

돼지 신장으로부터 디펩티다제의 부분정제 및 그에 대한 신규 카바페넴계 항생물질 DWP20418의 안정성 평가

김지연* · 박남준 · 유영효 · 박명환

(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received February 9, 1997)

The Stability Test of New Carbapenem DWP20418 and Partial Purification and Characterization of Renal Dehydropeptidase-I

Ji Yeon Kim*, Nam Jun Park, Young Hyo Yu and Myung Hwan Park
R & D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Sungnam, Kyunggi-Do 462-120, Korea

Abstract—Dehydropeptidase-I (DHP-I) was solubilized from porcine kidney by treatment with *n*-butanol and partially purified 19.25 fold by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, DEAE-Sephacryl CL-6B ion exchange chromatography and Sephacryl S-300 HR chromatography with an overall yield of 19.16. DHP-I showed its optimal activity at pH 7.5 and 25°C. Its activity was stable under neutral and alkaline conditions, but was disappeared under acidic condition. And DHP-I was heat-labile and its activity remained at 45°C for 3 hrs. The enzyme was not inhibited by dicationic ions, while its activity was increased by Co^{2+} (1 mM) and Zn^{2+} (0.1 mM). The enzyme was inhibited by EDTA and *N*-ethylmaleimide. The relative molecular mass of DHP-I was estimated to be approximately 100 kDa by gel filtration chromatography. The K_m value of DHP-I for glycyldehydrophenylalanine (GDHP) was 1.98 mM. DWP20418 [(1R, 5S, 6S)-6-[1-(R)-Hydroxyethyl]-1-methyl-2-[(2S, 4S)-2-(piperazinylcarbonyl)-1-(R)-hydroxyethyl]pyrrolidine-4-thio]carbapen-2-em-3-carboxylic acid], compared with meropenem (MEPM), was rather easily hydrolyzed by DHP-I, while it was four times more resistant than imipenem (IPM) to DHP-I.

Keywords □ Dehydropeptidase-I (DHP-I), Purification, K_m , V_{max} , Imipenem, Meropenem, DWP20418.

돼지의 신장으로부터 Dipeptidase(Dehydropeptidase-I; DHP-I)가 분리·정제된 후¹⁾, 이 효소의 작용을 규명하는 작업이 계속 진행되어 왔다. 1966년 DHP-I은 renal proximal tubules의 brush border microvilli에 integral membrane protein으로서 존재하고 있음이 밝혀졌으며²⁾, 흰쥐^{3, 4)}, 돼지^{5, 6)} 및 인간^{7, 10)}의 신장으로부터 분리되었다. 포유류 신장의 proximal tubules의 microvilli는 재흡수 작용이 활발하고 많은 가수분해효소가 분포하는 것으로 알려져 있는데, 이 효소에 의해 신장에서의 재흡수를 용이하도록 여러 di-

peptides를 가수분해하는 것으로 밝혀졌다. 인간의 renal dipeptidase는 그 특성이 부분적으로 밝혀졌는데 Campbell *et al.*⁷⁾은 이 효소가 분자량 59 kDa으로 된 4개의 소단위로 구성되어 있으며, imipenem(IPM)과 glycyldehydrophenylalanine(GDHP)에 대한 효소 활성이 cilastatin이라는 효소저해제에 의해 경쟁적이고 가역적으로 영향을 받는다고 보고하였으며, Mitsuhashi *et al.*⁸⁾은 이 효소가 2개의 소단위로 이루어진 135 kDa의 분자량을 가지는 것으로 보고하였다. 또한, 돼지의 DHP-I은 Campbell *et al.*¹⁾과 Mikami *et al.*⁶⁾에 의해 분리, 정제되었는데, 94 kDa의 분자량으로 된 zinc metalloenzyme으로 GDHP의 가수분해를 촉진하고 leukotriene D₄를 leukotriene E₄로 전환시키며⁹⁾,

