

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145062 B

(21) Ansøgning nr. 1149/76 (51) Int.Cl.³ C 12 N 9/00
(22) Indleveringsdag 17. mar. 1976 C 07 G 7/00
(24) Løbedag 17. mar. 1976 // C 12 N 11/00
(41) Alm. tilgængelig 19. sep. 1976
(44) Fremlagt 16. aug. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 18. mar. 1975, 3468/75, CH

(71) Ansøger BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE, 1227 Carouge Geneve, CH.

(72) Opfinder Michel Schneider, CH.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde til udvinding af
et polypeptid fra en vandig op-
løsning.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i krav 1's indledning angivne art til udvinding af polypeptider, især enzymer, fra en vandig opløsning, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

I de sidste få år er anvendelsen af enzymer til gennemførelse af industrielle kemiske processer blevet mere udbredt. Dette kan væsentligst tilskrives udviklingen af processer til fiksering af enzymer på en bærer eller i en fast matrix, f.eks. bestående af et syntetisk formstof, der sætter enzymet i stand til let at kunne genvindes efter brugen og i mange tilfælde også muliggør en forlængelse af enzymets levetid.

DK 145062 B

Industrielle processer, hvor der anvendes enzymer, omfatter for eksempel separering af den L-isomere fra DL-methionin under anvendelse af en acylase fikseret på et polyacrylamid; fremstilling af fructose ud fra glucose under anvendelse af glucoseisomerase; fjernelse af lactose fra mælk eller valle ved hjælp af lactase fikseret på en bærer, samt fremstilling af penicillinderivater under anvendelse af penicillinamidase.

Ved disse typer fremgangsmåder muliggør fikseringen af enzymet på en bærer, at det specifikke forbrug af enzymet reduceres betragteligt, men produktets kostpris er i reglen af samme størrelsesorden, som når det fremstilles ved en ikke-enzymatisk proces. Man har imidlertid beregnet, at en sænkning af kostprisen for enzymet af størrelsesordenen 30 pct. ville gøre enzymatiske processer konkurrencedygtige i forhold til andre kendte processer.

Bortset fra nogle enkelte undtagelser, såsom proteaser, amylaser og glucoamylaser, er enzymer kostbare. Enzymernes kostpris kan reduceres på forskellige måder, især ved et passende valg af enzymkilder og ved at fremstille mutantstammer deraf. Imidlertid støder man for tiden uafhængigt af enzymets oprindelse på en vanskelighed ved ekstraktion af enzymet fra en opløsning (rå ekstrakt), der i reglen kun indeholder 10.000 - 100.000 enzymenheder pr. liter, med andre ord højst nogle få gram pr. liter (en enzymenhed defineres som regel som den mængde enzym, der kræves til at om-danne et μmol substrat pr. minut under optimale reaktionsbetin-gelser.)

Fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 6937/73 kendes en fremgangsmåde til udvinding af enzymer, ved hvilken fremgangsmåde man omsætter enzymet med en såkaldt "polyinhibitor", dvs, et vandopløseligt makromolekylært stof bestående af makromolekyler, hvortil der covalent er bundet mindst én forbindelse valgt blandt inhibitorer og substrater for det omhandlede enzym. Derefter isolerer man det dannede enzym-"polyinhibitor"-kompleks, dissocierer det isolerede kompleks og isolerer enzymet. Det er nævnt i ovennævnte ansøgnings beskrivelse, at komplekset kan isoleres ved fældning, men ikke hvorledes en sådan fældning gennemføres, og isoleringen af komplekset ved fordeling i et tofasesystem er ofte kompliceret og lidet effektivt.

