

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**199897 B**

(51) Int CP

**C 12 N 9/90**

(22) Bejelentés napja: 1987.09.09. (22) (4023/187)

(30) Bejelentés elsőbbsége: US 1986.09.10. (905 601)

(40) Közzététel napja: 1988.03.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma  
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.03.28.

(72) Feltalálók:

Yeh Wu-Kuang, Dotzla Joe Edward,  
Greenwod, Indiana, US

(73) Szabadalmas:

Eli Lilly and Company, Indianapolis,  
Indiana, US

## **(54) Eljárás tisztított dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz enzim előállítására**

### **(57) KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás tisztított dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz enzim előállítására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy  
i) proteázgátlót, pH = 7,8 kémhatású puffert és GEDA-t tartalmazó sejtmentes, nyers vizes enzimkivonatot gyenge anioncserélő gyantára visszük, az enzimet GEDA-t tartalmazó kálium-klorid vagy nátrium-klorid, vagy Tris-HCl grádienssel eluáljuk, majd

ii) az i) lépésből származó, az enzimet tartalmazó eluátumot kereszt kötéses poliszaccharidgélén szűrjük, a gélt GEDA-val mossuk, és

iii) az ii) lépésből származó, az enzimet tartalmazó szűrletet hidroxilapatitra visszük és az enzimet GEDA-t tartalmazó kálium-foszfát grádienssel eluáljuk.

A GEDA jelentése: 5–15% glicerin vagy szaccharóz, 5–15% 1–3 szénatomszámú egyértékű alkohol, 1–20 mM koncentrációban szulfhidrilcsoportot tartalmazó redukálószer és 1–20 mM koncentrációban aszkorbát.

*A leírás terjedelme: 9 oldal, 4 dbra*

**HU 199897 B**

A találmány tárgya eljárás nagytisztaságú dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz előállítására.

A cefalosporin-C bioszintézisében a dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz (expandáz) végzi a penicillin-N gyűrű tágítását dezacetoxi-cefalosporin-C-t (DAOC) eredményezve. Ez utóbbit a DAOC-hidroxiláz dezacetil-cefalosporin-C-vé alakítja (DAC).

A dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz enzim részleges tisztítását *Cephalosporium acremonium*-ból és *Streptomyces clavuligerus*-ból végezték. Kupka, J. és munkatársai [FEMS Microbiol. Lett., 16: 1–6 (1983)], Scheidegger, A. és munkatársai [J. Antibiot., 37: 522–531 (1984)] az enzimet *C. acremonium*-ból tisztították, míg Jensen, S. E. és munkatársai [Antimicro. Agents Chemother., 24: 307–312 (1983)], valamint Jensen, S. E. és munkatársai [J. Antibiot., 38: 263–265 (1985)] a részleges tisztítást *S. clavuligerus*-ból végezték. A részleges tisztított enzim-preparátumokkal végzett vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a gyűrűtágítást (dezacetoxi-cefalosporin-C képzését) és a hidroxilálást (dezacetil-cefalosporin-C képzését) a prokarióta *S. clavuligerus*-nál két különböző enzim végzi, míg az eukarióta *C. acremonium*-nál egy, expandáz és hidroxiláz aktivitással rendelkező, bifunkcionális enzim.

A találmány eljárása szerint tisztított enzim expandáz és hidroxiláz aktivitással rendelkező bifunkcionális enzim.

Az ábrákon az alábbiakat mutatjuk be:

1A ábra: az enzimet tartalmazó nyers extraktum gyenge anioncserélő gyantán kapott kromatogramja,

1B ábra: a gyenge anioncserélő gyantáról kapott, az enzimet tartalmazó eluátum gélszűrővel nyert kromatogramja,

1C ábra: a gélszűrősnél nyert, az enzimet tartalmazó eluens hidroxipatiton kapott kromatogramja,

1D ábra: a hidroxipatiton végzett kromatográfia enzimet tartalmazó eluátumának FPL kromatogramja (FPLC: gyors protein folyadék-kromatográfia),

2A ábra: A penicillin-N átalakítása dezacetoxi-cefalosporin-C-vé az expandáz aktivitással és a dezacetoxi-cefalosporin-C átalakítása dezacetil-cefalosporin-C-vé a hidroxiláz aktivitással,

2B ábra: a dezacetoxi-cefalosporin-C átalakítása dezacetil-cefalosporin-C-vé,

3A ábra: az enzim expandáz aktivitásának HPLC kromatogramja,

3B ábra: az enzim hidroxiláz aktivitásának HPLC kromatogramja.

A találmány szerint a *Cephalosporium acremonium*-ból nyert enzimet gyenge anioncserélő gyantán kromatografálva, majd gélszűrővel és hidroxipatiton végzett kromatografálással tisztítjuk, majd további tisztítást végezhetünk erős anioncserélő gyantán történő kromatografálással. Az enzimet 95% körüli tisztasággal nyerjük ki, és ez az enzim mutatja a nyers enzimektraktum dezacetoxi-cefalosporin-C-t és dezacetil-cefalosporin-C-t termelő bifunkcionális aktivitását.

A kromatográfias tisztítás során a dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz stabilizálja a glicerinnél vagy szaccharózból, 1–3 szénatomszámú, egyértékű alkoholból, például etil-alkoholból, szulfhidrilcsoportot tartalmazó redukálószerből, például ditiotreitből és aszkorbátból (GEDA) álló közeg.

A találmány szerint a tisztított dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz olyan többlépéses kromatográfias folyamattal nyerjük, ahol a körülményeket úgy alakítjuk ki, hogy az enzim stabil marad.

Az így kapott tisztított enzim egy monomer protein, melynek gélszűrővel megállapított molekulatömege 43000-nek adódott. A nátrium-dodecil-szulfát/poliakrilamid gélelektroforézissel (SDP – PAGE) megállapított minimális molekulatömege: 41000. A tisztított dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz izoelektromos pontja:  $6,0 \pm 0,5$ . A tisztított enzim fajlagos aktivitása:  $0,2 - 0,8$  egység/mg.

Aminosavösszetételét az I. táblázatban mutatjuk be.

I. táblázat  
A dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz  
aminosavösszetétele

Aminosav	41000 Daltonra eső savmaradék száma
Asx (Asp + Asn)	37
Thr	24
Ser	26
Glx (Glu + Gln)	35
Pro	21
Gly	31
Ala	34
Val	32
Cys	6
Met	5
Ile	8
Leu	27
Tyr	10
Phe	20
His	6
Lys	17
Arg	29
Trp	3
Összesen	371

Amint azt az 5. ábra reakciófolyamatán bemutattuk, a tisztított expandáz/hidroxiláz enzim a penicillin-N-et dezacetoxi-cefalosporin-C-vé, ez utóbbit dezacetil-cefalosporin-C-vé alakítja.

A tisztított enzim egyaránt vas(II)-iont,  $\alpha$ -ketoglutársavat és oxigént igényel a penicillin-N-nek dezacetoxi-cefalosporin-C-vé, és a dezacetoxi-cefalosporin-C-nek dezacetil-cefalosporin-C-vé való átalakításához viszonyított aránya  $0,15 \pm 0,04$ .

