

NORGE



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningskrift nr. 127626

Int. Cl. C 12 d 13/10 Kl. 6a-22/04

Patentsøknad nr. 5158/68 Inngitt 23.12.1968

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 28.6.1969

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 23.7.1973

Prioritet begjært fra: 27.12.-67, 6.4.-, 6.5.-,
16.7.-, 9.11.1968 Forbundsrepublikken
Tyskland, nr. P 16 42 615, P 17 67 157,
P 17 67 158, P 17 67 389, P 17 92 043,
P 18 08 042

Bayer Aktiengesellschaft,
D-509 Leverkusen-Bayerwerk, Forbundsrepublikken
Tyskland.

Oppfinnere: Otto Wagner, Varresbeckerstr. 12, Wuppertal-
Elberfeld, Klaus Bauer, Briller Höhe 16,
Wuppertal-Elberfeld, Wilfried Kaufmann,
Friedrich-Bayerstr. 15, Wuppertal-Vohwinkel,
Erich Rauenbusch, Tersteegenweg 9, Wuppertal,
Alfred Arens, Pahlkestr. 15, Wuppertal-Elberfeld og
Eckart Irion, Claudiusweg 9, Wuppertal-Elberfeld,
Forbundsrepublikken Tyskland.

Fullmektiq: Bryns Patentkontor A/S

Fremgangsmåte til selektiv anrikning og rensning av
L-asparaginase og spesielt til fremstilling av
krystallinsk L-asparaginase.

L-asparaginase er kjent i form av et mer eller mindre
rått enzympreparat. Det ble ekstrahert og anrikt etter vanlige
metoder fra enzymkjemien fra dyriske eller plantematerialer. Enzymet
spalter amidbindingen i L-asparagin, idet det oppstår L-asparaginsyre
og ammoniakk. Man kan bestemme ammoniakken kolorimetrisk med Nessler's
reagens og har derved en målemetode for L-asparaginase (Cancer
Research 26, 2213-17 (1966)).

Da L-asparaginase-enheten ennå ikke er blitt definert
helt overensstemmende, skal den her fastlegges på følgende måte:

En enhet (minuttenhet) L-asparaginase er den mengde som
ved 37°C og ved pH 7,2 i løpet av 1 minutt avspalter 1/10 mol ammoni-
akk fra L-asparagin. Såvidt det fremgår av litteraturen er det

127626

hittil beskrevet L-asparaginase-preparater som maksimalt inneholder ca. 33 enheter/mg (Biochemistry 6, 721 (1967)).

Fremstillingen har foregått bl.a. fra E. Coli-celler, hvorav man frigjorde enzymet ved behandling med ultralyd og pratielt mettet den rå oppløsning med ammoniumsulfat. Herved utsaltes enzymet og kan deretter videreanrikes ved hjelp av i enzymkjemien vanlig søylekromatografi. L-asparaginase har etter injeksjon en virkning mot slike svulster som for sin vekst krever L-asparagin. Det anvendes i stigende grad klinisk uten at det hittil var mulig å stille de hertil nødvendige mengder til disposisjon (Proc. N.A.S. 56, 1516-19 (1966)). Det har fått stor betydning til bekjempelse av malign vekst i medisinen.

Fra britisk patent nr. 1.006.258 er det kjent at man kan utfelle proteiner fraksjonert ved hjelp av polyetylenglykoloppløsninger.

Overraskende ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er det faktum at ved hjelp av en to gangers utfelling av råasparaginase med polyetylenglykoloppløsninger utfelles L-asparaginase selektivt og sluttproduktet fåes i injiserbar form og de mange andre (ca. 1000) enzymer som inneholdes i en E.coli-celle medutfelles ikke.

Oppfinnelsen vedrører altså en fremgangsmåte til selektiv anrikning og til rensning av L-asparaginase og spesielt til fremstilling av krystallinsk L-asparaginase, idet fremgangsmåten er karakterisert ved at man, fortrinnsvis etter adskillelse av pyrogener, blander rå vandige oppløsninger av L-asparaginase, eventuelt etter tilsetning av et vannoppløselig amid, fortrinnsvis urinstoff, med polyetylenglykol av molekylvekt 1000-6000 og fraskiller den dannede L-asparaginaseholdige utfelling, eventuelt vidererenser og bringer L-asparaginase til krystallisasjon.

Hvis man bare frembringer utfellinger i de rå vandige L-asparaginaseoppløsninger med polyetylenglykol og spalter disse etter i og for seg kjente metoder, går man ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen frem således at man blander de rå enzymoppløsninger som inneholder 1-30, fortrinnsvis 1-10% L-asparaginase, med vandige oppløsninger av polyetylenglykol. Herved ligger utfellingsoppløsningens optimale konsentrasjon ved 40-60% etylenglykol; det kan imidlertid også anvendes oppløsninger av vesentlig lavere konsentrasjon. Den optimale molekylvekt av den anvendte polyetylenglykol ligger mellom 1000 og 6000.

