

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

**AT 408 449 B**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1507/97  
(22) Anmeldetag: 09.09.1997  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.04.2001  
(45) Ausgabetag: 26.11.2001

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12P 35/06**

(56) Entgegenhaltungen:  
JP 5-68551 (FUJISAWA, 1993)  
WO 90/12110A1 (BIOPURE, 1990)

(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 HYDROLYSEVERFAHREN ZUR UMSETZUNG VON GLUTARYL-7-AMINOCEPHALOSPORANSÄURE ZU 7-AMINOCEPHALOSPORANSÄURE**

(57) Die Erfindung betrifft ein verbessertes enzymatisches Verfahren zur Hydrolyse von Glutaryl-7-aminocephalosporansäure zu 7-Aminocephalosporansäure, bei dem eine Glutarylacylase-haltige Mischung verwendet wird, deren Esteraseaktivität deaktiviert wurde.

**AT 408 449 B**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes enzymatisches Verfahren zur Hydrolyse von Glutaryl-7-aminocephalosporansäure (= GI-7-ACA) zu 7-Aminocephalosporansäure (= 7-ACA). Dabei wird GI-7-ACA in wäßriger Lösung von einer Glutarylacylase-haltigen Mischung (= GAC-haltige Mischung) zu 7-ACA umgesetzt. Die GAC-haltige Mischung wird aus rekombinantem *Escherichia coli* CCM 4229 bereitete, wobei die eingesetzten Bakterien durch das beschriebene Verfahren von störender O-Acetyl-Cephalosporin-C-Esteraseaktivität befreit werden, ohne daß dabei die GAC-haltige Mischung an Hydrolyseaktivität verliert. Unter Beibehalten einer hohen Ausbeute kann daher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren 7-ACA mit sehr guter Qualität erzeugt werden.

7-ACA dient als Grundsubstanz zur Herstellung von Cephalosporin-Antibiotika und wird derzeit aus Cephalosporin C (= Ceph-C) nach einem vielstufigen nichtenzymatischen Verfahren gewonnen. Für die enzymatische Gewinnung wird ein zweistufiges Verfahren benutzt, in dem durch eine D-Aminosäureoxidase die Umsetzung von Ceph-C mit Sauerstoff zur thermisch instabilen  $\alpha$ -Keto-adipoyl-7-aminocephalosporansäure und Wasserstoffperoxid katalysiert wird, welche zu GI-7-ACA und CO<sub>2</sub> weiterreagieren. GI-7-ACA ist eine relativ stabile Substanz, die sich als Feststoff isolieren läßt. In der zweiten Stufe katalysiert eine GAC die Spaltung in Glutarsäure und 7-ACA, welches wiederum leicht als Feststoff isoliert werden kann.

Bei Einsatz GAC-haltiger Mischungen zur Spaltung von GI-7-ACA führt die Bildung unerwünschter Nebenprodukte zur Qualitäts- und Ausbeuteminderung. Nichtenzymatische Reaktionen können dabei durch die Wahl geeigneter Bedingungen minimiert werden. Der Nebenproduktbildung durch enzymatische Verunreinigungen kann mit verschiedenen Maßnahmen begegnet werden. So läßt sich die GAC-haltige Mischung aus einer zuvor durch Kristallisation gereinigten Acylase bereiten (Binder et al., Appl. Environ. Microbiol. 60, 1805-1809; 1994). Der Einsatz gereinigter Acylase, die auf einem Träger gebunden wird, ist bereits zur technischen Reife gediehen (Conlon et al., Biotechnol. Bioeng. 46, 510-513; 1994; Tischer et al., Ann. N. Y. Acad. Sc. 672, 502-509; 1992).