A tisztított enzim mindkét funkcióját (expandáz és hidroxiláz) fokozza a reakciókeverékben jelenlevő ditiotreit, aszkorbát és az ATP. Az enzim expandáz és hidroxiláz aktivitását reverzibilisen reaktiválja a ditiotreit és az aszkorbát.

Az enzim mindkét funkcióját gátolja a cinkion és az 5,5'-ditio-bisz[2-nitro-benzoészav]. Mindkettőről ismert, hogy szulfhidrilcsoportokhoz kötődik, ezek szerint az enzim aktív állapotában egy vagy több szabad szulfhidrilcsoportot tartalmaz.

A találmány szerint tisztított enzimnél meghatároztuk néhány peptidfragmens aminosavsorrendjét. Cianogén-bromidos és tripszines hasítást követő fordított fázisú kromatográfiával az alábbi összetételű, 13 aminosavból álló fragmenst nyertük:

Ala-Val-Leu-Asn-Ser-Val-Gly-Ala-Pro-Leu-Ala-Gly-Gln.

Tripszines emésztést követő fordított fázisú HPLC-vel az alábbi sorrendű, 12, 8 és 7 aminosavból álló fragmenseket kapjuk:

Gly-Phe-Glu-Asp-Val-Trp-Glu-Asp-Tyr-Phe-Asp-Arg;

Val-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Leu-Arg;

Ala-Val-Thr-Leu-Ala-Asp-Arg.

A találmány eljárást nyújt dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz nagyfokú tisztaságban történő kinyerésére is. Az eljárás kulcsfontosságú jellemzője, hogy a többlépéses kromatográfia alatt stabilitást biztosít az enzimnek. A stabilitást úgy érjük el, hogy a tisztítást az alábbi anyagok jelenlétében végezzük: redukálószer, például  $\beta$ -merkapto-etanol, ditiotreit (DDT) vagy ditioeritreit és nátrium- vagy kálium-aszkorbát, mindkettő 1–20 mM koncentrációban; 5–15% 1–3 szénatomszámú, egyértékű alkohol, például metil-alkohol vagy etil-alkohol; 5–15% glicerin vagy szaccharóz. A tisztítási folyamat során maximális enzimstabilitást nyújtó előnyös összetételű elegy a következő: 10% (térf.) etil-alkohol, 10% (térf.) glicerin, 10 mM ditiotreit és 10 mM nátrium-aszkorbát. A stabilizációs elegyet a továbbiakban GEDA-ként rövidítjük. A GEDA nyilvánvaló szerepe, hogy redukált állapotban tartja az enzimet, azaz szabad szulfhidrilcsoportokkal rendelkezik, valamint hidrofób környezetet teremt az enzim számára, ami úgy látszik kedvez a maximális aktivitásának. Az eljáráshoz előnyösen frissen elkészített GEDA elegyet használunk. Az alábbiakban ismertetett eljárásban a GEDA elegyet pufferben, például pH = 7,5 kémhatású foszfát vagy Tris-HCl pufferben használjuk. A továbbiakban használt "GEDA puffer" kifejezés alatt ilyen puffert értünk.

A találmány szerinti tisztítási folyamatban az enzimet tartalmazó nyers sejtextraktumot GEDA jelenlétében pH = 7–8 kémhatású pufferben vesszük fel és proteáz inhibitorral kezeljük. A sejtextraktumot először gyenge anioncserélő gyantán kromatografáljuk, amit előzőleg GEDA pufferben ekvilibráltunk. A gyantáról az enzimet GEDA pufferben levő kálium-kloriddal, vagy nátrium-kloriddal vagy Tris-HCl-dal eluáljuk és a frakciók aktivitását HPLC-vel állapítjuk meg. Az aktivitási csúcsot tartalmazó frakciókat gélzűrésznek vetjük alá. Az így tovább tisztított enzimet hidroxipatiton (hidrált kalcium-foszfát) kromatografáljuk GEDA-ban kialakított kálium-foszfát grádienssel. A háromlépéses folyamat után az enzim a dodecil-szulfát/po-

liakrilamid elektroforézis (SDS-PAGE) szerint 80–85% tisztaságú.

Az enzimet az alábbiak szerint tisztíthatjuk tovább: az összegyűjtött eluátumot adott esetben szerin-proteáz-gátlóval kezeljük, majd gyors proteín folyadékromatográfiával (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) kromatografáljuk erős anioncserélő gyantán, az elucióhoz ismét a GEDA-ban kialakított kálium-klorid vagy Tris-HCl grádienszt használva. Az így nyert enzim 95% tisztaságú.

Az enzim aktivitását, ami tisztaságának kifejezője, aktivitás-egységekben (U) adjuk meg. Egy egységnyi dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz aktivitásnak tekintjük azt az enzimmennyiséget, mely a penicillin-N-ből egy perc alatt 1  $\mu$ mól dezacetoxi-cefalosporin-C-t és dezacetil-cefalosporin-C-t készít. Egy egységnyi hidroxiláz aktivitásnak tekintjük azt az enzimmennyiséget, mely ahhoz szükséges, hogy a dezacetoxi-cefalosporin-C-ből egy perc alatt 1  $\mu$ mól dezacetil-cefalosporin-C-t készítsen.

A találmány szerinti eljárást egy háromlépéses folyamatnak tekinthetjük. Az első lépésben a Cephalosporin acremonium friss sejtszuszpenziójából pH = 7–8 kémhatású pufferben, előnyösen pH = 7,5 kémhatású 50 mmólos Tris-HCl pufferben, GEDA jelenlétében ultrahangos feltárással elkészítjük az enzimet tartalmazó nyers sejt kivonatot. Az ultrahangos kezelés alatt szerin-proteáz-gátlót, például fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) vagy diizopropil-fluorofoszfátot (DFP) adunk a rendszerhez, hogy a sejtől kiszabaduló enzimet megvédjük. Az ultrahangos feltárást követően a sejtörmeléklet és más oldhatatlan részeket centrifugálással eltávolítjuk, és az így nyert felülőszót, ami az enzimet tartalmazza, nevezzük "nyers sejt kivonatnak".

Gyenge anioncserélő gyantát ekvilibrálunk GEDA pufferrel és rávisszük a nyers sejt kivonatot. A gyantát GEDA pufferrel, például GEDA-t tartalmazó pH = 7,5 kémhatású 15 mmólos Tris-HCl vagy nátrium- vagy kálium-foszfát pufferrel mossuk át. A mosott gyantáról az enzimet grádiens elucióval oldjuk le. A GEDA pufferben kialakított lineáris grádienszt 50 mM-től 600 mM-ig növekvő kálium-klorid vagy 15 mM-től 500 mM-ig növekvő Tris-HCl koncentrációval hozzuk létre. A frakciókat az alábbiakban ismertetett módon HPLC-vel analizáljuk. A 40 mM és 60 mM kálium-klorid koncentráció vagy a 80 mM és 100 mM tris-HCl koncentráció között lejövő frakciók tartalmazzák az expandáz aktivitás egy fő és két kis csúcsát. Az 1A ábrán szemléltetjük a gyenge anioncserélőn végzett tisztítás eredményeit.

Gyenge anioncserélő gyantaként használhatunk cellulóz-származékokat, mint például a kereskedelmi forgalomból beszerezhető dietil-amino-etil-cellulózt (DEAE-cellulóz, Whatman, Inc.) vagy akril kopolimer gyantákat, például az N-[tris(hidroxi-metil)metil]-akrilamid kopolimereket, mint amilyen a dietil-amino-etil-triszakril (DEAE-trisacryl LS, LKB Instruments Inc.), stb.