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

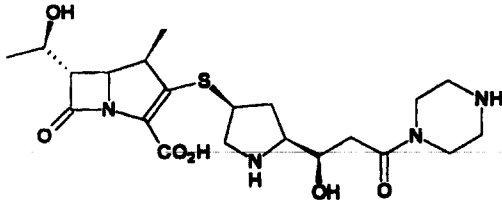


Fig. 1 — Chemical structure of DWP20418.
 (1R, 5S, 6S)-6-[1-(R)-Hydroxyethyl]-1-methyl-2-[(2S, 4S)-2-(piperazinylcarbonyl)-1-(R)-hydroxyethyl]pyrrolidine-4-thio]carbapen-2-em-3-carboxylic acid

IPM 등의 카바페넴계 항생물질을 특이적으로 불활성화시키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이와 같은 물리화학적 특성을 가진 DHP-I은 동물 종에 따라서도 그 분포 양상이 상이하며 기질특이성도 다르기 때문에 요증으로 배설되는 카바페넴계 항생물질의 *in vivo* 활성에 차이가 생길 수 있다.^{3, 4, 7)} 특히, *in vitro*에서 우수한 항균 활성을 보이는 IPM이 *in vivo*에서 포유류의 β -lactamase로 작용하는 이 효소에 의해 약효 활성이 크게 감소하는 것으로 보고된 이후, DHP-I은 카바페넴계 항생물질과 관련하여 중요성이 부각되었다. DHP-I이 카바페넴계 항생물질에 작용하는 시기는 사구체 여과 과정으로, 이러한 post-excretory metabolism 때문에 IPM 등의 카바페넴계 항생물질이 요로감염증 치료에 유효한 혈중농도를 유지할 수가 없으므로, DHP-I에 대해 카바페넴계 항생물질을 안정화하기 위하여 효소저해제가 개발되었고 카바페넴계 항생물질의 β -락탐환에 1- β -메틸기를 도입하여 효소에 대한 화학적 안정성을 증가시켰다.¹³⁾

이에 본 실험에서는 돼지 신장의 피질부위로부터 DHP-I을 부분정제하여 그 효소학적 특성을 규명하고, 신규 합성된 카바페넴계 항생물질인 DWP20418 [(1R, 5S, 6S)-6-[1-(R)-Hydroxyethyl]-1-methyl-2-[(2S, 4S)-2-(piperazinylcarbonyl)-1-(R)-hydroxyethyl]pyrrolidine-4-thio]carbapen-2-em-3-carboxylic acid; 특허출원 95-66329호)의 DHP-I에 대한 안정성을 평가한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료의 준비

본 실험에서 사용한 돼지 신장은(주) 성도산업에서 구하였고, Glycyldehydrophenylalanine(GDHP)과 Meropenem(MEPM)은 (주) 대웅제약에서 합성하여

사용하였으며 Imipenem(IPM)은 (주) 중외제약에서 구입하여 사용하였다.

효소활성의 측정

Renal dehydropeptidase-I(DHP-I)의 활성도는 275 nm에서 GDHP가 분해되어 흡광도가 감소하는 정도를 측정하였다. 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액에 50 μ M GDHP와 효소시료 1 Unit을 첨가한 후 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하였으며, 효소의 단위는 1분 동안 GDHP 1 mole을 가수분해하는 효소량을 1 Unit로 정하였다. 또한 IPM의 흡광도는 299 nm에서, MEPM과 DWP20418의 흡광도는 300 nm에서 각각 측정하였다.

단백질의 정량

단백질량은 Bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 하여 595 nm에서 측정하였으며, BIO-RAD Econo system을 사용¹⁴⁾할 때는 280 nm에서의 흡광도로써 단백질량을 정하였다.

