	1-13

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/04337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
ES 2093555 A	16-12-1996	KEINE	