

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 103456

**Patent dodatkowy
do patentu _____**

Zgłoszono: 21.09.76 (P. 192562)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 28.03.78

Opis patentowy opublikowano: 30.08.1979

Int. Cl². C07G 7/028

CERTYFIKAT

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Apolinary Szewczuk, Marian Mordarski, Maria Wellman-Bednawska,
Edmund Ziomek, Edward Żukowski, Jerzy Luba, Barbara Borowska,
Ewa Bujnowska, Kazimiera Skrzypkowska
Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfarm”,
Warszawa (Polska)

Sposób oczyszczania amidazy penicylinowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania amidazy penicylinowej za pomocą wymienników jonowych. Enzym ten jest stosowany do wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego metodą hydrolizy penicylin.

Znane sposoby oczyszczania amidazy penicylinowej za pomocą wymienników jonowych polegają na tym, że surowy roztwór enzymu, stanowiący zazwyczaj rozbitą masę komórkową mikroorganizmu wytwarzającego amidazę (na przykład *Escherichia coli*) po usunięciu łatwo sedymentujących części komórkowych, poddaje się wstępnemu oczyszczeniu lub wzbogaceniu, na przykład przez wytrącenie enzymu siarczanem amonu (Bondarieva et al., *Biochemia*, 1969, 34, 76), wytrącenie enzymu taniną lub wytrącenie zanieczyszczeń w kwaśnym środowisku (opis zgłoszeniowy RFN nr 1907365), sorpcję na glinokrzemianach (opis patentowy nr 83713). Otrzymany wstępnie oczyszczony roztwór amidazy poddaje się następnie działaniu wymienników anionowych i/lub kationowych, przy czym sorpcji ulega amidaza, a zanieczyszczenia pozostają w wycieku. Zasorbowany enzym eluuje się z wymiennika i ewentualnie zagęszcza lub liofilizuje.

Z opisu patentowego nr 83168 znany jest również sposób oczyszczania amidazy penicylinowej przez wstępne strącenie zanieczyszczeń z jej surowego roztworu, sorpcję zanieczyszczeń białkowych na wymienniku kationowym i anionowym przy wartości pH = 5–7, a następnie sorpcję amidazy na jonicie i elucję.

Powyższe metody prowadzą do otrzymania roztworu lub liofilizatu amidazy penicylinowej o stopniu oczyszczenia wystarczającym dla ich dalszego stosowania do hydrolizy penicylin. Jednak dużą wadą tych metod jest ich wieloetapowość, powodująca straty enzymu oraz trudności technologiczne, zwłaszcza w dużej skali.

Stwierdzono, że prowadzenie sorpcji zanieczyszczeń białkowych, znajdujących się w surowym roztworze amidazy penicylinowej, na wymiennikach jonowych w odpowiednich warunkach wartości pH oraz wartości przewodnictwa właściwego pozwala na uzyskanie preparatu enzymu o wystarczającej czystości w prostym, dwuetapowym procesie z pominięciem etapu wstępnego oczyszczania.

Sposób według wynalazku polega na tym, że surowy roztwór amidazy penicylinowej doprowadza się do wartości pH około 7–9 i wartości przewodnictwa właściwego poniżej 0,2 mS i kontaktuje się z wymiennikiem

anionowym, a otrzymany roztwór doprowadza się do wartości pH około 5–7, kontaktuje z wymienniczym kationowym i ewentualnie zagęszcza przez ultrafiltrację. W tych warunkach na wymienniczych jonowych sorbuje się prawie wyłącznie białka, zanieczyszczające amidazę penicylinową.

Wyjściowy surowy roztwór amidazy penicylinowej otrzymuje się z rozbitej masy komórkowej *Escherichia coli* po usunięciu łatwo sedymentujących części komórkowych. Dalszą obróbkę tego roztworu prowadzi się w środowisku buforu fosforanowego. Usuwanie zanieczyszczeń białkowych za pomocą wymienniczy anionowego prowadzi się korzystnie w układzie kolumnowym. Po naniesieniu całej ilości roztworu enzymu na kolumnę z wymienniczym anionowym przemywa się kolumnę buforem fosforanowym o takiej samej wartości pH (około 7–9). Zmianę wartości pH otrzymanego wycieku z kolumny, zawierającego amidazę penicylinową, do wartości pH około 5–7 prowadzi się korzystnie przez dodanie odpowiedniej ilości wymienniczy kationowego o małych porach, po czym wymienniczy ten usuwa się. Sorpcję zanieczyszczeń białkowych na wymienniczu kationowym prowadzi się korzystnie w układzie stacjonarnym w ciągu 1 do kilku godzin, po czym wymienniczy odsąca się i przemywa, a roztwór ewentualnie zagęszcza się przez ultrafiltrację.