I lighed med den fra ovennævnte danske patentansøgning kendte metode består fremgangsmåden ifølge opfindelsen af følgende procestrin: Man opløser i den vandige polypeptid-opløsning en vandopløselig makromolekylær forbindelse (I) indeholdende kompleksdannende grupper, der er covalent bundet til et polymerskelet. Disse grupper kan binde et polypeptid (f.eks. et enzym) selektivt og reversibelt. Ved en særlig teknik isolerer man det vandopløselige kompleks (II), som er dannet af forbindelsen I og det polypeptid, der skal ekstraheres. Derefter spaltes komplekset i sine bestanddele, dvs. i det rene polypeptid og forbindelsen (I), som kan recirkuleres.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at komplekset (II) udfældes ved simpelt hen at gøre opløsningen sur, idet der vælges en polymer (I) med sådanne kemiske egenskaber, at komplekset (II) er opløseligt ved høje pH-værdier og uopløseligt ved lave pH-værdier. Dette betyder en klar forenkling af processen i forhold til det fra ovennævnte danske patentansøgning kendte.

Særligt egnede polymere med sådanne egenskaber er polyacrylamid og carboxymethylcellulose.

De kompleksdannende grupper i den makromolekylære forbindelse (I), hvorfra polypeptidet (f.eks. et enzym) kan isoleres, er valgt blandt reversible inhibitorer samt substrater og pseudo-substrater for enzymet.

Ekstraktionen sker fra en vandig opløsning "rå ekstrakt", der foruden det enzym eller de enzymer, som man ønsker at ekstrahere, kan indeholde andre proteiner, nucleinsyrer, metabolitter, mineralsalte, polysaccharider samt mange andre uorganiske og organiske stoffer. Man kan anvende rå ekstrakter fra en hvilken som helst kilde, især sådanne, som på i og for sig kendt måde er opnået ud fra mikroorganismekulturer efter nedbrydning af cellerne og ekstraktion af proteinerne eller fra homogenisater af animalsk væv eller ud fra planteekstrakter.

Udtrykket "kompleks" skal opfattes som en kombination af sammenbundne molekyler, og angiver ikke nogen særlig bindingsmetode.

Udtrykket "reversibel enzyminhibitor" betegner en forbindelse, hvis molekyler har den egenskab, at de kan fikseres selektivt, reversibelt og ikke-ødelæggende til et givet enzym eller til en veldefineret klasse af enzymer ved hjælp af en kemisk binding, der er lokaliseret på et veldefineret sted i enzyemmolekylet, hvorved det temporært reducerer enzymets katalytiske aktivitet. Eftersom denne fiksering er reversibel og ikke-ødelæggende, vil den hverken ødelægge eller beskadige enzymet, og enzyemmolekylerne kan senere separeres fra inhibitormolekylerne under genvinding af deres oprindelige katalytiske aktivitet.

Udtrykket "substrat" betegner den forbindelse, over for hvilken enzymet udviser sin specifikke katalytiske aktivitet. En sådan forbindelse kan anvendes, når den fikseres til enzymet under betingelser, hvor enzymets katalytiske aktivitet er inhiberet, f.eks. på grund af fravær af en given metalion, under en vis temperatur, i et veldefineret pH-område, etc. Et "substrat" kan også anvendes i de tilfælde, hvor enzymet kun reagerer under samtidig tilstedeværelse af to substrater (hvoraf det ene f.eks. er en elektrondonor, mens det andet er en elektron-acceptor), og hvor et af disse to substrater ikke desto mindre er i stand til at fikseres i tilstrækkelig grad til enzymet i fravær af et andet substrat.

Ved "pseudosubstrat" (substrat-analog) menes en forbindelse, hvis kemiske struktur minder tilstrækkeligt om det specifikke substrat for enzymet til, at den kan fikseres til enzymet uden at enzymet har nogen nævneværdig katalytisk aktivitet over for denne.

Som reversibel enzyminhibitor kan man for eksempel anvende en af de følgende forbindelser:

p-aminophenyl-thiogalactosid (en β -galactosidase-inhibitor) og p-aminobenzoesyre (en tyrosinaseinhibitor).