DHP-I의 정제

모든 과정은 4°C에서 이루어졌으며, 원심분리의 조건은 12,000 \times g, 20분간 행하는 것으로 정하였다. 피막을 제거한 돼지 신장의 피질부를 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액에서 (1:3, V/V) 13,500 rpm으로 10분간 분쇄하였다. 이에 20% *n*-butanol (-20°C)을 넣고 3시간 동안 교반시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액에 60% acetone(-20°C)을 넣고 30분간 교반시키고 원심분리하였다. 이로부터 얻은 침전물을 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액에 녹인 후 동일 완충액에서 3일간 투석한 다음, 50%(NH₄)₂SO₄를 넣고 2시간 동안 교반시킨 후 원심분리한 상등액에 75%(NH₄)₂SO₄를 처리하여 18시간 동안 교반시켰다. 이를 원심분리하여 얻은 침전물을 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액에 녹여 동일 완충액에서 3일간 투석한 후 불용성 물질을 제거한 상등액을 얻었다. 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환 컬럼(4.5 \times 24 cm)에 효소시료를 첨가하고 동일 완충액으로 세척한 후, 0~0.5 M NaCl의 일정농도 기울기로 용출시켰다(용출속도 30 ml/hr, 분획량 10 ml). 이로부터 얻은 효소시료를 100 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액으로

교환시킨 후, 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephacryl S-300 HR 컬럼(2.6×90 cm)에 효소시료를 첨가하고 동일 완충액으로 용출시켰으며, 이때의 용출속도는 24 ml/hr이고 4.6 m/씩 분획하였다.

효소학적 특성

pH의 영향 - 효소 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 pH6~7.5에서는 phosphate 완충액을, pH7.5~9.5에서는 Tris-HCl 완충액을, pH9.5~10에서는 carbonate 완충액을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 또한, 효소 안정에 대한 pH의 영향은 각 완충액에 효소시료를 넣고 4°C에서 24시간, 48시간 동안 방치한 다음 잔존하는 효소의 활성을 측정하여 조사하였다.

온도의 영향 - 효소 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 25°C에서 55°C까지 5°C 간격으로 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액의 온도를 조절하여 효소 활성을 측정하였다. 또한, 효소 안정에 대한 온도의 영향은 50 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액에 효소시료를 넣고 4°C, 25°C, 35°C, 45°C로 완충액의 온도를 유지시키면서 90분 간격으로 3시간 동안의 잔존 효소 활성을 측정하여 조사하였다.

금속이온과 다양한 화합물의 영향 - 효소 활성에 대한 금속이온과 다양한 화합물의 영향을 조사하기 위해 0.1 mM 내지 1 mM의 금속이온이나 화합물을 효소 반응액에 넣고 효소 활성을 측정하였다.

분자량의 결정 - 효소의 분자량을 측정하기 위해 Sephacryl S-300 HR 컬럼(2.6×90 cm)에서 100 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충액으로 용출하였다(용출속도 24 ml/hr). 이때 사용된 표준단백질은 bovine thyroglobulin(669 kDa), horse serum apoferritin(443 kDa), sweet potato-amylase(200 kDa), yeast alcohol dehydrogenase(150 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), bovine erythrocytes carbonic anhydrase(29 kDa)이었다.

신규 카바페넴계 항생물질인 DWP20418의 DHP-I에 대한 안정성 평가

부분정제된 효소의 각 화합물에 대한 K_m 값과 V_{max} 를 측정하기 위해 여러 기질농도에서 효소 활성을 측정하였다. 기질의 농도 범위는 0.01~0.2 mM로 하였고, K_m 값과 V_{max} 는 Lineweaver-Burk plot에서 산출하였으며, IPM의 계산치를 기준으로 MEPM과 DWP 20418의 DHP-I에 대한 안정성을 평가하였다.

결과 및 고찰

DHP-I의 부분정제

돼지 신장의 피질부로부터 분쇄, *n*-butanol 용출, (NH₄)₂SO₄ 분획, DEAE-Sephacryl CL-6B 이온교환 크로마토그래피, Sephacryl S-300 HR 크로마토그래피 단계를 거쳐 정제배율 19.25배, 회수율 19.16%로 부분정제하였다(Table I).