Az aktivitással rendelkező, a főcsúcsot kitevő frakciókat egyesítjük, és a folyamat második lépéseként gélszűrésnek vetjük alá.

Hogy ne kelljen nagy mennyiségű gélt használnunk, az egyesített frakció térfogatát előnyös csökkenteni, például ultraszűrővel, hogy kb. 50 mg/ml koncentrációjú proteinoldathoz jussunk.

A gélt előzőleg GEDA pufferben ekvilibráljuk, mielőtt az első lépésből származó egyesített frakciókat, vagy a betöményített proteinoldatot rávinnénk. A gélről az enzimet GEDA pufferrel mossuk le, és a frakciókat HPLC-vel analizáljuk. Az 1B ábrán mutatjuk be a 2. lépés, a gélszűrés eredményeit. A 2. lépéshez számos, a kereskedelemből beszerezhető kereszt kötéses poliszaccharid-gélt alkalmazhatunk. Így például használhatunk kereszt kötéses dextránokat, mint amilyen a Sephadex, kereszt kötéses agarózt, mint amilyen a Sepharose és kovalens kötött akril-dextránokat, mint amilyen a Sephacryl. Ezek a gyanták a Pharmacia, Inc., cégtől beszerezhetők.

A gélszűrés azon frakcióit, amelyeknek a fajlagos aktivitása legalább 0,3 egység/mg, egyesítjük, és a hidrált kalcium-foszfátra, például hidroxipatitra visszük. Ez a folyamat 3. lépése. A hidroxipatitot felhasználás előtt 20 mM kálium-

foszfátos GEDA pufferben ekvilibráljuk. Az enzimet vagy lépcsőzetes gradiens elucióval – 30, 40, 60, 80 és 100 mM kálium-foszfát eluenssel – vagy lineáris gradiens elucióval – a kálium-foszfát koncentrációját 20 mM-ról folyamatosan 100 mM-ra változtatva – oldjuk le. Az enzim egy főcsúcsban és néhány kis csúcsban jön létre. A főcsúcsot alkotó frakciókban a fajlagos aktivitás nagyobb, mint 0,500 egység/mg. A frakciókat egyesítjük vagy külön-külön használjuk. Adott esetben a frakciószedés vagy egyesítés után az enzimoldatot szerin-proteáz-gátlóval, például fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) kezeljük. A PMSF gátlószert általában 0,25 mM koncentrációban alkalmazzuk.

A nyers enzimkivonat elkészítését és a kromatográfiás folyamatokat tanácsos 0–10 °C közötti, előnyösen 4 °C hőmérsékleten végezni.

A háromlépéses tisztítási folyamatban nyert enzim tisztasága megfelelő a penicillin-N dezacetoxi-cefalosporin-C-ve és dezacetil-cefalosporin-C-ve való hatékony átalakítására.

Az 1C ábra mutatja a háromlépéses tisztítási eljárás eredményeit. A 3. lépés után az enzim általában 80–85%-os tisztaságú.

A II. táblázat mutatja az enzim tisztulását a nyers extraktumból kiindulva.

II. táblázat

A folyamat lépése	Össz-protein (mg)	Összaktivitás (egys.)	Összaktivitás (% kinyert)	Fajlagos aktivitás (egys/mg)	Tisztulási arány
nyers sejtkivonat	12500	485	100	0,039	1,0
gyenge anioncserélő krom. (1. lépés)	900	138	29	0,154	3,9
gélszűrés (2. lépés)	260	119	25	0,453	11,7
hidroxipatit (3. lépés)	90	57	12	0,633	16,2

Kívánt esetben az enzimet tovább tisztítjuk erős anioncserélő gyantán 95%-os tisztaságig. A hidroxipatitos kromatografálás főcsúcsának legmagasabb fajlagos aktivitású frakcióit (általában 0,8 egys/mg vagy magasabb) gyors protein folyadék kromatográfiával (FPLC) kromatografáljuk erős anioncserélő gyantán. Előnyös gyanta a Mono Q (Pharmacia, Inc.,) polimer anioncserélő gyanta. A gyantát előzetesen GEDA pufferben ekvilibráljuk, majd rávisszük a 3. lépés enzim tartalmazó frakcióját. Az enzimet 0-tól 0,4M koncentrációig növekvő kálium-kloriddal vagy nátrium-kloriddal vagy Tris-HCl gradienssel eluáljuk.

Az 1D ábra mutatja az FPLC aktivitási és proteinelució kromatogramját.

A tisztítási folyamat 1. lépését módosíthatjuk úgy, hogy a nyers sejtkivonatot előzetes tisztításnak vetjük alá gyenge anioncserélő gyantán. A szennyező proteinek például elválaszthatjuk úgy, hogy az enzimet GEDA-t tartalmazó 50 mM-os Tris-HCl pufferrel lemossuk a gyantáról. Ennél a koncentrációnál az enzim nem marad a gyantán, viszont a szennyező protein igen, és ezzel 1,6-szoros tisztítást érünk el. Az enzimet tartalmazó mosóeluent a fent ismertetett 1. lépés szerint gyenge anioncserélő gyantára visszük.

60

Folytatva a 3. lépéses folyamatot, a tisztítás kívánt esetben alkalmazott 4. lépését végezhetjük keresztkötéses poliszaccharid-típusú gyantán – például keresztkötéses agarózon, mint amilyen a DEAE Sepharose (Pharmacia, Inc.) – végzett kromatografálással. Előnyösen a 3. lépés nagy aktivitású frakcióit egyesítjük, és ezt visszük a gyantára. A gyantát GEDA pufferrel ekvilibrálnak és az enzimet lineáris gradiens elucióval eluáljuk GEDA pufferben a kálium-klorid vagy a nátrium-klorid koncentrációját 0,05 M-ről 0,6 M-ra emelve.

A találmány szerinti eljárással 0,2–0,8 egység/mg fajlagos aktivitású tisztított dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz nyerünk.

A folyamat egy példájában 600 g friss sejtből a fentiek szerint nyert nyers enzimmennyiséget 2,5x41 cm-es DEAE cellulóz oszlopon kromatografáljuk, amit előzőleg a GEDA pufferrel ekvilibrálnak. A gyantát először 0,05M kálium-kloridot tartalmaz GEDA pufferrel mossuk.

Az enzimet GEDA pufferben kialakított kálium-kloridos lineáris gradienssel eluáljuk, a kálium-klorid koncentrációját 0,04 M-ről 0,6 M-ra növelve, 10 milliliteres frakciókat gyűjtünk. Az áramlási sebesség 25 ml óránként. A frakciókat HPLC-vel analizáljuk az alábbiakban ismertetendő módon. Az enzim 0,04 és 0,06 M kálium-klorid koncentráció között jön le egy főcsúcsban és két mellécsúcsban. Az enzim összaktivitásának kb. 85%-a van a főcsúcsban.