Som substrat kan man for eksempel anvende poly-L-lysin (et substrat for pepsin), nicotinamid-adenin-dinucleotid eller "NAD" (et elektronacceptor-substrat for enzymer tilhørende dehydrogenase-familien, hvis enzymatiske aktivitet kun udøves i nærvær af "NAD").

Som pseudo-substrat kan man for eksempel anvende D-asparagin (en substrat-analog for L-asparagin).

Eksempler på anvendelsen af inhibitorer, substrater og pseudo-substrater for enzymer, til anvendelse ved rensning af enzymer ved affinitetskromatografi og ved anvendelse af disse forbindelser i podet tilstand på faste syntetiske formstoffer, er især anført i "Biological aspects of reactions on solid supports" af George R. Stark (1971 - Academic Press, New York and London), kapitel 2 af Pedro Cuatrecasas, og i M. Wilchek and W.B. Jakoby, Methods in Enzymology, Vol. 34, p. 3 (1974).

For at danne den molekylære forbindelse (I) kan molekyler af forbindelsen, der er i stand til at fiksure polypeptidet, podes på et passende polymert materiale. Den makromolekylære forbindelse (I) kan også dannes ved at polymerisere en monomer, hvis molekyler består af en polymeriserbar enhed, f.eks. en vinylgruppe, hvortil der ved covalente bindinger er bundet mindst ét molekyle af forbindelsen, der er i stand til at fiksure polypeptidet.

Som polymert materiale, hvorpå man kan pode forbindelsen, der er i stand til at fiksure enzymet, anvendes ifølge opfindelsen et vandopløseligt stof, såsom carboxymethylcellulose, polyacrylamid, polyethylenglycol, en polyamin, polyvinylalkohol eller dextran.

Molekyler af forbindelsen, der er i stand til at fiksure enzymet, kan podes på molekyler af polymermaterialet, enten direkte eller via molekyler af en hjælpeforbindelse, der er lineær og har en passende kædelængde (f.eks. molekyler, som i det mindste delvis består af en alifatisk carbonhydriddkæde).

Molekylerne fra hjælpeforbindelsen virker som "adskillelsesarmer" eller "forankringsarme" i den makromolekylære forbindelse (I) og muliggør, at enzyemmolekylerne knyttes til molekylerne i den molekylære forbindelse (I). I fravær af sådanne adskillelsesarmer vil visse enzyemmolekyler ikke være i stand til at knyttes til den makromolekylære forbindelse (I) på grund af sterisk hindring.

Den ovennævnte bog beskriver talrige eksempler på den måde, hvor molekyler af mindst én forbindelse, der er i stand til at fikseres et enzym, kan podes på et syntetisk polymert organisk materiale, der er vandopløseligt, såvel ved direkte podning som ved podning via adskillelsesarmer eller forankringsarme.

Ved gennemførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan man anvende de samme teknikker som beskrevet i ovennævnte bog, idet man dog anvender et polymert materiale, der er opløseligt i vand, i stedet for et fast materiale, der er vandopløseligt.

For eksempel kan molekyler af p-aminophenyl- β -D-thiogalactopyranosid podes på polyacrylamid, eller molekyler af p-aminophenol kan podes på carboxymethylcellulose via molekyler af N-bromacetyl-ethylendiamin, eller molekyler af p-aminobenzoesyre (tyrosinaseinhibitor) kan podes på polyacrylamid via molekyler af 6-aminocaprønsyre.

Til omsætning af den makromolekylære forbindelse (I) med det polypeptid, der skal ekstraheres, kan man anvende en hvilken som helst passende metode. F.eks. kan man simpelt hen blande en vandig opløsning af den makromolekylære forbindelse (I) med den vandige opløsning af polypeptidet, eller man kan variere i det mindste én parameter, såsom ionstyrken, temperatur eller pH i det flydende medium indeholdende den makromolekylære forbindelse (I) og polypeptidet.

