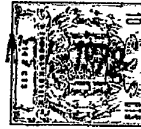


408867

PATENTE DE INVENCION

Le A 14 043-Sp.

22



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINACILASA
LIGADA COVALENTEMENTE A UN MATERIAL SOPORTE.

Solicitante BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente
en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

Int. Cl.: C 08 F, 107B

El invento se refiere a un procedimiento para la obtención de penicilinacilasa ligada a un material soporte que se emplea para el desdoblamiento hidrolítico de penicilinas al objeto de producir ácido 6-aminopenicilánico (6-APS).

5.

408861

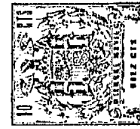


5. Es conocido que en algunas clases de microorganismos se forma la enzima penicilinacilasa (P.A.), (E.C.3.5.1.11), cuya acción sobre penicilinas, por ejemplo penicilina-G, conduce a un desdoblamiento hidrolítico de la agrupación de carbonamida en la posición lateral, sin producir una apertura simultánea del anillo de β -lactama. En la acción de esta enzima se basa el procedimiento de la Patente alemana No. 1.111.778 (R.F.A) para la producción de 6-APS a partir de penicilina G. En la producción actual a gran escala industrial, se aplica una masa fangosa de bacterias, preferiblemente de E.coli.

Ese método tiene las siguientes desventajas:

15. a) La masa fangosa de bacterias, además de la P.A. intracelular, contiene proteínas y enzimas ulteriores, así como componentes del medio de cultivo o sus productos de transformación que se formaron en la fermentación. Estas impurezas, en la elaboración, no pueden ser eliminadas totalmente por lavado del 6-APS cristalizado.
20. b) En el procedimiento técnico, la masa fangosa de bacterias puede ser aplicada una vez solamente.
- c) La masa fangosa de bacterias contiene impurezas y otras enzimas que inactivan la penicilina G y/o el 6-APS por apertura del anillo de β -lactama.
25. d) La masa fangosa de bacterias contiene tan solo pequeñas cantidades de P.A. La aplicación de mayor cantidad de material de enzima, por ejemplo para lograr tiempos cortos de reacción y con ellos mejores rendimientos en 6-APS con menor contenido de productos de descomposición es prácticamente imposible.
30. e) Los rendimientos de 6-APS dependen de la formación

403861



- variable de P.A. en las respectivas preparaciones de fermentación.
5. f) La separación total de las células de las bacterias requiere en la elaboración de las preparaciones de 6-APS una etapa operativa adicional que implica pérdidas de rendimiento.
- Para la eliminación de impurezas en forma de proteínas capaces de provocar reacciones productoras de alergia son necesarias etapas posteriores de purificación (Patentes británicas Nos. 1.169.696, 1.078.847, 1.114.311; Patente alemana Acta No. 1.909.915 publicada no examinada).
10. Constituye ahora el objeto de la invención un proceso para preparar una penicilinacilasa (P.A.) ligada a un material soporte, entrando en consideración, como soporte, copolimerizados de acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida y ácido maléico, a los cuales la enzima está ligada covalentemente.
15. Proteínas insolubles fijadas a un material soporte, con actividad biológica, fueron descritas por primera vez, en la Patente norte-americana No. 3.167.485. Son conocidos experimentos de ligar covalentemente penicilinacilasa a un soporte polímero y de aplicarla para la producción de 6-APS (Patentes alemanas publicadas no examinadas Nos. 1.917.057, 1.907.365, 1.933.301). Esos métodos hasta ahora conocidos para la producción de penicilinacilasa insoluble, sin embargo, no son satisfactorios, en vista de que la enzima, bajo las condiciones de la copulación pierde una gran parte de la actividad biológica
20. o de que llega a ser ligado menos de un 50 % de proteína.
- 25.
- 30.