A főcsúcs azon frakcióit, melyekben a fajlagos aktivitás nagyobb, mint 0,088 egység/mg, egyesítjük és ultraszűrővel betöménytjük. A koncentrátumot előzőleg GEDA pufferrel ekvilibrálnak

Sephacryl S-200 gyantán (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, USA) kromatografáljuk. Az aktivitást GEDA pufferrel eluáljuk az oszlopról, 10 milliliteres frakciókat gyűjtve 40 ml/óra áramlási sebesség mellett. A legalább 0,33 egység/mg fajlagos aktivitású frakciókat egyesítjük.

Az egyesített frakciókat előzőleg 20 mM kálium-foszfátos GEDA pufferben ekvilibrálnak hidroxipatiton kromatografáljuk. Az expandált lépcsős gradiens elucióval kromatografáljuk, elúensként 30, 40, 60, 80 és 100 mM kálium-foszfátos GEDA puffert használva. 15 ml/óra áramlási sebesség mellett 5 milliliteres frakciókat gyűjtünk. A dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz egy főcsúcsban és néhány mellécsúcsban jön le az oszlopról. A főcsúcs – mely az összaktivitás 80%-át tartalmazza – frakcióiban a fajlagos aktivitás 0,558 egység/mg értéknél magasabb.

A frakciókat proteázgátlóval, például fenil-metil-szulfonil-fluoriddal kezeljük. A gátlószer 0,25 mM koncentrációjú.

A nyers enzimpreparátumot különféle, cefalosporin-C-t termelő mikroorganizmusból nyerhetjük. Előnyösen a sejt kivonat elkészítéséhez olyan mikroorganizmusokat használunk, ami magas cefalosporin-C termelő képességgel rendelkezik. Alkalmos enzimmennyiség lehet a *Cephalosporium acremonium* (chrysogenum) ATCC 11550, *C. acremonium* (chrysogenum) ATCC 36225 és a *C. acremonium* (chrysogenum) ATCC 48277 törzsek. Ugyancsak alkalmas enzimmennyiség az ismert cefalosporin-C termelő *Streptomyces clavuligerus*.

A tisztított enzim (3. lépés) expandáz, illetve hidroxiláz tevékenységének optimális körülményeit foglaljuk össze a III. táblázatban.

### III. táblázat

#### Az enzimtevékenység optimális körülményei

Reakciókörülmények	aktivitás	
	expandáz	hidroxiláz
pH optimum	7,5 – 7,8	7,3
hőmérséklet optimum (°C)	26 – 34	36 – 38
[Fe <sup>2+</sup> ] minimális telítettség (μM)	50	50
maximális reaktiváció/ stimuláció		
ditiotritel (1,0 mM)	0-ról 50-re	0-ról 0,23-ra
aszorbáttal (0,25 mM)	0-ról 90-re	0-ról 0,81-re
ATB-vel (0,05 mM)	38-ról 52-re	0,57-ről 0,61-re

\*megadva a kezdeti és végső aktivitás; egység x 10<sup>-3</sup>

A tisztított enzim bifunkcionalitása következtében a penicillin-N-et dezacetoxi-cefalosporin-C-ve és dezacetil-cefalosporin-C-ve alakítja át 60 perces reakció alatt. A DAOC + DAC/penicillin-N sztöchiometrikus aránya 1:1.

Hasonlóképpen, a tisztított enzim 60 perces reakció alatt kvantitatíve átalakította a dezacetoxi-cefalosporin-C-t dezacetil-cefalosporin-C-vé, megerősítve az 1:1 sztöchiometrikus arányt.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz instabilitása miatt, ezt megelőzően nem kapták meg az enzimet tisztított állapotban. Mint már fentebb említettük, a találmány eljárást nyújt az enzim tisztítására, melynek lényege, hogy a kromatográfias lépéseket GEDA jelenlétében végezzük és ezzel stabilizáljuk az enzimet a tisztítási folyamat alatt.

A GEDA jelenlétében tisztított enzim a harmadik lépés után, további tisztítás nélkül 4 °C hőmérsékleten 4 napig tartva aktivitásának 96%-át, 7 napig tartva, aktivitásának 87%-át őrzi meg. A találmány szerint tisztított enzimet későbbi felhasználáshoz GEDA pufferben tároljuk -70 °C hőmérsékleten.

A találmány lehetőséget nyújt a dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz enzim stabilizálására is. Ez abból áll, hogy a pH = 7-8 kémhatású enzimoldatot vagy szuszpenziót glicerint vagy szaccharózt, 1-3 szénatomszámú egyértékű alkoholt, szulfhidrilsoporttal rendelkező redukálószerrel és aszkorbátot tartalmazó eleggyel keverjük össze. A közegben a koncentrációk a következők: szaccharóz 5-15% (tömeg); glicerint és az 1-3 szénatomszámú alkohol mindegyike 5-15% (térfogat); a szulfhidrilsoportot tartalmazó redukálószer és az aszkorbát végkoncentrációja egyaránt 1 mM-20 mM. Az enzimpreparátumot az ismertetett elegyben -70 °C és 5 °C közötti hőmérsékleten tartjuk.

Az enzim vizes oldata vagy szuszpenziója lehet a nyers sejt kivonat, egy részlegesen tisztított vagy a találmány eljárása szerint tisztított enzimpreparátum. Az enzim nyers sejt kivonatát előnyös szerinproteáz-inhibitorral, például fenilmetil-szulfonil-fluoriddal vagy diizopropil-fluoroszulfáttal is kezelni.

Az aszkorbátot az aszkorbinsav egy sóját, például a nátrium- vagy káliumsóját értjük.

Előnyösebb a szaccharóz helyett glicerint használni és az etil-alkohol előnyösebb a metil-alkoholnál. Mindkettőt előnyös 10%-ban (térf.) alkalmazni. A ditiotreit előnyös szulfhidril tartalmú redukálószer. A ditiotreit és az aszkorbátot előnyösen 10 mM koncentrációban alkalmazzuk a stabilizáló elegyben.

A stabilizált enzimpreparátum előnyös kémhatása pH = 7 és 8 között van, legelőnyösebb pH = 7,5 értéknél. A kívánt kémhatást alkalmas pufferrel, például Tris-HCl pufferrel tartjuk fenn.

Az enzimstabilizáló módszer hatékonyságát a nyers sejt kivonaton szemléltetjük. Egy tipikus sejt kivonatban az enzim 50 mmólos Tris-HCl pufferben van, melynek kémhatása pH = 7,5, a sejt kivonat a fenil-metil-szulfonil-fluoridot 2

mM, az etil-alkoholt 10%, a glicerint 10%, a ditiotreit 1 mM és az aszkorbátot 1 mM koncentrációban tartalmazza. Ebben a közegben, 4 °C hőmérsékleten tartva, az enzimaktivitás 7 nap elteltével 100%-ban megmaradt.

Az előállított stabilizált enzimkészítmény az alábbi összetételű: pH = 7-8 kémhatású vizes enzimoldat, 5-15% végkoncentrációban glicerint vagy szaccharóz, 5-15% végkoncentrációban 1-3 szénatomszámú, egyértékű alkohol, 1-20 mM végkoncentrációban szulfhidril tartalmú redukálószer és aszkorbát.

Az előnyösen elkészített készítmény mind a ditiotreit, mind az aszkorbátot 10 mM koncentrációban tartalmazza.