127626

De nevnte vandige polyetylenglykoloppløsninger tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 15-40%, fortrinnsvis 18-30% polyetylenglykol. Det sediment som danner seg slynger man av, til den overstående klare oppløsning setter man ytterligere polyetylenglykoloppløsning, slynger igjen av og gjentar denne prosess så ofte som ønskelig. Noen av disse ved denne fraksjonering dannede utfellinger inneholder overveiende biologisk aktivt materiale ved siden av mindre mengder inerte proteiner. Utfellingenes rensning for vedhengende polyetylenglykol kan foregå således at man oppløser dem i vann, befir oppløsningen for uoppløselige bestanddeler og utfeller med et overskudd aceton. Herved utfnokkes L-asparaginase, mens polyetylenglykol forblir i oppløsning. Det er også mulig å utfelle med andre oppløsningsmidler som f.eks. med lavere alkoholer. På den annen side kan man fra oppløsningen av utfellingen ekstrahere polyetylenglykolen med slike oppløsningsmidler som ikke denaturerer enzymet og som ikke er blandbare med vann, f.eks. med diisopropyleter. Videre er det mulig fra den oppløste utfelling å fjerne polyetylenglykolen ved dialyse og utvinne enzymet ved frysetørkning av den ikke dialyserbare del. Det er også mulig å tørke utfellingen og deretter å ekstrahere med aceton eller andre oppløsningsmidler.

Hensiktsmessig utfører man disse operasjoner ved en temperatur som kan ligge mellom 0 og +40°C. Enzymets utfelling fra de vandige oppløsninger er uavhengig av pH-verdien. Man arbeider hensiktsmessig i pH-områder mellom 4 og 10.

Av en amerikansk arbeidsgruppe ble det i året 1967 omtalt en fremgangsmåte til delvis fraksjonering av serum resp. plasma med polyetylenglykol (Fed.Proc. 1967, side 3218).

Den selektive utfelling av et bestemt enzym som f.eks. av L-asparaginase med polyetylenglykoloppløsninger er hittil imidlertid uten analogi i enzymkjemien.

Fordelen ved den nye fremgangsmåte i forhold til de hittil kjente metoder, f.eks. den kjente utfelling med ammoniumsulfat, til anrikning av L-asparaginase er å se i følgende punkter:

1. Man kan praktisk talt anvende ønskelige mengder rå-asparaginase uten derved å nedsette utbyttene.
2. Man arbeider i meget konsentrerte vandige oppløsninger. Derved kan enzymet lett utvinnes ved felling med oppløsningsmidler eller ved frysetørkning i anriket form.
3. Man kan lett fjerne overskytende polyetylenglykol med oppløsningsmidler.

127626

4

4. Fremgangsmåten er et vesentlig trinn på veien mot utvinning av krystallisert asparaginase.

De omtalte metoder fører i to utfellingstrinn fra rå-asparaginasen med ca. 3 til 4 E/mg stoff til produkter av en renhetsgrad på 70 til 80 E/mg stoff.

For den kliniske anvendelse av L-asparaginase er det nødvendig å tilnærme den i praksis oppnåelige renhetsgrad til den maksimale verdi, idet fremgangsmåten til å oppnå dette mål må være overførbart til tekniske dimensjoner.

Det ble nå videre funnet at man kan vesentlig forbedre polyetylenglykolutfellingens selektivitet, når man til L-asparaginaseoppløsningen før utfellingen setter urinstoff eller andre amider som spalter hydrogenbrodannelser.

Fra disse oppløsninger utfelles L-asparaginasen først ved relativt høye konsentrasjoner på ca. 150 til 200 g polyetylen-glykol/liter oppløsning, mens inerte proteiner og andre forurensninger utfelles ved meget lavere, nemlig ved de samme konsentrasjoner som ved utfelling av urinstofffri oppløsning.

Hensiktsmessig utfører man disse operasjoner ved en temperatur som kan ligge mellom -4 og $+40^{\circ}\text{C}$. Enzymets utfelling fra de vandige oppløsninger er i pH-området fra 6 til 10 uavhengig av pH-verdien.

Det i sedimentet fra polyetylenglykolutfellingen gjenblivende urinstoff kan f.eks. fjernes ved sedimentets opptak i vann og etterfølgende fornyet polyetylenglykolutfelling.