Mit den bekannten Methoden verbinden sich jedoch einige Nachteile; insbesondere ist die erreichte Beseitigung der Esteraseaktivität nicht vollständig.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes enzymatisches Hydrolyseverfahren zur Umsetzung von GI-7-ACA in 7-ACA, wobei eine wäßrige Lösung von GI-7-ACA mit einer GAC-haltigen Mischung in Kontakt gebracht wird und die GAC-haltige Mischung frei von Esteraseaktivität ist. Die Inhibierung der Esteraseaktivität wird dabei durch die Inkubation von immobilisierten bzw. nicht immobilisierten permeabilisierten oder teilweise zerstörten Zellen, zellfreien Extrakten und teilweise aufgereinigten zellfreien Extrakten mit Phenyl-methansulfonsäurefluorid (= PMSF) in wäßriger Lösung erreicht. Die Esteraseaktivität wird dabei überraschenderweise vollständig zerstört, ohne daß die Hydrolyseaktivität 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 GAC-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 GAC-haltigen Mischung sehr gute 7-ACA-Ausbeuten hoher Qualität.

Nach der vorliegenden Erfindung wird GI-7-ACA als wäßrige Lösung verwendet. Bevorzugt wird die GAC-haltige Mischung aus *E. coli*-Zellen gewonnen. Nach der 1-10%igen Zugabe von ethanolischer PMSF-Lösung (10 g PMSF/1000 ml Ethanol) in die neutral gepufferte GAC-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 Hydrolyseaktivität. Die so gewonnene GAC-haltige Mischung wird dann in einer wäßrigen Reaktionslösung mit GI-7-ACA suspendiert. Die Reaktion kann im neutralen pH-Bereich bei 10-30°C durchgeführt werden. Ihr Verlauf wird mit HPLC verfolgt, sodaß bei Erreichen einer zufriedenstellenden 7-ACA-Ausbeute die Reaktion abgebrochen werden kann. Die gewonnene 7-ACA kann durch übliche Methoden gereinigt oder aber direkt zu weiteren Verarbeitung als Lösung eingesetzt werden.

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):**

10 g feuchtes Zellpellet des rekombinanten E.-coli-Stammes CCM 4229 (720 U Acylase = 100 %) werden aus deren Fermentationsbrühe geerntet, gewaschen und in 50 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 aufsuspendiert. Zu dieser Suspension werden 0,5 ml ethanolischer Lösung mit 10 mg PMSF/ml gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Aktivität der Zellsuspension wird danach mit 708 U Acylase (= 98 %) bestimmt. 10 g GI-7-ACA werden in 1000 ml Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 8.2 gestellt. Die PMSF-behandelte E.-coli-Suspension wird dazugegeben und die Mischung unter pH-Statisierung 180 Minuten bei 12° gerührt. Die danach erreichte 7-ACA-Menge entspricht 93% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge. Die Summe der Desacetylierungsderivate ist mit 3% bezogen auf die GI-7-ACA-Ausgangsmenge identisch mit der Anfangsmenge.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine 7-ACA-Menge erreicht, die 90% der Ceph-C-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 6% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge.

**Beispiel 2 (Zellhomogenat):**

10 g feuchtes gewaschenes Zellpellet des rekombinanten E.-coli-Stammes CCM 4229 (720 U Acylase) werden in 50 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert und bei 700 bar homogenisiert. Das Homogenat (752 U Acylase = 100 %) wird in der gleichen Weise mit ethanolischer PMSF-Lösung versetzt wie unter Beispiel 1 beschrieben. Danach wird eine Aktivität von 768 U (=102 %) bestimmt. Das so gewonnene Zellhomogenat wird statt der Zellsuspension, wie unter Beispiel 1 beschrieben, in eine GI-7-ACA-Lösung gegeben. Die danach erreichte 7-ACA-Menge entspricht 89% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge. Die Summe der Desacetylierungsprodukte ist mit 3% bezogen auf die GI-7-ACA-Ausgangsmenge identisch mit der Anfangsmenge.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine 7-ACA-Menge erreicht, die 83% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 6% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge.