Otrzymany oczyszczony roztwór amidazy penicylinowej jest całkowicie pozbawiony aktywności β -laktamazowej, a jego czystość jest wystarczająca dla wytwarzania preparatów immobilizowanej amidazy penicylinowej, stosowanych przy hydrolizie penicylin. Roztwór ten można przechowywać przez wiele tygodni w stanie zamrożonym bez utraty aktywności enzymatycznej. Można go także liofilizować, otrzymując suchy preparat o nie zmienionej aktywności enzymatycznej.

Sposób według wynalazku jest objaśniony następującym przykładem.

P r z y k ł a d.

a) Przygotowanie roztworu surowego enzymu

Masę komórkową *Escherichia coli*, oddzieloną od podłoża hodowlanego, przemytą dwukrotnie 0,9% roztworem chlorku sodowego i zawieszoną w 0,02 M buforze fosforanowym o wartości pH = 8,0 w stosunku 1 część objętościowa masy komórkowej na 2 części objętościowe buforu, rozbija się przez sonifikację lub w dezintegratorze Browna. Następnie uzyskany homogenat oddziela się od stałych części komórkowych przez odwirowanie. Otrzymany roztwór surowego enzymu rozcieńcza się wodą dejonizowaną tak, aby przewodnictwo elektrolityczne nie przekraczało wartości 0,17 mS; otrzymuje się roztwór o stężeniu białka około 20 mg/ml i aktywności swoistej amidazy penicylinowej około 0,09 j/mg. Roztwór ten wykazuje aktywność β -laktamazową około 0,005 j/mg.

b) Sorpcja na wymienniczu anionowym

250 ml roztworu, otrzymanego metodą opisaną w punkcie a), nanosi się w temperaturze 4°C na kolumnę (3,8 X 22 cm), wypełnioną DEAE–celulozą i uprzednio zrównoważoną 0,01 M buforem fosforanowym o wartości pH = 8,0. Zbiera się frakcje wycieku z kolumny po 15 ml przy szybkości wypływu 30 ml/godzinę. Po naniesieniu na kolumnę całej ilości roztworu przemywa się ją 0,01 M buforem fosforanowym o wartości pH = 8,0. We frakcjach oznacza się stężenie białka i aktywność amidazy. Frakcje o aktywności swoistej enzymu wyższej od 0,8 j/mg łączy się i doprowadza wartość pH otrzymanego roztworu do 5,8 przez powolne dodawanie gęstej zawiesiny kationitu Dowex 50 X 8 (w formie kwasowej), po czym kationit odsąca się.

c) Sorpcja na wymienniczu kationowym

250 ml roztworu, otrzymanego metodą opisaną w punkcie b), miesza się w temperaturze 4°C w ciągu 60 minut z 30 ml żelu SP–Sephadex, użytego w formie kwasowej. Następnie żel odsąca się i przemywa wodą, a przesącz zagęszcza się przez ultrafiltrację do objętości około 10 ml. Otrzymuje się roztwór amidazy penicylinowej o stężeniu białka około 20–30 mg/ml i aktywności swoistej amidazy około 3,5 j/mg. Roztwór ten nie wykazuje aktywności β -laktamazowej i może być stosowany bez dalszego oczyszczania do wytwarzania preparatów immobilizowanej amidazy penicylinowej.

Aktywność β -laktamazową oznacza się metodą Ogowara i Umezawa, *Biochim, Biophys. Acta*, 1975, 391, 435.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania amidazy penicylinowej przez usuwanie zanieczyszczeń białkowych za pomocą makroporowatych wymienniczy jonowych, z n a m i e n n y t y m, że surowy roztwór amidazy penicylinowej doprowadza się do wartości pH około 7–9 i wartości przewodnictwa właściwego poniżej 0,2 mS i kontaktuje się z wymienniczym anionowym, a otrzymany roztwór doprowadza się do wartości pH około 5–7, po czym kontaktuje z wymienniczym kationowym i ewentualnie poddaje ultrafiltracji.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że roztwór doprowadza się do wartości pH około 5–7 przez dodanie wymienniczy kationowego o małych porach w formie kwasowej.