Istedenfor urinstoff kan det også anvendes andre amider som oppløser hydrogenbrodannelser, f.eks. guanidin, formamid, acetamid og andre vannoppløselige amider. Den deaggregerende virkning av urinstoff og andre amider på proteiner omtales på mange steder (f.eks. J.Biol.Chem. 123, 1938, side 543).

Fordelen ved det nevnte ekstra fremgangsmåtettrinn består i følgende punkter:

1. Man kommer med to utfellingstrinn til en renhetsgrad for L-asparaginase som ikke var mulig tidligere i teknisk målestokk.
2. Ved den oppløsningsformidlende egenskap av f.eks. urinstoff kan det arbeides i høyere konsentrerte vandige L-asparaginaseoppløsninger, hvorved den tekniske fremgangsmåte blir betraktelig enklere.
3. Resultatene av en polyetylenglykolutfelling blir bedre reprodu-

serbare i nærvær av f.eks. urinstoff tross vekslende beskaffenhet av råasparaginasen.

4. Fremgangsmåten er et meget vesentlig tinn på veien mot utvinning av krystallisert asparaginase. Det lykkes med de dertil vanlige metoder fra proteinkjemien, f.eks. ved utfelling med MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aceton osv. å bringe enzymet til krystallisering.

Videre er det nå blitt funnet at man ytterligere kan forbedre L-asparaginasens renhet, når man underkaster det ved hjelp av polyetylenglykolutfelling til en aktivitet fra 100 til 150 U/mg protein forrensede enzym for en utfelling ved enzymets isoelektriske punkt.

Ved dets isoelektriske punkt på ca. pH 4,9 har enzymet en mindre oppløselighet enn alle øvrige i oppløsningen ennå tilstedeværende proteiner. Dette fører til utfнокking av L-asparaginase, som man kan understøtte ved tilsetning av mindre mengder polyetylenglykol eller av vannblandbare organiske oppløsningsmidler. Hensiktsmessig gjennomfører man disse operasjoner, idet man innstiller pH-verdien ved ca. 4,9 til 5,5 og foretar utfellingen ved lave temperaturer.

Fordelen ved en slik fremgangsmåte i forhold til de nevnte rene eller modifiserte polyetylenglykolmetoder ligger i det følgende:

1. Man behøver ingen eller bare små mengder av utfellingsmidlet.
2. Man kommer idet det gæes ut fra en spesifikk aktivitet av L-asparaginasen rundt 100 til 150 E/mg protein til en spesifikk aktivitet inntil 190 E/mg protein.
3. Metoden gir utgangsproduktet for krystallisering av L-asparaginase.

Ved fremstilling av L-asparaginase-preparatet f.eks. av E.coli ifølge metoder som er blitt beskrevet av Campbell og medarbeidere (Biochemistry 6, (1967), side 721 til 730, hvor det er angitt ytterligere litteratur) medbringes pyrogener fra colicellene i sluttproduktet.

Likeledes er det mulig at under opparbeidelsen, som for en stor del må foregå i vandig medium, kommer forurensninger inn i L-asparaginasepreparatene, som virker pyrogene. Tross mange anstrengelser er det hittil ikke lykkes å få pyrogenfritt L-asparaginase. Også de vanlige metoder til å fjerne pyrogener som filtrering over klaresjikt, adsorpsjonsmetoder med hydroksylapatit, aluminiumhydroksyd, silikater, videre med kunstharpikser, førte ikke til resultat. Selv kromatografi på dekstrangeler uten ioniserte grupper

eller på dietylaminioetyl-cellulose ifølge Campbell var resultatløse.

Det er nå blitt funnet at man kan fjerne pyrogenene fra råe L-asparaginasepreparater ved hjelp av dietylaminioetyl-dekstrangler (DEAE-dekstrangel), idet man oppløser enzymet i puffere av lav ionestyrke, har den således dannede oppløsning enten etter den kromatografiske metodikk på en søyle av det svellede og med samme puffer ekvilibrerte dekstrangel og fraksjonerer L-asparaginasen gjennom økende saltkonsentrasjon og eluerer, eller blander den med dekstrangel, filtrerer eller sentrifugerer suspensjonen og eluerer det på gelen bundne enzym med egnede puffere av høyere saltkonsentrasjon.

Ved den kromatografiske fremgangsmåte oppløser man det rå enzympreparat i ca. 0,02 M-puffere, fortrinnsvis ammoniumacetat eller formiat-puffere, i det nøytrale eller lett alkaliske område, ca. pH 7 til 8,5, idet den dannede oppløsning ikke bør være for konsentrert. Fortrinnsvis anvendes 1- til 2%-ige oppløsninger av enzym.