40886A



5. Si bien rendimientos de 50 a 60 % de penicilina-
nasilasa ligada a un material de soporte pueden ser conse-
guidos según la Patente alemana publicada no examinada No.
1.917.057, si como soporte polímero se aplica un polímero
lineal de anhídrido de ácido etilenmaléico (resina EMA).
El polímero empleado, sin embargo, es muy desuniforme y
es hidrosoluble después de la hidrólisis de los grupos de
anhídrido de ácido carboxílico a un valor pH neutro o al-
calino. Recién por la ligadura con la enzima, otras di- o
10. poliaminas que son ligadas como comonomeros en varios pun-
tos, llega a ser reticulado transversalmente y, de esta
manera, insoluble en agua. Las fracciones de bajo peso
molecular y en parte hidrosolubles no pueden ser separa-
das. Por esta razón, se pierde proteína ligada como mate-
15. rial soluble. Además, por mayores concentraciones de pro-
teína, la resina EMA llega a ser reticulada tan fuerte-
mente que es accesible tan solo en parte para el substra-
to penicilina.

20. En las Patentes alemanas publicadas no exami-
nadas Nos. 1.908.290 y 1.935.711, se describen copolime-
rizados fuertemente hinchables a partir de acrilamida,
ácido maléico, N,N'-metilenbisacrilamida. Estos polimeri-
zados debilmente reticulados permiten una ligadura cuida-
dosa de la proteína, con tal resultado que quedan conser-
25. vadas la estructura de la proteína y con ella la activi-
dad enzimática después de la ligadura. Los grupos amino
de enzimas reaccionan con los grupos anhídrido del poli-
merizado. Pero, dado que tanto por solvólisis, como tam-
bién simultáneamente con la formación de amida de ácido
30. carboxílico, se forman grupos carboxilos libres, la pro-

408861



5. teina puede ser ligada no solamente covalente-, sino también heteropolarmente. Así, en la Patente alemana publicada no examinada No. 1.935.711, se indican condiciones de las cuales ha de desprenderse que llega a ser ligado como máximo un 50 % de tripsina covalentemente y un 50 % heteropolarmente. La proporción heteropolarmente ligada de la enzima, sin embargo, durante las reacciones posteriores a concentraciones de sal y valores pH que cambian, llega a ser desligada, reduce el rendimiento en enzima ligada y
10. contamina el producto.
- De acuerdo con el invento, es posible evitar las mencionadas desventajas, por la razón de que según nuestra invención puede ser ligado covalentemente hasta un 98 % de penicilinacilasa.
15. La penicilinacilasa ligada según el invento covalentemente al material soporte, puede ser aplicada en un procedimiento a gran escala industrial para el desdoblamiento enzimático de penicilina. Después de cada aplicación, puede ser fácilmente recuperado por filtración o
20. centrifugación y empleada de nuevo.
- La producción del copolimerizado empleado según la invención, es efectuada por métodos en sí conocidos. Después de la copolimerización, la resina en forma de gel es apretada a través de un tamiz de una abertura
25. de malla de 0,5 mm, es lavada bien y es secada en vacío. El ácido dicarboxílico copolimerizado es transformado en el anhídrido de ácido dicarboxílico por calentamiento durante 2 horas a 180° C. No debe calentarse a 180° C. por un tiempo mayor de 2 horas, en vista de que entonces disminuye manifiestamente la capacidad de ligadura del copo-
- 30.

408861



limerizado.

5. La capacidad ligadora de proteína del copolimerizado es dependiente del número de grupos anhídridos existentes y del tamaño de los poros. En un producto más estrechamente reticulado, la capacidad de ligadura es menor que en el caso de polímeros de reticulación menos estrecha. A causa de una menor reticulación, sin embargo, aumenta la capacidad de hinchar del polimerizado, reduciéndose al mismo tiempo la resistencia al frotamiento.