효소학적 특성

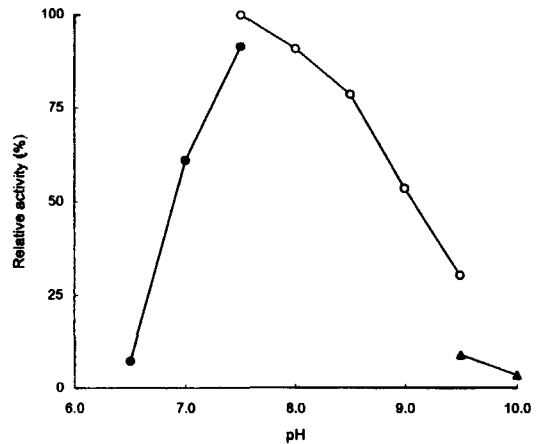


Fig. 2—Optimal pH of renal dehydropeptidase-I. pH6.5~pH7.5: 50 mM phosphate buffer (●), pH7.5~pH9.5: 50 mM Tris-HCl buffer (○), pH 9.5~pH10.0: 50 mM carbonate buffer (▲).

Table I—Purification scheme of renal dehydropeptidase-I

Purification step	Total	Total	Specific	Yield	Purification
Homogenization	644.06	8333.44	0.08	100	1
50~75% (NH ₄) ₂ SO ₄ treatment	521.42	1174.90	0.44	80.96	5.74
DEAE-Sephacryl CL-6B chromatography	408.24	712.32	0.57	63.39	7.42
Sephacryl S-300 HR chromatography	123.42	82.94	1.49	19.16	19.25

* 1 Unit : GDHP 1 mole을 가수분해하는 효소량(GDHP의: 15,700/mole/cm)

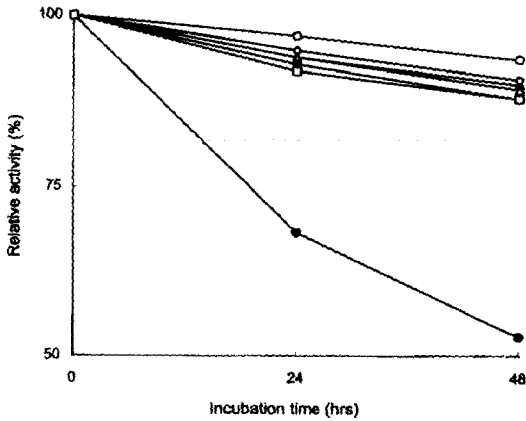


Fig. 3 — pH stability of renal dehydropeptidase-I.
pH7.0: 50 mM phosphate buffer (●), pH7.5~
pH9.5: 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5: ○, pH8.
0: ▲, pH8.5: △, pH9.0: ◆, pH9.5: ◇), pH10.0:
50 mM carbonate buffer (■).

pH의 영향 - 효소 활성에 대한 최적 pH는 pH7.5로 평가되었으며, phosphate 완충액보다 Tris-HCl 완충액에서의 효소 활성이 우수한 것으로 나타났다. pH7.0 이하와 pH9.0 이상의 완충액 조건에서는 효소 활성이 50% 이하로 감소하였으며, DHP-I은 pH7.5~pH8.5 사이의 중성 조건에서 효소 활성이 우수하게 측정되었다(Fig. 2). 또한, 각 완충액에서의 잔존 효소 활성을 측정된 결과 pH7.5에서 효소 활성이 가장 안정하게 유지되었으며, pH7.0을 제외한 다른 조건에서도 효소 활성은 비교적 안정하게 유지되었다. 이로써, DHP-I은 중성 및 약알칼리성 조건에서 효소 활성이 안정하게 유지

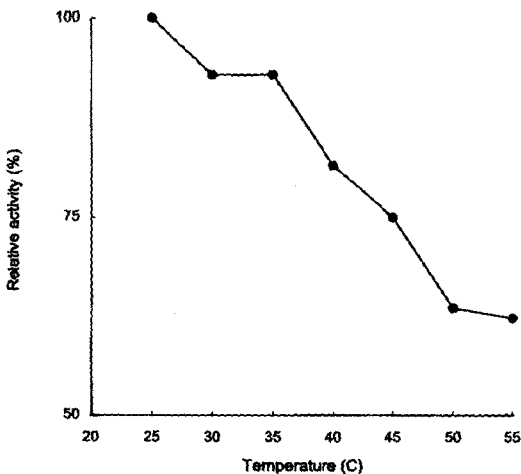


Fig. 4 — Optimal temperature of renal dehydropeptidase-I.