Ifølge opfindelsen frasepareres komplekset (II) ved variation af pH-værdien i det flydende medium indeholdende komplekset (II) og polypeptidet. Nærmere bestemt gøres mediet surt, hvilket på grund af de kemiske egenskaber af den anvendte forbindelse (I) vil få komplekset (II) til at udfælde.

For at dissociere komplekset (II) til molekyler af polypeptidet og molekyler af den makromolekulære forbindelse (I) og fraseparere polypeptidmolekylerne fra kompleksmolekylerne kan man anvende en hvilken som helst i og for sig kendt metode, især en genopløsning af komplekset (II) efter fældningen og om nødvendigt en rensning samt en ændring af ionstyrken af den opnåede opløsning, eller man kan udsætte opløsningen for dialyse eller ultrafiltrering.

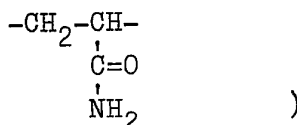
Opfindelsen illustreres nærmere ved nedenstående eksempler:

EKSEMPEL 1

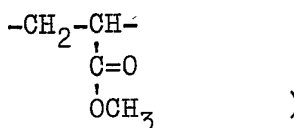
A. Fremstilling af den makromolekulære forbindelse (I):

(a) Anvendte udgangsmaterialer:

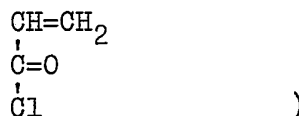
A1: polyacrylamid (en vandopløselig polymer dannet af lineære macromolekyler med gentagelsesenheden:



A2: methylester af polyacrylsyre (en vandopløselige polymer dannet af lineære makromolekyler med gentagelsesenheden:

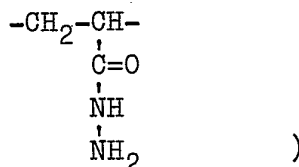


A3: acryloylchlorid (monomer forbindelse med formelen:

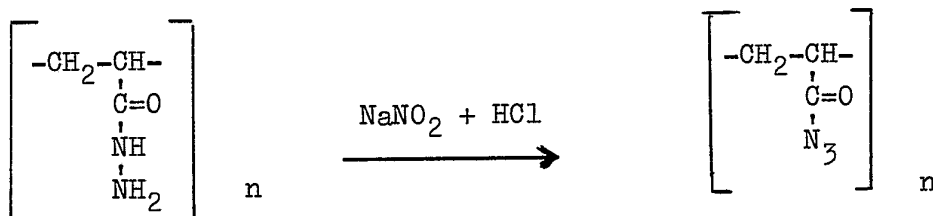


(b) Operationsmetoder:

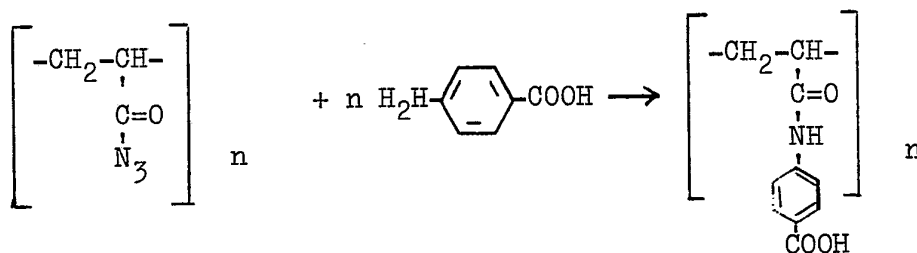
A1 og A2: Man omsætter det makromolære udgangsmateriale med hydrazin ved en temperatur på henholdsvis 50°C (A1) og 90°C (A2) til opnåelse af et polyacrylamid-hydrazid (en polymer dannet af lineære makromolekyler med gentagelsesenheden:



og omdanner derpå polyacrylamid-hydrazidet til det korresponderende azidderivat ved omsætning ved 0°C i nærvær af en blanding af saltsyre og natriumnitrit efter reaktionskemaet:

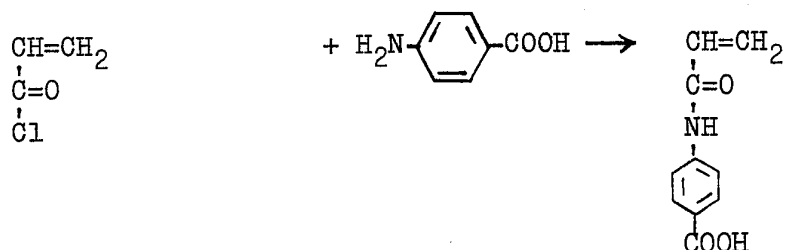


hvor n repræsenterer antallet af gentagelsesenheder pr. molekyle makromolekylært stof, og derpå omsætter polyacrylamid-azidet ved 0°C med p-aminobenzoesyre i vandigt medium ved pH 9,4:



(makromolekylær forbindelse (I))

A3: reaktion mellem acryloylchlorid og p-aminobenzoesyre:



efterfulgt af polymerisation af den således opnåede monomer i et vandigt medium under en nitrogenatmosfære og i nærvær af ammoniumpersulfat, der katalyserer polymerisationen.

Den polymere, opnået ved en hvilken som helst af de ovennævnte metoder, underkastes ultrafiltrering gennem en ultrafiltreringsmembran, der tillader molekyler med en molekylvægt på under 50.000 at passere (f.eks. en membran af typen "XM 50" forhandlet af AMICON Compan), og man anvender polymerfraktionen, der passerer over i filtratet.

B. Ekstraktion af tyrosinase fra en vandig opløsning

30 mg af den makromolekylære forbindelse (I) opnået som beskrevet under A opløstes i 100 ml vandig saltopløsning (0,05 M NaCl) med pH 7,2 indeholdende 100 mg okse-serum-albumin og 1 mg tyrosinase (enzymaktivitet 900 enheder). Efter at den makromolekylære forbindelse (I) var fuldstændigt opløst, sænkedes det flydende mediums temperatur til 0 °C, og pH reduceredes langsomt til 4,5 ved gradvis tilsætning af en vandig citronsyreopløsning. Når pH nåede 4,5, observeredes dannelsen af et bundfald (kompleks II). Dette bundfald separeredes fra væskefasen ved centrifugering ved 2.000 o/min., og centrifugeringsbundfaldet udvaskedes to gange med 0,5 M natriumchloridopløsning, idet pH holdtes ved 4,5 og temperaturen ved 0 °C. Der kunne ikke bestemmes nogen enzymatisk aktivitet hidrørende fra tyrosinase hverken i overvæsken over centrifugeringsbundfaldet eller i vaskevæsken for bundfaldet, mens man på den anden side let kunne bestemme tilstedeværelsen af okse-serumalbumin i disse væsker.

Efter udvaskningen af centrifugeringsbundfaldet genopløstes dette i 20 ml af en vandig natriumpyrophosphatopløsning indeholdende 50 mmol/l og med pH 8,8, og den således opnåede opløsning underkastedes ultrafiltrering gennem en membran, der kun tillod molekyler med en molekylvægt på under 50.000 at passere.

Tyrosin forblev i retentatet, selv om resten af molekylerne af kompleks (II), nemlig molekyler af den makromolekylære forbindelse (I), passerede over i filtratet, hvilket muliggjorde, at de kunne genanvendes ved en senere ekstraktionsoperation.

Det således opnåede tyrosinase havde en enzymatisk aktivitet, der svarende til ca. 40 pct. af udgangsopløsningen, samtidig med, at det var blandet med 1,6 mg proteiner (bestemt efter Lowry's metode). Den opnåede rensningsfaktor var således 25.