Dekstrangelen svelles på forhånd i samme puffer og ekvilibreres ved flere gangers veksling av pufferen. Det fylles derpå i kromatografisøyle, idet forholdet mellom diameter og laghøyde utgjør 1 : 3 til 1 : 30. Enzymoppløsningen has på søylen idet gjennomløpshastigheten utgjør 2 til 4 ml/time og pr. cm² tverrsnitt av søylen. Elueringen gjennomføres med stigende saltinnhold av pufferen, best med en lineær gradient; det er imidlertid likeledes mulig trinnvis å øke elueringsmidlets konsentrasjon. Enzymet elueres med acetationer ved konsentrasjoner på 0,08 M og høyere.

Rensningen lar seg også gjennomføre i batch-fremgangsmåte, idet man har enzymoppløsningen til den svellede DEAE-dekstrangel og innstiller pH på 7,5. Enzymet absorberes herved av gelen og kan etter grundig utvaskning av gelen elueres på en nutsj eller ved hjelp av en sentrifuge med saltoppløsninger av egnet konsentrasjon. Fordelen ved denne fremgangsmåte i forhold til søylefremgangsmåten er at man kan arbeide enklere med større mengder. Ulempen består i en mindre eksakt mulig adskillelse fra følgestoffer og den for elusjon nødvendige større væskemengde.

Isoleringen av L-asparaginase fra oppløsningen i fast form kan foregå etter kjente metoder, som f.eks. frysetørkning, eventuelt etter dialyse og ved utfelling med polyetylglykol eller aceton.

Ved denne fremgangsmåten får man idet det gåes ut fra

127626

preparater med ca. 20 til 100 E/mg, renpreparat med 180 til 220 E/mg protein, som er fri for pyrogene følgestoffer. Disse preparater er egnet til anvendelse i kjemoterapien.

En ytterligere metode til en sterk befrielse av L-asparaginase for pyrogener består i at man oppvarmer enzymoppløsningen fortrinnsvis i en konsentrasjon på 0,5 - 15%, i nærvær av en aminosyre, fortrinnsvis glycin, ved en pH-verdi mellom 7,0 og 9,2, fortrinnsvis mellom 8 og 9 ved 40 til 61°C, befri oppløsningen for utfelte følgestoffer og deretter gjennomfører en utfelling ved pH 4,5 til 5,5 med polyetylenglykoloppløsning.

For gjennomføring av fremgangsmåten settes det til de 0,5 - 15%-ige oppløsninger av L-asparaginase en aminosyre, fortrinnsvis glycin, i mengder fra 1 til 10% ved temperaturer fra -10 til +65°C. Denne oppløsnings Ph-verdi innstilles til 8 til 9. Hensiktsmessig holdes oppløsningen deretter ved +50°C i 1 til 5 dager. Den overstående oppløsning innstilles på pH 5,2 og felles med polyetylenglykol. Det således dannede materiale består av anrikt, pyrogenfri resp. pyrogenfattig L-asparaginase.

Denne fremgangsmåten byr på følgende fordeler:

1. Pyrogenene lar seg fjerne bedre enn etter de tidligere kjente metoder.
2. Samtidig med pyrogenenes fjerning økes betraktelig den spesifikke aktivitet av enzymet L-asparaginase.

Også en ytterligere fremgangsmåte til fremstilling av pyrogenfri L-asparaginase nyttiggjør seg glycinets stabiliseringsvirkning. Ved denne fremgangsmåte oppvarmes enzymet i nærvær av en aminosyre, spesielt av glycin, og en lavere alifatisk alkohol, fortrinnsvis metanol, ved en pH-verdi mellom 7,0 og 9,2 ved 40 til 61°C, oppløsningen befri for utfelte følgestoffer og deretter gjennomføres en felling ved pH 4,5 til 5,5 med polyetylenglykoloppløsning. En tilsetning av 4 til 40%, fortrinnsvis 10% av en lavere alifatisk alkohol, fortrinnsvis metanol, fører til en sterk denaturering av fremmedproteinene.

Denne fremgangsmåte byr den mulighet å få fjernet inerte følgeproteiner som er vanskelig å fraskille og som tilskrives en høy antigen virkning.

For gjennomføring av denne fremgangsmåte blir L-asparaginasen, fortrinnsvis slike som med polyetylenglykol er bragt til en renhetsgrad på ca. 160 til 220 E/mg, innbragt i en 0,5 til 15%-ig

127626

vandig oppløsning. Det tilsettes f.eks. 10 volum% metanol og ca. 3 vekt% glycin. pH-verdien innstilles til 8 til 9. Hensiktsmessig holdes oppløsningen deretter ved $+50^{\circ}\text{C}$ i 1 til 5 dager. Den overstående oppløsning innstilles til pH 5,2 og utfelles med polyetylen-glykol. Det således dannede materiale består av anriket pyrogenfri resp. pyrogenfattig L-asparaginase.