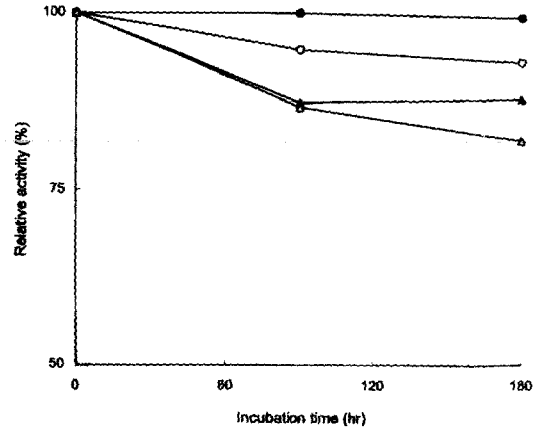


Fig. 5 — Thermal stability of renal dehydropeptidase-I.
4°C (●), 25°C (○), 35°C (▲), 45°C (△)

됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

온도의 영향 - 25~55°C에서 효소 활성을 측정된 결과 25°C에서 가장 높은 활성을 보였으며 온도가 증가함에 따라 효소 활성이 점차 감소하였다(Fig. 4). 또한, 온도에 대한 효소 안정성은 4°C에서 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 다른 온도 조건에서는 효소 활성이 점차 감소되어 25°C에서도 3시간만에 약 7%의 효소 활성이 감소하였다(Fig. 5).

금속이온의 영향 - 금속이온이 효소 활성에 미치는 영향을 측정된 결과를 Table II에 나타내었다. 효소 반응액에 각 금속이온을 첨가하여 효소 활성을 측정하였을 때 80% 이상의 효소 활성을 유지하였으며, 1 mM Co^{2+} 이온이나 0.1 mM Zn^{2+} 이온의 첨가로 인해 효소 활성이 증가되는 현상을 보였다. 이는 효소를 분리할 때나 효소 반응액에 Co^{2+} 이온이나 Zn^{2+} 이온을 첨가하

Table II — Effect of metal ions against renal dehydropeptidase-I

Metal ions	Concentration	Relative activity (%)
Control		100
BaCl ₂	0.1	88.46
	1.0	83.08
CaCl ₂	0.1	95.38
	1.0	89.23
CoCl ₂	0.1	84.62
	1.0	111.54
MgSO ₄	0.1	99.23
	1.0	84.62
MnSO ₄	0.1	99.23
	1.0	100
ZnSO ₄	0.1	106.15
	1.0	13.85

Table III— Effect of various compounds against renal dehydropeptidase-I

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100
8-Hydroxyquinoline	0.1	95.38
Sodium azide	1.0	108.46
Phenylmethylsulfonylfluoride	0.1	100
	1.0	113.08
Hydroquinone	0.1	81.54
N-Ethylmaleimide	0.1	93.08
	1.0	80.77
EDTA	0.1	95.38
	1.0	76.15

였던 기존의 발표자료와 일치하였다.^{5,10)} 그러나, Zn-metalloenzyme인 DHP-I은 과량의 Zn²⁺ 이온을 첨가 시(1 mM) 오히려 효소 활성이 저해되었다.

다양한 화합물의 영향 - 각 화합물을 효소반응액에 첨가하여 효소 활성을 측정된 결과, chelating agent인 EDTA나 hydroquinone, 그리고 N-ethylmaleimide에 의해 효소 활성이 저해되는 것으로 보아 본 효소는 metalloenzyme이며 cysteine기가 효소 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 한편 serine기에 작용하는 PMSF는 효소 활성에 거의 영향을 주지 않았다(Table III).