EKSEMPEL 2

A. Fremstilling af den makromolekylære forbindelse (I)

(a) Udgangsmaterialer:

carboxymethylcellulose-hydrazid (en vandopløselig polymer);

(b) Operationsmetode:

Carboxymethylcellulose-hydrazidet omdannedes til det korresponderende azid-derivat ved omsætning ved 0°C i nærvær af en blanding af saltsyre og natriumnitrit og påfølgende omsætning af azidet i vandigt medium ved pH 8,7 og 0°C med en blanding af o-aminobenzoesyre og trypsin-inhibitor, nemlig en sojaekstrakt (en inhibitor af peptidtypen med en molekylvægt af størrelsesordenen 23.000). (0,1 g o-aminobenzoesyre og 0,1 g soja-inhibitor anvendtes pr. 1 g oprindeligt anvendt hydrazid-derivat).

På denne måde opnåedes en vandopløselig polymer, der både indeholder molekyler af o-aminobenzoesyre og molekyler af trypsininhibitor, dvs. sojaekstrakt, bundet til polyanhydroglucosekæden i

det som udgangsmateriale anvendte makromolekylære stof ved adskillelsesarme med formlen $-O-CH_2-CO-NH-$.

B. Ekstraktion af trypsin fra en vandig opløsning

20 mg af den makromolekylære forbindelse (I) opnået som beskrevet under A opløstes i 100 ml af en vandig saltopløsning (0,04 M NaCl) med pH 7,2 og indeholdende 100 mg okse-serum-albumin og 1 mg trypsin (enzymatisk aktivitet 7.200 enheder). Efter at den makromolekylære forbindelse (I) var fuldstændigt opløst, sænkedes det flydende mediums temperatur til 0 °C, og pH reduceredes langsomt til 3,7 ved tilsætning af en vandig eddikesyreopløsning. Der opnåedes på denne måde et bundfald (kompleks II), der separeredes fra væsken ved centrifugering (2.000 o/min.), og centrifugeringsbundfaldet udvaskedes med en vandig natriumchloridopløsning (0,5 M), mens pH holdtes ved 3,7 og temperaturen ved 0°C. Det således udvaskede centrifugeringsbundfald suspenderes i 0,5 M natriumchloridopløsning, og pH i den således opnåede suspension sænkedes til 2,12 ved tilsætning af en vandig saltsyreopløsning. Suspensionen centrifugeredes derpå (2.000 o/min.), og overvæskefasen opsamledes. Dennes enzymatiske aktivitet androg cirka 23 pct. af udgangsopløsningen, og overvæsken indeholdt 5,2 mg protein. Rensningsfaktoren for trypsin var således 4,4.

EKSEMPEL 3

A. Fremstilling af den makromolekylære forbindelse (I)

1 g polyacrylamid-azid opnået som beskrevet i eks. 1 omsattes med en vandig opløsning indeholdende 0,1 g o-aminobenzoesyre og 0,1 g trypsin i et vandigt medium ved pH 9,8 og 0 °C.

B. Ekstraktion af sojainhibitor fra en vandig opløsning

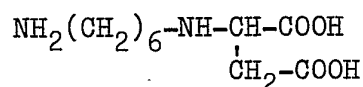
Man anvendte den makromolekylære forbindelse (I) fremstillet som under A ved en fremgangsmåde analogt med eks. 2, idet man dog anvendte 1 mg trypsin-inhiberende sojaekstrakt i stedet for trypsin i den vandige udgangsopløsning. Der opnåedes en

vandig opløsning med en inhiberende virkning over for trypsin svarende til 28% af virkningen af udgangsopløsningen og indeholdende 4,5 mg proteiner.