A készítményt hidegen, előnyösen 0-5 °C hőmérsékleten készítjük el. Az alkotórészeket bármilyen sorrendben, egyenként adjuk az enzimoldathoz. Eljárhatunk úgy is, hogy a stabilizáló anyagokból először egy elegyet készítünk és ezt adjuk kívánt koncentrációban az enzimoldathoz.

A glicerint előnyösebb a szaccharóznál, az alkoholok közt legelőnyösebb az etil-alkohol.

A találmány eljárása szerint nyert tisztított enzim alkalmas a dezacetoxi-cefalosporin-C előállítására, ami a cefalosporin-vázú 7-amino-dezacetoxi-cefalosporin-C (7-ADCA) előanyaga. A 7-ADCA-t ismert eljárásokkal acilezve 3-metil-cefalosporin antibiotikumokat, például cefalexint nyerünk. A dezacetil-cefalosporin-C felhasználható a 3-aciloxi-cefalosporin antibiotikumok előállítására. A tisztított enzim felhasználható az enzim aminosavsorrendjének meghatározásához, aminek ismerete klónozási kísérletekben fontos. Felhasználhatjuk a tisztított enzimet a penicillin antibiotikus aktivitással rendelkező cefalosporinokká való átalakítására is.

Az alábbiakban ismertetjük az eljárásunk során alkalmazott meghatározási módszereket:

Enzimaktivitási vizsgálat - Az enzim tisztaságának megállapítására, a tisztítási folyamat nyomkövetésére a kromatográfias frakciók expandáz és hidroxiláz aktivitását HPLC analízissel határozzuk meg, illetve a kromatográfias frakciók protein összetételét nátrium-dodecilszulfátos poliakril-amid elektroforézissel (SDS-PAGE) analizáljuk. Az expandázaktivitás meghatározásához a reakcióelegyet 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk 15 percen keresztül. Az 1 ml 50 mM Tris-HCl pufferben, pH = 7,5, 0,003-0,003 egység enzimet tartalmazó oldatban az alkotórészek koncentrációja a következő: 0,28 mM penicillin-N-szubsztrát, 0,60 mM  $\alpha$ -ketoglutarát, 0,06 mM vas(II)-szulfát, 0,67 mM aszkorbát, 1,00 mM ditiotreit és 0,05 mM ATP. A hidroxilázaktivitás meghatározásához az enzim-katalizálta reakciót 36 °C hőmérsékleten végezzük a fent ismertetett reakcióelegyben, azzal a különbséggel, hogy szubsztrátként a penicillin-N helyett dezacetoxi-cefalosporin-C-t használunk, 0,05 mmólos koncentrációban.

Az enzimreakciót 1 ml etil-alkohol hozzáadásával leállítjuk. A csapadékot 4000 g-n 5 percig történő centrifugálással elválasztjuk, és a felüliszót, ami az enzimreakció termékét tartal-

mazza, HPLC-vel analizáljuk az alábbiakban ismertetett módon. Az expandázaktivitás megállapításánál a dezacetoxi-cefalosporin-C-t és a dezacetil-cefalosporin-C-t egyaránt mérjük az enzim bifunkcionális jellegéből következőleg. A hidroxilázaktivitás vizsgálatánál a dezacetoxi-cefalosporin-C-ből keletkező dezacetil-cefalosporin-C-t határozzuk meg.

20–100  $\mu$ l felülúszót használunk a dezacetoxi-cefalosporin-C és a dezacetil-cefalosporin-C HPLC-vel történő meghatározásához, külső standardot alkalmazva.

Előnyös HPLC rendszer: Model 721 rendszer irányító egység, Model 730 adatfeldolgozó, Model 710B Waters Intelligent Sample Processor, Model 510EF pumpák és egy Lambda-Max Model 481 LC spektrométer (Waters Assoc., Milford, MA, USA).

A dezacetil-cefalosporin-C-t és a dezacetoxi-cefalosporin-C-t előnyösen  $\mu$ Bondapak-NH<sub>4</sub> oszlopon (0,8 x 10 cm) (Waters Assoc.) választjuk el. Mozgófazis: 2% ecetsav/0–4% metil-alkohol/6–7% acetonitril/87–92% víz; pH = 3,8; áramlási sebesség: 1,5–2,0 ml/perc; detektálás 260 nm-en (cefalosporin kromofor). A meghatározások mind az expandáz, mind a hidroxiláz meghatározásánál 2%-os szórással reprodukálhatók.

A 3. ábra a két aktivitás tipikus HPLC kromatogramját mutatja. Az expandáz vizsgálatnál a DAC mennyiségét – a koelúció miatt – a penicillin-N mennyiségével korrigáljuk.

Molekulatömeg meghatározása – A gyenge anioncserélő gyantáról származó (2. lépés) aktív expandáz molekulatömegét Bio-Gel A 0,5m oszlopon (1,6x100 cm) történő gélszűrővel határozzuk meg. Az oszlopot előzőleg ekvilibráljuk 50 mM Tris-HCl pufferrel, pH = 7,5, ami 1 mM koncentrációban ditiotreitolt és 1 mM koncentrációban aszkorbátot is tartalmaz. A rendszer kalibrálásához élesztő alkoholdehidrogenázt (MS: 80000), borjú szérum-albumint (BSA, MS: 66200), ovalbumint (MS: 450000) karbonát-dehidratáz (MS: 31000) és ribonukleázt (MS: 13700) használunk.

A FPLC-vel tovább tisztított enzim minimális molekulatömegét a nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézissel határozzuk meg protein molekulatömeg standardokat alkalmazva.

Izoelektromos fókuszálás – A tisztított enzim izoelektromos pontját Anderson, N. G. és Anderson N. L. módszerével határoztuk meg [Anal. Biochem., 85: 331–340 (1978)].

Az elektroforézist 5% amfolittel (pH = 3–10; Pharmacia, Inc.) végezzük akrilamidgélben. A proteineket ezüstóval tesszük láthatóvá.

Aminosavösszetétel – A tisztított enzimet Mono Q erős anioncserélő gyantán tovább tisztítjuk FPLC-vel, és az eluátum fehérjét használjuk fel az aminosavösszetétel meghatározására. Az eluátumot 6 n sósavban hidrolizáljuk, 110 °C hőmérsékleten 24, 48, 72 és 96 órán át. Az aminosavakat integrátorral ellátott Beckman Model

6300 aminosavanalizátorral határozzuk meg. A treonin és a szerint mennyiségét a hidrolízis 0 idejére extrapoláljuk. A ciszteint, mint ciszteinsavat határozzuk meg a dimetil-szulfoxidos oxidáció után. A triptofánt tioglikolsavas hidrolízissel határozzuk meg.

Proteintartalom – az enzimpreatarátum proteintartalmát Bradford, M.M. [Anal. Biochem., 72: 248–254 (1976)] módszerével határozzuk meg standardként borjú szérumalbumint használva.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban egy példát adunk meg.

#### Példa

Nagy cefalosporin-C termelőképességű *Cephalosporium acremonium* ATCC 36225 törzset 96 órán át tenyésztünk 50 milliliteres Erlenmeyer lombikokban Queener, S.W. és munkatársai által leírt összetett folyékony táptalajon ("Cephalosporin C fermentation: Biochemical and regulatory aspects of sulfur metabolism", 141–170. old., in: E. J. Van Damme (szerk): "Biotechnology of industrial antibiotics", Marcel Dekker, Inc., New York).