분자량의 결정 - 효소의 분자량을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었으며, DHP-I의 분자량을 산출한 결과 100 kDa 정도로 추정되었다.

신규 카바페넴계 항생물질인 DWP20418의 DHP-I에 대한 안정성 평가

IPM과 MEPM의 기질농도 0.01~0.2 mM 사이에서 부분정제된 DHP-I의 반응 초기 속도를 측정하여

Table IV— The stability test of GDHP, IPM, MEPM and DWP20418 against renal dehydropeptidase-I

Compounds	Degradating percentage (%) ± S.D.*
Glycyldehydrophenylalanine (GDHP)	100
Imipenem	13.15 ± 0.26
Imipenem	100
Meropenem	13.38 ± 3.35
DWP20418	25.32 ± 7.81

* S. D. : Standard deviation

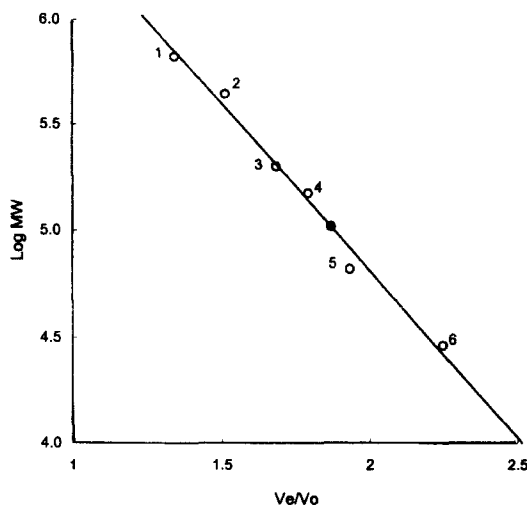


Fig. 6— Determination of molecular weight of renal dehydropeptidase-i by gel filtration chromatography. Standard protein (O): 1) bovine thyroglobulin (669 kDa), 2) horse serum apoferritin (443 kDa), 3) sweet potato β-amylase (200 kDa), 4) yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa), 5) bovine serum albumin (66 kDa), 6) bovine erythrocytes carbonic anhydrase(29 kDa) and renal dehydropeptidase-I (●).

Lineweaver-Burk plot으로 회귀하였다. 여기에서 IPM의 V_{max}/K_m 계산치를 근거로 MEPM과 DWP 20418의 분해도를 산출한 결과, 부분정제된 DHP-I에 대해 MEPM은 IPM의 13.38±3.35%, DWP20418은 IPM의 25.32±7.81% 분해되었다. 그러므로, DWP 20418이 DHP-I에 대해 IPM보다 하위기질로서 IPM보다 4배 우수한 안정성을 가지고 있으며, MEPM과 거의 유사한 수준의 안정성을 가지고 있는 것으로 평가되었다.

결 론

돼지 신장의 피질부로부터 분쇄, n-butanol 용출, (NH₄)₂SO₄ 분획, DEAE-Sephacryl CL-6B 이온교환 크로마토그래피, Sephacryl S-300 HR 크로마토그래피 단계를 거쳐 정제배율 19.25배, 회수율 19.16%로 DHP-I을 부분정제하였으며, 겔 여과 크로마토그래피를 통해 100 kDa 정도로 추정되었다. 효소 활성에 대한 최적 pH와 온도는 pH7.5와 25°C로 평가되었으며, 본 효소는 phosphate 완충액보다 Tris-HCl 완충액에서의 효소 활성이 우수한 것으로 나타났다. 효소 안정성에