Den som utgangsmateriale anvendte rå-L-asparaginase utvinnes på følgende måte:

10%-ig maissvellevannoppløsning (referert til tørrstoff) innstilles med 2-n kalilut til pH 7,0, oppvarmes 20 minutter ved 120°C og klares etter avkjøling i overløpssentrifuge. 30 liter av denne klare maissvellevannoppløsning fortynnes med 170 liter springvann. Etter tilsetning og oppløsning av 1,20 kg natriumlaktat og 400 g ammoniumsulfat steriliseres den dannede næringsoppløsning i et fermenteringskar i 40 minutter ved 110°C , avkjøles deretter og podes med 500 cm^3 av en i 18 timer ved 30°C dyrket rystekultur av *Escherichia coli* ATCC 9637 i næringsbuljong. Fermenteringsansatsen luftes ved 30°C med 80 liter luft/min. ved 150 omdreininger av røreverket pr. minutt. Etter en veksttid på 17 timer adskilles bakteriene som inneholder L-asparaginase i overløpssentrifuge og resuspenderes i 20 liter destillert vann. Inn i denne suspensjon lar man det under omrøring renne 80 liter aceton, adskiller de utfnokkede bakterier i overløpssentrifuge og resuspenderer cellemassen igjen i 20 liter destillert vann. Til ekstrahering av L-asparaginasen fra bakteriecellene omrøres suspensjonen 4,5 timer ved 30°C . Under denne tid holdes pH ved tilsetning av 1-n natronlut ved 7,5 til 7,8. Ved adskillelse av de ekstraherte bakterieceller i overløpssentrifuge får man ca. 17 liter av en klar oppløsning, hvorfra man ved siden av andre celleinnholdsstoffer utfeller L-asparaginasen ved tilsetning av 68 liter aceton. Den dannede utfelling isoleres, ettervaskes med aceton og tørkes i vakuum ved 25 til 30°C . Den således dannede rå-L-asparaginase har en enzymatisk aktivitet på ca. $3\frac{1}{3}$ enheter pr. mg.

Det således dannede utgangsmateriale kan eventuelt forrenses på følgende måte:

50 g råasparaginase med en aktivitet på 3,3 E/mg oppløses i 1000 ml m/15 trispuffer av pH 8,5 under omrøring ved værelses-temperatur. Oppløsningen oppvarmes i porsjoner på hver gang 100 ml i vannbad i 15 minutter ved $59,5^{\circ}\text{C}$, idet det inntreer en sterk ut-

fnokning av inaktive proteiner, mens enzymet forblir uforandret i oppløsning. De forenede denatureringsblandinger avkjøles, klarsentrifugeres ved 6000 omdr./min. Oppløsningen har en spesifikk aktivitet på 6-10 E/mg protein. Den betegnes her som oppløsning A. Oppløsning A kan i tilknytning til den kjente fraksjonering av enzymer fraksjoneres med oppløsningsmidler (Biochem. J. 48, 42-48 (1951)) med aceton, idet L-asparaginase er inneholdt i utfellingen som utfelles ved innstilling av oppløsningen på fra 30 til 50% aceton. Man kommer på denne måte til preparater med ca. 17 E/mg.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan man enten gå ut fra en råasparaginase med ca. 7 E/mg eller fra et anriket preparat. Spesielt egnet som utgangsmateriale for fraksjoneringen med polyetylenglykol har det vist seg oppløsning A eller den herav ved acetonfraksjonering tilgjengelige L-asparaginase. Fraksjoneringsgrensene er ikke konstante, da de avhenger av forurensningenes art. Det er imidlertid ved et enkelt forsøk mulig å fastslå disse grenser.

Eksempler:

Utfelling med polyetylenglykol:

Eksempel 1.

1000 ml oppløsning A (utvunnet av 50 g rå L-asparaginase med en aktivitet på 4 E/mg) ble avkjølt til 3°C og blandet med 500 ml 50%-ig polyetylenglykoloppløsning. Sedimentet ble utvunnet ved sentrifugering.

Den fremkomne L-asparaginase får betegnelsen "fraksjon 1". Fra den ovenstående oppløsning fra fraksjon 1 (1468 ml) ble det med 100 ml 50%-ig polyetylenglykoloppløsning utfelt ytterligere materiale og opparbeidet. Utfelling = fraksjon 2. Den ovenstående oppløsning fra fraksjon 2 (1550 ml) ble igjen blandet med 100 ml polyetylenglykoloppløsning og opparbeidet. Utfelling = fraksjon 3. På analog måte ble fraksjon 4 utvunnet. De ved denne fraksjonering oppnådde renhetsgrader og utbytter fremgår av følgende tabell:

Fraksjons-nr.	Utbytte i g	E/mg	% enheter, referert til anvendt rå-asparaginase
1	1,46	7,7	6
2	2,43	35	43
3	1,40	41	29
4	0,64	10,4	4

127626Eksempel 2.