A sejteket 20000 g-én 10 percen át centrifugálva összegyűjtjük, 50 mM Tris-HCl pufferrel, pH = 7,5, 1,0 mM kálium-kloridot nem tartalmazó pufferrel mossuk.

A dezacetoxi-cefalosporin C-szintetáz tisztítását 0–4 °C hőmérsékleten végezzük.

600 g nedves tömegű friss sejtet 50 mM Tris-HCl pufferben, pH = 7,5, szuszpendálunk. A puffer a további alkotórészeket is tartalmazza: 10% glicerin, 10% etil-alkohol, 10 mM ditiotreit, 10 mM aszkorbát. A szuszpenzió össztérfogat 1 liter. A szuszpendált sejteket ultrahanggal 4 °C vagy az alatti hőmérsékleten feltárjuk. A feltárás alatt több adagban fenil-metil-szulfonil-fluoridot adunk a szuszpenzióhoz, míg a végtérfogat 2 mM nem lesz. 1  $\mu$ g/ml koncentrációban dezoxi-ribonukleázt, 2 mM koncentrációban magnézium-szulfátot adunk a preparátumhoz. A feltárt szuszpenziót 40000 g-én 30 percen át centrifugáljuk, és a felülúszót elválasztva nyerjük a nyers enzimkivonatot. A nyers enzimkivonatot összesen 12500 mg proteint tartalmaz, fajlagos aktivitása 0,039 egység/mg, összaktivitása 485 egység.

A nyers extraktumot DEAE-trisakril LS oszlopra (5x300 cm) visszük, melyet előzőleg GEDA pufferrel ekvilibráltunk. Az enzim nem marad az oszlopon, ha 50 mM Tris-HCl pufferrel eluálunk, de a visszamaradó proteinek következtében a szűrletben kb. 1,6-szorosára tisztul. Az eluátumban az összprotein 6200 mg, fajlagos aktivitás 0,063 egység/mg, összaktivitás 393 egység.

Az eluátumot DEAE-cellulóz oszlopra (2,5x41 cm) visszük, amit előzőleg GEDA pufferrel ekvilibráltunk. Az oszlopot 4-oszloptérfogatnyi mennyiségű GEDA pufferrel mossuk 0,05 M kálium-klorid jelenlétében. Mosás után a GEDA pufferben 0,05 M-tól 0,60 M-ig kálium-klorid lineáris grádiens kialakítva, eluáljuk az

oszlopot. A lineáris grádiens 800 ml pufferben alakítjuk ki. 25 ml/óra átfolyási sebesség mellett 10 milliliteres frakciókat gyűjtünk. 0,04 M és 0,06 M kálium-klorid koncentrációk között eluálódik az enzim egy főcsúcsban és két mellécsúcsban. Az összaktivitásnak kb. 75%-a van a főcsúcsban. A főcsúcs frakcióit, melyekben a fajlagos aktivitás 0,088 egység/mg-nál magasabb, egyesítjük és Amico ultrafiltrációval PM30 membránon 9,5 ml térfogatra töményítjük. A betöményített oldatot Sephocryl S-200 oszlopra (5x85 cm) visszük, amit előzőleg GEDA pufferben ekvibráltunk. 40 ml/óra átfolyási sebesség mellett 10 milliliteres frakciókat gyűjtünk. A legálább 0,33 egység/mg fajlagos aktivitású frakciókat egyesítjük és hidroxilapatit oszlopra (1,6x95 cm) visszük, amit előzőleg GEDA pufferrel ekvibráltunk 20 mM kálium-foszfát jelenlétében. Az oszlopot 2 oszloptérfogatnyi ugyanilyen pufferrel mossuk. Az enzimet lépcsőzetes grádiens-elucióval eluáljuk 100 ml GEDA pufferrel, melyben a kálium-foszfát koncentráció 30, 40, 60, 80, illetve 100 mM. 5 milliliteres frakciókat gyűjtünk 15 ml/óra átfolyási sebesség mellett. Az enzim egy fő és egy mellécsúcsban jelenik meg. A főcsúcs az összaktivitásnak kb. 80%-át tartalmazza. Az enzimet tartalmazó egyes frakciókhoz fenil-metil-szulfonil-fluoridot adunk 0,25 mM koncentrációban. A főcsúcs azon frakcióját, melyben a fajlagos aktivitás 0,827 egység/mg Mono Q oszlopon gyors protein folyadékkromatográfiával tovább tisztítjuk (FPLC; Pharmacia Inc., Piscataway, NJ. USA).

A főcsúcs legmagasabb fajlagos aktivitású frakciójának egy részét (5,6 mg protein) Mono Q oszlopra (0,5x5 cm) visszük, amit előzőleg GEDA pufferrel ekvibráltunk. Az enzimet lineáris gradiens elucióval eluáljuk, 32 ml GEDA pufferben a kálium-klorid koncentrációt 0-ról 0,4 M-ra emelve. 30 ml/órás átfolyási sebességnél 1 milliliteres frakciókat gyűjtünk. A Mono Q FPLC aktivitását és a protein-kromatogramját az 1D ábrán mutatjuk be. Az enzim jellemző adatai megegyeznek a leíró részben megadottakkal, tisztasága és fajlagos aktivitása pedig a II. táblázatban leírtakkal.

A hidroxilapatit azon további frakcióit, melyeknek a fajlagos aktivitása nagyobb, mint 0,558 egység/mg, egyesítjük és DEAE-Sepharóz oszlopra (1,6x95 cm) visszük, amit előzőleg GEDA pufferben ekvibráltunk. Az oszlopot 2-oszloptérfogatnyi pufferrel mossuk 0,05 M kálium-klorid jelenlétében. Az enzimet 400 ml GEDA pufferben kialakított lineáris kálium-klorid grádienssel eluáljuk, a sókoncentrációt 0,05 M-ról 0,6 M-ra emelve.

15 ml/óra átfolyási sebesség mellett 5 milliliteres frakciókat gyűjtünk.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás tisztított – expandáz és hidroxiláz aktivitással rendelkező – dezacetoxi-cefalosporin-C-szintetáz enzim előállítására, mely egy monomer protein, melynek géliszűréssel megállapított

molekulatömege 43000, nátrium-dodecilszulfát/poliakril-amid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) megállapított minimális molekulatömege 41000, izoelektromos pontja  $6,0 \pm 0,5$ , és aminosavösszetétele a következő:

	Aminosav	41000 Daltonra eső savmaradék száma
5	Asx (Asp + Asn)	37
10	Thr	24
	Ser	26
	Glx (Glu + Gln)	35
	Pro	21
	Gly	31
15	Ala	34
	Val	32
	Cys	6
	Met	5
	Ile	8
20	Leu	27
	Tyr	10
	Phe	20
	His	6
	Lys	17
25	Arg	29
	Trp	3
	<b>Összesen</b>	<b>371</b>

azzal jellemezve, hogy

30 i) proteázgátlót, pH = 7,8 kémhatású puffert és GEDA-t tartalmazó sejtmentes, nyers vizes enzimmixonot gyenge anioncserélő gyantára visszük, az enzimet GEDA-t tartalmazó kálium-klorid vagy nátrium-klorid, vagy Tris-HCl grádienssel eluáljuk, majd