**Beispiel 3 (Enzympräparation, Enzymimmobilisation I):**

Zellhomogenat des rekombinanten E.-coli-Stammes CCM 4229 aus 10 g feuchtem gewaschenen Zellpellet (7350 U Acylase) in 50 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 wird mit 1 ml Sedifloc CL 900-18/40 versetzt, mit Essigsäure auf pH 5.2 gestellt und für eine Stunde bei 40° unter Rühren inkubiert. Die so entstandene Koagulations suspension wird bei 10°C für eine weitere Stunde weiter gerührt, anschließend durch Zentrifugation geklärt und auf pH 7.5 gestellt. Der klare GAC-haltige Überstand (6150 U Acylase = 100 %) wird, wie unter Beispiel 1 beschrieben, mit PMSF-Lösung versetzt und inkubiert. Danach wird eine Aktivität von 6220 U Acylase (= 101 % des Koagulationsüberstandes) bestimmt. Die so entstandene Enzympräparation wird mit 10 g Eupergit C und 50 ml 1 M Natriumsulfatlösung versetzt und unter Schütteln 64 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das enzymladene Trägermaterial von der Immobilisationslösung getrennt und, wie unter Beispiel 1 beschrieben, mit GI-7-ACA-Lösung in Kontakt gebracht. Die Summe der Desacetylierungsprodukte ist mit 3% bezogen auf die GI-7-ACA-Ausgangsmenge identisch mit der Anfangsmenge.

Beim entsprechenden Parallelexperiment ohne PMSF-Einsatz wird dagegen nur eine 7-ACA-Menge erreicht, die 83% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge entspricht, und die Summe der Desacetylierungsprodukte beträgt 6% der GI-7-ACA-Ausgangsmenge.

**Beispiel 4 (Enzymimmobilisation II):**

GAC-haltiger Koagulationsüberstand wird wie unter Beispiel 3 beschrieben, immobilisiert, wobei die PMSF-Inkubation nicht mit dem Koagulationsüberstand sondern während der Immobilisation durchgeführt wird, indem 1 ml der unter Beispiel 1 verwendeten PMSF-Lösung der Enzym-Träger-Suspension zugesetzt wird. Der Einsatz des so gewonnenen Immobilisates in GI-7-ACA-

Lösung wie unter Beispiel 1 bringt ein Ergebnis, das zum Ergebnis von Beispiel 3 identisch ist.

#### **Beispiel 5 (Enzymimmobilisation II):**

GAC-haltiger Koagulationsüberstand wird wie unter Beispiel 3, jedoch ohne PMSF-Behandlung, hergestellt (5830 U Acylase) und mit 40 g Relite Diaion-HPA25L versetzt, auf pH 7.5 eingestellt und 300 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der gewaschene Katalysator (1865 U Acylase = 100%) wird anschließend in 200 ml 50 mM Phosphatpuffer suspendiert und mit dem Zusatz von 2 ml der unter Beispiel 1 verwendeten PMSF-Lösung 180 Minuten unter Rührung inkubiert. Die Gesamtaktivität des Katalysators beträgt dann 1810 U Acylase (= 97% des unbehandelten Katalysators).

Danach wird dieser Katalysator wie unter Beispiel 1 mit GI-7-ACA-Lösung in Kontakt gebracht. Die Summe der Desacetylierungsprodukte ist mit 3% bezogen auf die GI-7-ACA-Ausgangsmenge identisch mit der Anfangsmenge.

#### **PATENTANSPRÜCHE:**

1. Enzymatisches Hydrolyseverfahren zur Umsetzung von Glutaryl-7-aminocephalosporansäure zu 7-Aminocephalosporansäure, wobei eine wäßrige Lösung von Glutaryl-7-aminocephalosporansäure mit einer Glutarylacylase-haltigen Mischung in Kontakt gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-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 Glutarylacylase-haltigen Mischung bei Phenylmethansulfonsäurefluorid-Konzentrationen von 5-10000 ppm durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-haltige Mischung aus immobilisierten oder nicht immobilisierten Zellen oder immobilisierten und nicht immobilisierten zellfreien Extrakten und teilweise aufgereinigten Zellextrakten erhalten wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-haltige Mischung aus permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen erhalten wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-haltige Mischung durch die Inkubation mit Phenylmethansulfonsäurefluorid vor, während oder nach der Immobilisierung von ganzen Zellen oder Zellextrakten gewonnen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-haltige Mischung von rekombinanten E. coli erhalten wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glutarylacylase-haltige Mischung von rekombinanten E. coli des Stammes CCM 4229 erhalten wird.

#### **KEINE ZEICHNUNG**