100 g rå-asparaginase med 3,4 E/mg ble oppløst i 2 liter vann og klaret ved sentrifugering. Oppløsningen ble med 1-n KOH innstillet på pH 8,5 og fraksjonert med polyetylenglykoloppløsning analogt eksempel 1. De derved dannede fraksjoner 2 og 3 ble forenet. Utbytte 12,0 g.

Enheter/mg 25,5.

Utbytte referert til anvendte enheter 88% av det teoretiske.

De forenede sedimenter av de to utvundne fraksjoner 2 og 3 ble oppløst i 400 ml vann og igjen underkastet en fraksjonering med polyetylenglykoloppløsning. De således dannede sedimenter fra fraksjon 2 og 3 ble dispergert to ganger i tørr dypavkjølt aceton, sentrifugert, oppløst i vann, filtrert over et Seitz-K3-sjikt og lyofilisert.

Utbytte 4,40 g

Enheter/mg 58

Utbytte referert til

100 g rå-asparaginase 74%

Eksempel 3.

5,0 g av en fra oppløsning A ved fraksjonering med aceton forrenset L-asparaginase med 576 E/mg ble oppløst i 100 ml vann og fraksjonert med polyetylenglykoloppløsning som omtalt i eksempel 1. De ved denne fraksjonering oppnådde renhetsgrader og utbytter fremgår av følgende tabell:

Fraksjons-nr.	Utbytte i g	E/mg	% enheter, referert til anvendt rå-asparaginase
1	1,381	26,5	38
2	0,362	64	24
3	0,155	21,4	3
4	1,00	6,0	6

Tilsetning av urinstoff eller andre amider:

Eksempel 4.

5 kg rå-asparaginase (fremstilt på den omtalte måte) innføres ved værelsestemperatur i 40 liter destillert vann. pH-verdien av den langsomt dannede oppløsning innstilles med ca. 1,5 liter 1-n NaOH til 8,5 til 8,9. Deretter tilsettes urinstoff til en konsentrasjon på ca. 3 mol/liter. Oppløsningens temperatur synker dermed med ca. 10°C. Det omrøres ennå i 1 time og den dannede oppløsning oppbevares ved 4°C i 16 til 24 timer. Etter denne tid

felles fraksjon I ved tilsetning av 25 til 30 liter av en 50%-ig polyetylenglykoloppløsning. (Molvekt 1500). Fraksjon I kasseres. Fraksjon II felles ved tilsetning av ytterligere 15 liter 50%-ig polyetylenglykoloppløsning. Fraksjon II inneholder hovedaktiviteten. Ved tilsetning av ytterligere 15 liter av polyetylenglykoloppløsningen til det overstående av fraksjon II utvinnes fraksjon III, som inneholder ca. 20 til 25% av den opprinnelige asparaginase-aktivitet.

Fraksjon II opptas i ca. 2,5 liter destillert vann. Ved tilsetning av 250 ml av en 50%-ig polyetylenglykoloppløsning utfelles fraksjon Ia, ved ytterligere tilsetning av 250 ml polyetylenglykoloppløsning fraksjon IIa. På samme måte utvinnes fraksjonene IIIa og IVa. De ved denne fraksjonering oppnådde renhetsgrader og utbytter fremgår av følgende tabell:

Fraksjons-nr.	Utbytte i g	E/mg (1-minutter- enheter)	% av den enzymatiske aktivitet, referert til anvendt rå- asparaginase
Ia	1,6	19,4	0,3
IIa	8,1	100,0	8,0
IIIa	23,0	144,0	31,2
IVa	16,2	74,0	11,5
Va	18,9	25,0	4,6
			55,6

Eksempel 5.

Det går frem som i eksempel 4, imidlertid økes konsentrasjonen av urinstoff til ca. 6 mol/liter. Den etterfølgende henstandstid for oppløsningen utgjør da bare 2 timer. Utbytterne er sterkt overensstemmende med de som fremgår av eksempel 4.

Eksempel 6.

Det går frem som i eksempel 4, imidlertid tilsettes istedenfor urinstoff guanidinhydroklorid inntil en konsentrasjon på ca. 2 mol/liter. Oppløsningens henstandstid utgjør 2 timer. Utbytterne tilsvarende disse fra eksempel 4.