35 ii) az i) lépésből származó, az enzimet tartalmazó eluátumot keresztkötéses poliszaccharidgelen szűrjük, a gél GEDA-val mossuk, és

40 iii) az ii) lépésből származó, az enzimet tartalmazó szűrletet hidroxilapatitra visszük és az enzimet GEDA-t tartalmazó kálium-foszfát grádienssel eluáljuk, majd a kapott eluátumot kívánt esetben tovább tisztítjuk, ahol a GEDA jelentése: 5–15% glicerin vagy szaccharóz, 5–15% 1–3 szénatomszámú egyértékű alkohol, 1–20 mM koncentrációban szulfhidrilcsoportot tartalmazó redukálószer és 1–20 mM koncentrációban aszkorbát.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont iii) lépéséből származó, az enzimet tartalmazó eluátumot erős anioncserélő gyantára visszük, és az enzimet GEDA-t tartalmazó kálium-klorid, vagy nátrium-klorid vagy Tris-HCl grádienssel eluáljuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az i) lépés anioncserélő gyantáját, az ii) lépés gélijét és az iii) lépés hidroxilapatitját GEDA-val ekvibráljuk, mielőtt az enzimet rávinnénk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nyers enzimmixonot Tris-HCl pufferrel, pH = 7,5, pufferoljuk.

5. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan GEDA-t alkalmazunk, melyben a glicerin vagy a cukor koncentrációja 10%, az 1–3 szénatomszámú egyértékű alkohol

koncentrációja 10%, a szulfhidrilcsoportot tartalmazó redukálószer és az aszkorbát mindegyikének a koncentrációja 10 mM.

6. Az 1., 2., 3. vagy 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a glicerint, etil-alkoholt, ditiotreitét és aszkorbátot tartalmazó GEDA-t alkalmazunk.

7. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az i) lépésben az enzimet olyan kálium-klorid vagy nátrium-klorid lineáris

grádienssel eluáljuk, ahol a koncentráció 0,04 M-ről 0,6 M-ra emelkedik.

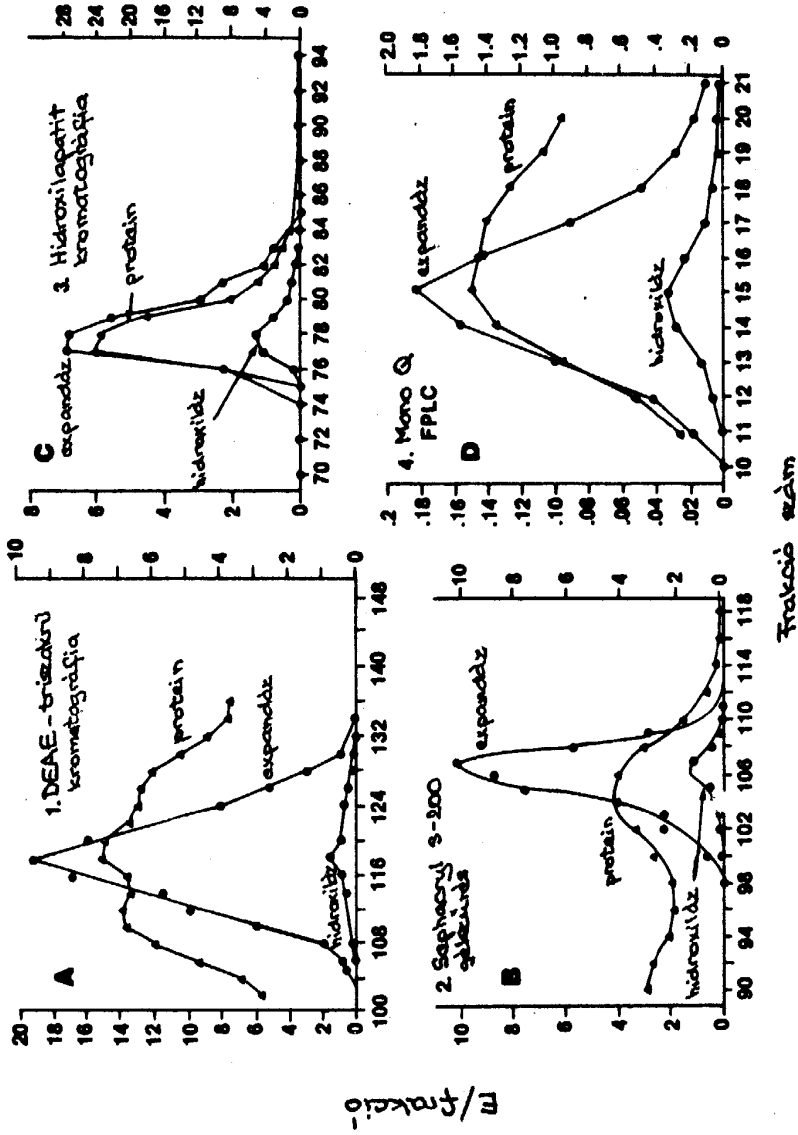
8. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az i) lépésben a gradienst 0,05 M-ről 0,5 M-ra növekvő koncentrációjú Tris-HCl-al alakítjuk ki.

9. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az i) lépés anioncserélő gyantája dietil-amino-etil-cellulóz vagy dietil-amino-etil-poliakril gyanta.

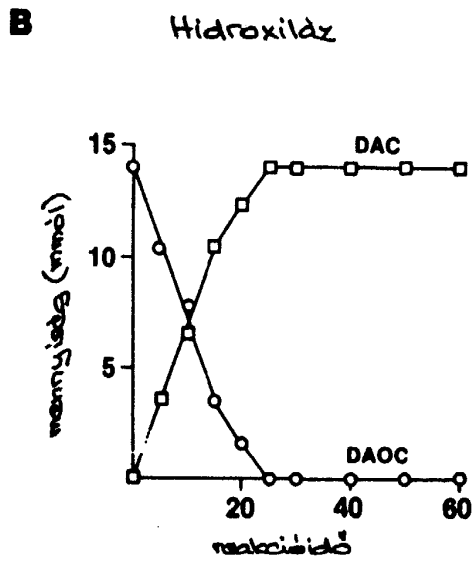
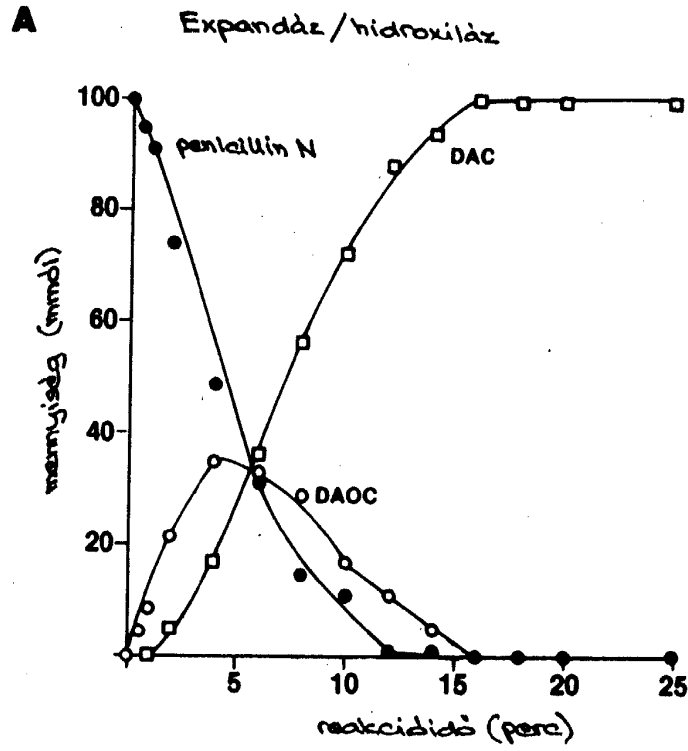
5