10. Para la ligadura covalente de la penicilinacilasa, se preparó preferiblemente un polimerizado a partir de 45 partes de acrilamida, de 3 partes de N,N'-metilén-bisacrilamida y de 15 partes de ácido maléico. Los grupos amino de la penicilinacilasa reaccionan con los grupos anhídrido del polimerizado a valores pH de 5,0 a 6,5, preferiblemente a un pH de 5,8. Dado que por solvólisis de los grupos anhídrido cíclicos se forma un intercambiador de cationes debilmente ácido, el valor pH de la mezcla de reacción disminuye lentamente, si a ésta no se

15. agrega continuamente una solución diluida de álcali. El

20. empleo de un regulador del pH es ventajoso. Las condiciones especiales de reacción son de gran importancia para el rendimiento de penicilinacilasa ligada. El rendimiento es severamente dependiente del pH. Así, son ligados al pH

25. de 5,8 98 %, al pH de 6,5 45 % y al pH de 4,5 tan solo 22 %.

30. La temperatura de reacción es también de importancia. Debe ser en lo posible baja. A temperaturas más elevadas, la hidrólisis de los grupos anhídrido cíclicos se desarrolla con mayor velocidad que la amonólisis.



De preferencia, se trabaja a $\pm 4^{\circ}$ C.

5. La copulación es dependiente, además, de la fuerza iónica; se la lleva a cabo preferiblemente en una solución amortiguadora de baja fuerza iónica. A elevadas concentraciones del amortiguador el polimerizado se encoge, de modo que la enzima puede penetrar y reaccionar más lentamente en la matriz del polímero. Preferiblemente se emplea un amortiguador de fosfato 0,01 a 0,05-molar. Después de la copulación, la penicilinacilasa ligada al soporte es aislada por filtración y lavada intensivamente con agua y una solución, 1-molar de sal común.

10. Por gramo de enzima se aplican por lo menos 10 g. de copolímero. De éste se agregan aproximadamente 3 a 4 g. a la solución de la enzima en 250 ml de amortiguador de fosfato 0,05-molar, pH = 5,5, se agita intensivamente y al cabo de 2 horas, se agrega el copolimerizado restante en porciones pequeñas. Durante todo el tiempo de reacción, se mantiene el valor pH constante por adición de lejía de sosa diluída. Si la capa acuosa superior al cabo de 5 horas aún contiene enzima no reaccionada, se agrega copolimerizado ulterior. Por lo general, una proporción de 1 parte de enzima a 15 - 20 partes de copolimerizado es suficiente para una reacción completa.

15. La penicilinacilasa ligada a un material soporte según la invención, puede ser almacenada sin pérdida de eficacia enzimática.

20. Para la determinación de la actividad enzimática de la penicilinacilasa ligada a un material soporte, se somete a la incubación a 37° C. una solución con 30000 IU/ml de penicilina G-potasio. El ácido fenilacético li-

30.



408861

5. berado es valorado al valor pH mantenido constante a 7,8 con lejía de sosa n/10. Una unidad de enzima (E) es la actividad que bajo estas condiciones desdobra por minuto 1 μ mol de penicilina G en 6-APS y ácido fenilacético y en esto consume 1 μ mol de lejía de sosa.

Los siguientes ejemplos explican la invención:

Ejemplo 1

Producción del copolimerizado:

10. a) 450 g. de acrilamida, 22,5 g. de N,N'-metilenbisacrilamida y 150 g. de ácido maléico se disuelven en 3500 ml de amortiguador de fosfato 0,05-molar, pH = 7,6 y bajo gas protector N₂ se mezcla la solución con 150 ml de una solución acuosa al 5 % de nitrilo de ácido propiónico y con 150 ml de una solución al 5 % de peroxidisulfato de amonio. Se calienta la mezcla de reacción a 80° C.,
15. entonces se la guarda durante 15 horas a la temperatura ambiente y se la aprieta a través de un tamiz de la abertura de malla de 0,5 mm. Después de un lavado cuidadoso con agua, el polimerizado es liofilizado y es calentado
20. durante 2 horas a 180° C. en vacío a 20 ml Hg.