Utfelling ved det isoelektriske punkt etter fraksjonert felling med polyetylenglykol:

Eksempel 7.

100 g L-asparaginase med en spes. aktivitet på ca. 100 E/mg protein oppløses i 1000 cm³ destillert vann ved værelses-temperatur. Under oppløsningsprosessen innstilles pH-verdien med

127626

1-n NaOH på 8,5 til 8,9. Det deretter gjenblivende uoppløselige frasentrifugeres i 10 min. ved 6000 omdr./min. Den klare overstående pH-verdi bringes i isbad langsomt på pH 7 til 6,8. Et oljeaktig sediment som utskiller seg her frasentrifugeres i 25 min. ved 6000 omdr./min. Det klare overstående fra denne sentrifugering innstilles med 1-N HCl til pH 5,3. Deretter tilsettes trinnvis hver gang 25 ml av en 50%-ig polyetylenglykoloopløsning og hver gang frasentrifugeres i 10 min. ved 6000 omdr./min. Man får på denne måte ca. 5 til 6 fraksjoner, idet hovedaktiviteten med den høyeste spes. aktivitet er inneholdt i fraksjon 3 til 5. Utbytte: 60 til 70%.

Eksempel 8.

Det gås frem som i eksempel 7, imidlertid tilsettes istedenfor polyetylenglykol kald aceton i 4 trinn inntil 20% av oppløsningsvolumet. Utbyttene er tilsvarende de som fremgår av eksempel 7.

Eksempel 9.

Det gås frem som i eksempel 7, imidlertid tilsettes istedenfor polyetylenglykol etylalkohol i 5 trinn inntil 20% av oppløsningsvolumet. Utbyttene er sammenlignbare med disse fra eksempel 7.

Eksempel 10.

100 g L-asparaginase med en spes. aktivitet på 140 E/mg protein oppløses i 500 ml vann, oppløsningens pH-verdi innstilles med 1-n NaOH til 8,5. Uoppløst gjenblivende stoff frasentrifugeres i 15 minutter ved 6000 omdr./min. Den klare oppløsnings pH-verdi innstilles ved 4°C og med 1-n HCl til pH 6,8 og den derved opptredende utfelling frasentrifugeres. Det klare overstående etter sentrifugeringen innstilles med 1-n HCl langsomt til pH 5,0 til 5,1 og henses ved 4°C i flere timer. Den deretter opptredende utfelling frasentrifugeres. Det inneholder L-asparaginase med et utbytte fra 60 til 80% av den anvendte aktivitet og med en maksimal spes. aktivitet inntil 190 E/mg protein.

Utvinning av krystallisert L-asparaginase:

Eksempel 11.

200 g rå-asparaginase med en aktivitet på 3,5 E/mg oppløses i 4000 ml glykolpuffer, pH 8,5 (Biochemisches Taschenbuch, side 91, 1964) og oppvarmes porsjonsvis i 30 minutter ved 60°C. Herved utfnokkes inaktivt protein, mens enzymet forblir uforandret

i oppløsning. Blandingen klarsentrifugeres ved 6000 omdr./min og fraksjoneres med aceton. Den ved tilsetning av 40 til 45% aceton dannede mengde utgjør 16,4 g. Den inneholder 20 E/mg.

9,3 g av denne anrikede asparaginase oppløses i 190 ml 3 molar urinstoffoppløsning, innstilles med natronlut til pH 8,5 og fraksjoneres med polyetylenglykol (50%-ig vandig oppløsning). Den etter tilsetning av 22 til 30 ml dannede fraksjon utvinnes og opparbeides som vanlig. Utbytte 2,1 g, E/mg: 104.

En oppløsning av 4,0 g av denne prøve i 40 ml dobbeltdestillert vann innstilles med 1-n saltsyre til pH 5,2 og fraksjoneres med polyetylenglykoloppløsning. Den etter tilsetning av 12,5 til 15 ml utfelte mengde fraslynges etter 20 minutters henstand ved værelsestemperatur og vaskes etter to timers henstand under aceton med ytterligere aceton.

Utbytte: 1,2 g, E/mg: 6110.

Flate prizmer. Brunfargning ved 225°C, sintring fra 260°C, skumning fra 270°C og fullstendig spaltning fra 274°C.

De således dannede krystaller omkrystalliseres fra vandige oppløsninger ved tilsetning av organiske oppløsningsmidler som aceton eller alkohol, eller ved tilsetning av polyetylenglykol.

Krystallene viser følgende analyseresultater:

Vanninnhold: 12,5%.

(H₂O-innholdsbestemmelsen foregikk ved 6 timers tørkning i høyvakuum ved 110°C i en spialtørkepistol ifølge J. Unterzaucher [Mikrochem. 18, 315 (1935)]). Det ble undersøkt på vektkonstant ved fortsatt tørkning).