10

1. ábra

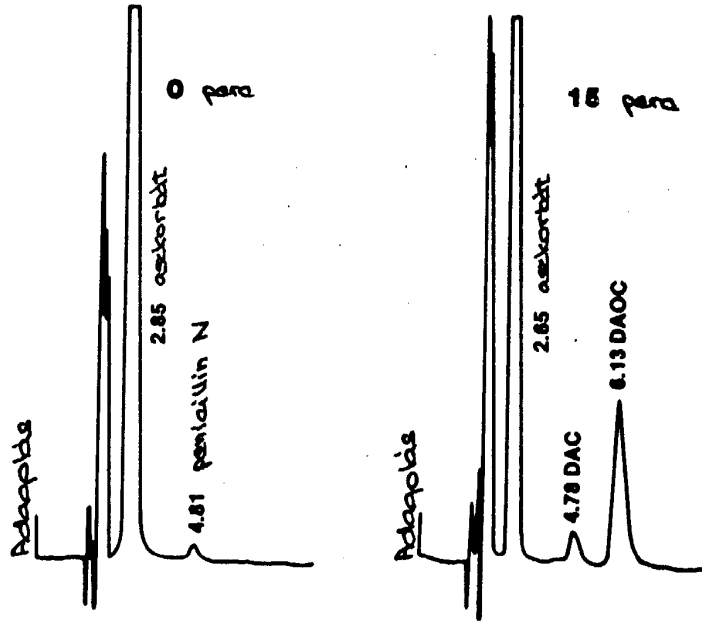


2. ábra

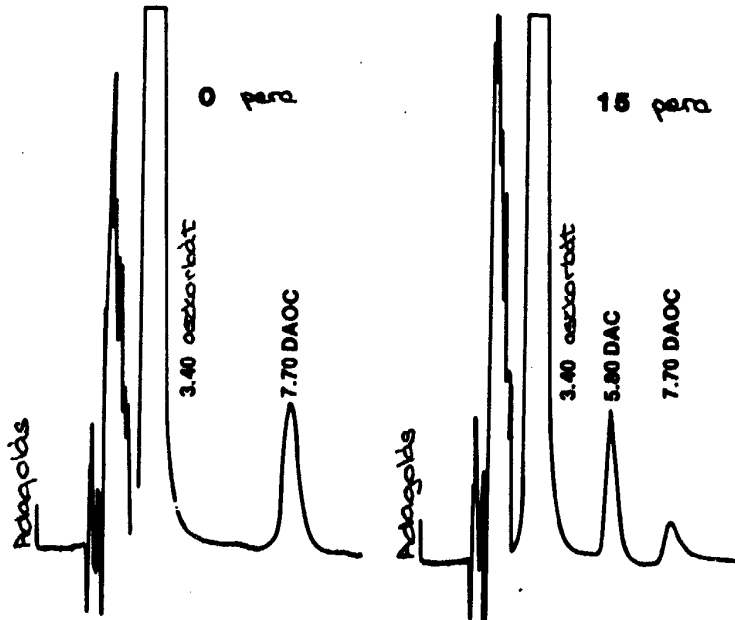


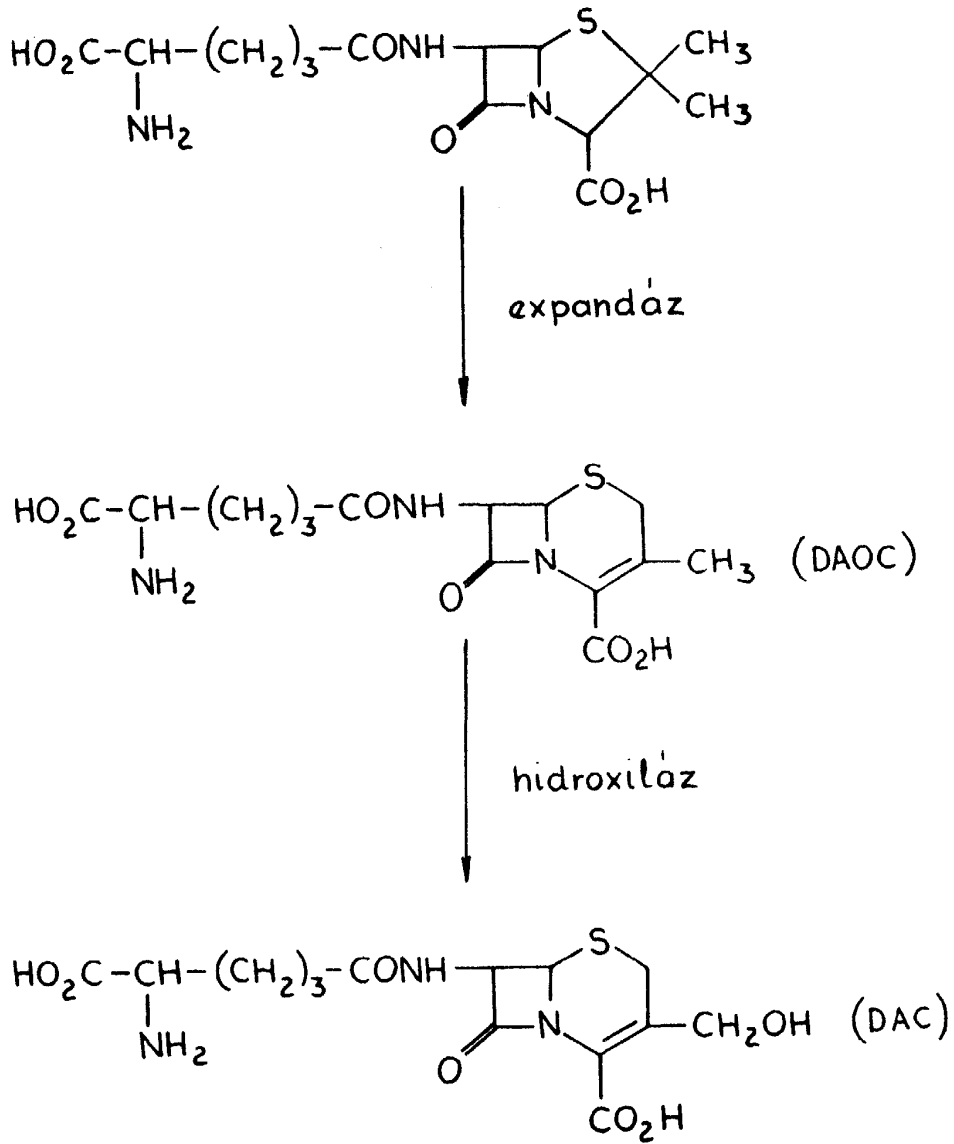
3. ábra

A. Expandez mérés



B. Hidroxidáz mérés





5. ábra