De acuerdo con el Ejemplo 1 a), pueden producirse otros copolimerizados, por ejemplo a partir de:

25. b) 450 g. de acrilamida,
30 g. de N,N'-metilenbisacrilamida y
150 g. de ácido maléico;
- c) 450 g. de acrilamida,
45 g. de N,N'-metilenbisacrilamida y
150 g. de ácido maléico;
30. d) 450 g. de acrilamida,
45 g. de N,N'-metilenbisacrilamida y

408861



- 75 g. de ácido maléico;
- e) 450 g. de acrilamida,
- 135 g. de N,N'-metilenbisacrilamida y
- 150 g. de ácido maléico.

5. Los polimerizados son elaborados ulteriormente como se ha indicado en el Ejemplo 1a.

Ejemplo 2

Penicilinacilasa ligada a un material soporte

- 10. a) Se disuelve 1,0 g. de penicilinacilasa de una actividad enzimática específica de 15 E/mg (unidades/mg) en 200 ml de un amortiguador 0,01-molar, pH = 5,8 y a 4° C. bajo agitación se mezcla la solución en el transcurso de 5 horas con pequeñas porciones de en total 15 g. del copolimerizado preparado según el Ejemplo 1a. Se mantiene el valor pH constante a 5,8 con NaOH diluido. Al cabo de 24 horas a 4° C. se filtra y lava con 300 ml de agua. La enzima húmeda ligada al soporte (300 g. hinchada) tiene una actividad específica de 0,049 E/mg. Rendimiento de penicilinacilasa covalentemente ligada: 98 %.
- 15. b) 15 g. del copolimerizado preparado según el Ejemplo 1 b), se hacen reaccionar como se ha detallado en el Ejemplo 2 a) con 1 g. de penicilinacilasa (15 E/mg); rendimiento: 290 g. de enzima húmeda ligada al soporte con una actividad de 0,044 E/mg. Rendimiento de penicilinacilasa covalentemente ligada: 85 %.
- 20. c) 15 g. del copolimerizado producido según el Ejemplo 1 c), se hacen reaccionar como se ha detallado en el Ejemplo 2 a) con 1 g. de penicilinacilasa (15 E/mg); rendimiento: 295 mg. de enzima húmeda ligada al soporte con una actividad de 0,039 E/mg. Rendimiento de penicili-
- 25.
- 30.

400861



nacilasa covalentemente ligada: 77 %.

5. d) 15 g. del copolimerizado producido según el Ejemplo 1 d), se hacen reaccionar como se ha descrito en el Ejemplo 2 a) con 1 g. de penicilinacilasa (15 E/mg); rendimiento: 280 g. de enzima húmeda ligada al soporte con una actividad de 0,041 E/mg. Rendimiento de penicilinacilasa covalentemente ligada: 76,5 %.

10. e) 15 g. de copolimerizado preparado según el Ejemplo 1 e), se hacen reaccionar como se ha descrito en el Ejemplo 2 a) con 1 g. de penicilinacilasa (15 E/mg); rendimiento: 65 % de enzima húmeda ligada al soporte con una actividad de 0,146 E/mg. Rendimiento de penicilinacilasa covalentemente ligada: 63 %.

N O T A

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 23 de noviembre de 1971, bajo el número P 21 57 972.6; acogíndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINACILASA LI-GADA COVALENTEMENTE A UN MATERIAL SOPORTE; caracterizándose por lo siguiente:

30. 1.- Procedimiento para la producción de peni-

453861



5.

cilinacilasa ligada covalentemente a un material soporte, caracterizado porque un copolimerizado preparado a partir de acrilamida, N,N'-metilénbisacrilamida y ácido maléico, se transforma, por calentamiento en vacío, en el anhídrido y éste, a un pH de 5 - 6,5 y a temperaturas inferiores a 20° C., se pone en contacto, durante varias horas, con una solución acuosa de penicilinacilasa.

10.

2.- Procedimiento para la producción de penicilinacilasa ligada covalentemente a un material soporte, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 11 hojas escritas a máquina por una sola cara.

22 NOV 1972

Madrid,

15.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ ACEBU Y RUBIO
De los Ejecutores de la Gestión
[Handwritten signature]

[Handwritten signature]