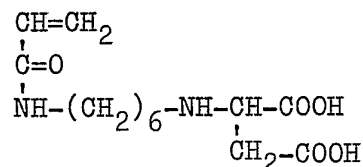
EKSEMPEL 4

A. Fremstilling af den makromolekylære forbindelse (I)

N(*N*-aminohexyl)-L-asparaginsyre



omsattes med acrylsyrechlorid til opnåelse af en monomer med formelen:



Denne monomer polymeriseredes i et vandigt medium under en nitrogenatmosfære og i nærvær af ammoniumpersulfat som katalysator. Den således opnåede polymer I) underkastedes ultrafiltrering gennem en membran, hvis porer har en størrelse på 0,5 μm , og retentatet opsamles.

B. Ekstraktion af asparaginase fra en vandig opløsning

30 mg af den makromolekylære forbindelse (I) opnået under A opløstes i 100 mg af en vandig 0,05 M natriumchloridopløsning med pH 7,2 indeholdende 100 mg okse-serumalbumin og 1 mg asparaginase (enzymatisk aktivitet: 210 enheder).

Det makromolekylære kompleks (II) opnået ved fiksering af asparaginase-molekyler til den makromolekylære forbindelse (I) i opløsning udfældedes ved indstilling af pH i det flydende medium til 4,5, og den således opnåede suspension centrifugeredes ved 2.000 o/min. Centrifugeringsbundfaldet udvaskedes, mens pH holdtes ved 4,5, og opløstes derpå i en vandig 0,01 mM natriumchloridopløsning, endvidere indeholdende 0,01 M natriumacetat,

og med pH 7,0. Den således opnåede opløsning ultrafiltreredes gennem en membran med porediameter 0,05 μm , og den tilbageholdte fraktion udvaskedes med en tilstrækkelig mængde af den ovennævnte vandige saltopløsning til, at der ikke længere viste sig spor af proteiner i det endelige filtrat. En vandig opløsning med pH 7,0 indeholdende 70 mmol L-asparaginsyre og 10 mmol natriumacetat pr. liter sættes til den tilbageholdte fraktion. På denne måde fraspaltedes asparaginase fra kompleks (II), og dette enzym forekom derefter i filtratet. Der opnåedes således en vandig opløsning af asparaginase med en enzymatisk aktivitet svarende til 65 pct. af udgangsopløsningens og kun indeholdende 1,8 mg proteiner (bestemt efter Lowry's metode).

Det skal bemærkes, at selv om der i den foregående beskrivelse kun er anført eksempler, der illustrerer anvendelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved ekstraktion af enzymer eller polypeptid-enzyminhibitorer fra en vandig opløsning, så kan fremgangsmåden også anvendes til ekstraktion af andre typer polypeptider, især antistoffer eller antigener, polypeptid-hormoner, såsom insulin, og proteiner, såsom albumin, glycoproteiner og lecitiner.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til udvinding af et polypeptid, fortrinsvis et enzym, fra en vandig opløsning, hvori man opløser en vandopløselig makromolekylær forbindelse (I) indeholdende covalent bundne kompleksdannende grupper, som kan fikserer polypeptider selektivt og reversibelt, til dannelse af et vandopløseligt kompleks (II) mellem forbindelsen (I) og polypeptidet, hvorefter man isolerer komplekset (II) og dissocierer det i sine bestanddele til opnåelse af polypeptidet og forbindelsen (I) i ren tilstand, og om ønsket recirkulerer forbindelse (I), k e n d e t e g n e t ved, at man isolerer komplekset (II) ved udfældning ved at gøre opløsningen sur.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det makromolekylære skelet i den anvendte forbindelse (I) er valgt blandt polyacrylamid og carboxymethylcellulose.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den anvendte makromolekylære forbindelse (I) er dannet ved polymerisation af en monomer, hvis molekyler består af en polymeriserbar del, hvortil der ved covalent binding er fikseret mindst ét molekyle af forbindelsen, der er i stand til at fikserer polypeptidet.

Fremdragne publikationer:

DK ans. nr. 6937/73.