있어서 본 효소는 pH7.5에서 효소 활성이 가장 안정하게 유지되었으며, pH7.0을 제외한 중성 및 약알칼리성 조건에서도 효소 활성은 비교적 안정하게 유지되었다. 또한, 온도에 대한 효소 안정성은 4°C에서 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 다른 온도 조건에서는 효소 활성이 점차 감소되어 25°C에서 3시간만에 93.06%로 효소 활성이 감소하였다. Chelating agent인 EDTA와 hydroquinone에 의해 효소 활성이 저해되고, Co^{2+} 이온 (1 mM)이나 Zn^{2+} 이온(0.1 mM)의 첨가로 인해 효소 활성이 증가되는 결과를 통해 본 효소는 알려진 바와 같이 metalloenzyme이며 1, 3, 6), 효소 분리 시나 효소 활성 측정 시에 Co^{2+} 이온이나 Zn^{2+} 이온을 첨가하는 기존의 발표자료와 일치하였다.^{5, 10)} 또한 본 효소는 N-ethylmaleimide에 의해 효소 활성이 저해되었으며 이는 cysteine기가 효소의 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. serine기에 작용하는 PMSF는 효소 활성에 거의 영향을 주지 않았다. 또한 부분정제된 DHP-I에 의해 MEPM은 IPM의 $13.38 \pm 3.35\%$, DWP 20418은 IPM의 $25.32 \pm 7.81\%$ 만이 분해되었다. 이를 통해 DWP20418이 DHP-I에 대해 IPM보다 하위기질로서 IPM보다 4배 안정성이 우수한 물질이며, MEPM과 거의 유사한 수준의 안정성을 가지고 있는 것으로 평가되었다.

문 헌

- Campbell, B. J., Lin, Y. C., Davi, R. V. and Ballow, E. : The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochem. Biophys. Acta*, **118**, 371 (1966).
- Littlewood, G. M., Hooper, N. M. and Turner, A. J. : Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Affinity purification, characterization and localization of the phospholipase C-solubilized form of the renal dipeptidase. *Biochem. J.* **257**, 361 (1989).
- Farrell, C. A., Allegretto, N. J. and Hitchcock, M. J. : Cilastatin-sensitive dehydropeptidase I enzymes from three sources all catalyze carbapenem hydrolysis and conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 253 (1987).
- Thomas, M. and Norman, P. C. : Renal catabolism of glutathione. Characterization of a particulate rat renal dipeptidase that catalyzes the hydrolysis of cysteinylglycine. *J. Biol. Chem.* **257**, 11915 (1982).
- Kim, H. S. and Campbell, B. J. : Association of renal dipeptidase with the Triton-insoluble fraction of kidney microvilli. *J. Memb. Biol.* **75**, 115 (1983).
- Mikami, H., Ogashiwa, M., Saino, Y., Inoue, M. and Mitsushashi, S. : Comparative stability of newly introduced-lactam antibiotics to renal dipeptidase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **22**, 693 (1982).
- Campbell, B. J., Forrester, L. J., Zahler, W. L. and Burks, M. : Beta-lactamase activity of purified and partially characterized human renal dipeptidase. *J. Biol. Chem.* **259**, 14586 (1984).
- Mitsushashi, S., Fuse, A., Mikami, H., Saino, Y. and Inoue, M. : Purification and characterization of human renal dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **32**, 587 (1988).
- Sugiura, M., Ito, Y., Hirano, K. and Sawaki, S. : Purification and properties of human kidney dipeptidases. *Biochem. Biophys. Acta*, **522**, 541 (1978).
- Adachi, H., Katayama, T., Inuzuka, C., Oikawa, S., Tsujimoto, M. and Nakazato, H. : Identification of membrane anchoring site human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *J. Biol. Chem.* **265**, 15341 (1990).
- Kim, H. S. and Campbell, H. J. : β -lactamase activity of renal dipeptidase against N-formimidoyl thienamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 1638 (1982).
- Hirota, T., Nishikawa, Y., Tanaka, M., Igarashi, T. and Kitagawa, H. : Simultaneous purification and properties of dehydropeptidase-I and aminopeptidase-M from rat kidney. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **49**, 435 (1985).
- Masatomo, F., Yoshihiro, S., Eiko, T. H., Tomoharu, T., Hiroshi, N., Tsuneo, K., Takao, O., Haruki, M. and Makoto, S. : Stability of meropenem and effect of 1 β -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehy-

- dropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1577 (1992).
- 14) Bradford, M. M. : A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding method. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).