Gløderest: 0,11%.

(Bestemmelsen av askeinnholdet av proteinet foregikk ifølge F. Pregl og H. Roth [Quantitative organische Mikroanalyse, side 174, Springer, Wien (1949)]).

Proteininnhold: 88,0%.

(Proteinbestemmelsen foregikk ifølge trikloreddiksyreutfelling ifølge BIURET-metoden [T.E. Weiselbaum, Am. J. Clin. Path. (Techn. Sec.), 10, 40, (1946)]).

Samlet volum: 4 ml (herav 2 ml Biuret-reagens):

$E_{546}^{1\text{ cm}}$ · 12,3 = mg protein/ml prøveoppløsning.

Sedimentasjonskonstanten viser en verdi på $S_{200}^{1\%} = 4,33$.

Fig. 1 viser den krystalliserte L-asparaginasens IR-spektrum opptatt ifølge KBr-teknikken.

127626

På fig. 12 er det vist UV-spektrumet av preparatet.
Måleapparat: Zeiss spektralfotometer PMQ II (forsterkning 1/1/I).
Sjikttykkelse: 11 cm.
Konsentrasjon: hver gang 1 mg H₂O- og saltfritt preparat pr. ml.
Som oppløsningsmiddel tjente en pH 7 fosfatpuffer (Merck Titrisol) nr. 9887.

Fig. 3 er en gjengivelse av krystalloptaket av L-asparaginase.

Fraskillelse av pyrogenen før fraksjonering med polyetylglykol:

Eksempel 12.

30 g DEAE-dekstrangel (dietylaminoetyldekstrangel = DEAE - "Sephadex A 50", forbehandles på vanlig måte, ekvilibrerer med 0,02 M-glycin, 0,02 M-ammoniumformiatpuffer pH 7,8 og innfylles i en søyle av 3,2 cm diameter. Laghøyde: 90 cm. 500 g rå L-asparaginase med 100 E/mg oppløses i 50 ml av ovennevnte puffer og påføres på søylen. Deretter elueres enzymet med en lineær gradient fra 2 liter av ovennevnte puffer til 2 liter 0,02 M-glycin, 1 M-ammoniumformiat pH 7,5. De asparaginaseholdige fraksjoner forenes og frysetørkes. Utbytte: 1,03 g med 27.800 E = 83% av den anvendte aktivitet. Den spes. aktivitet, referert til protein, utgjør 210 E/mg.

Pyrogenprøve på kaniner: til 5 kaniner ble det gitt 200 E/kg dyr. Temperaturøkningens middelerverdi utgjorde 0,48°C.

Utgangsstoffet viste under like betingelser en temperaturøkning omtrent 1,6°C.

Eksempel 13.

30 g DEAE-dekstrangel forbehandles på vanlig måte og ekvilibrerer med 0,05 M-ammoniumacetat pH 7,5 og innfylles i en søyle med 3,2 cm diameter. Laghøyde: 95 cm. 500 mg rå L-asparaginase med 39,7 E/mg oppløses i 50 ml 0,05 molar ammoniumacetat pH 7,5 og påføres på søylen. Elueringen foregår med en lineær gradient fra 2 liter 0,05 M-ammoniumacetat pH 7,5 til 2 liter 1 molar ammoniumacetat pH 7,5. De asparaginaseholdige fraksjoner forenes. Utbytte 18.600 E = 94% av den anvendte aktivitet. Spesifikk aktivitet: 200 E/mg protein.

Pyrogenprøve på kaniner: Ved 300 E/kg dyr utgjør middelerverdien av temperaturøkningen 0,4°C.

Utgangsstoffet viste ved 200 E/kg dyr en temperaturøkning på omtrent 1,6°C.

Til sammenligning skal det anføres et renseforsøk med

diethylaminoethyl-cellulose.

30 g DEAE-cellulose ble ekvilibrert med 0,05-M-ammoniumacetat pH 7,5 og innfylt i en søyle. 500 mg rå L-asparaginase (34 E/mg) ble oppløst i 50 ml av ovennevnte puffer, påført på søylen og eluert med en lineær gradient fra 1 liter 0,05 ammoniumacetat pH 7,5 til 1 liter 0,5 M-ammoniumacetat pH 7,5.

Utbytte: 14.000 E = 82% av aktiviteten med 89 E/mg protein.

Pyrogenprøve på kaniner: ved 200 E/kg dyr utgjorde temperaturøkningens middelværdi $1,0^{\circ}\text{C}$.

Utgangsstoffet viste under tilsvarende betingelser en temperaturøkning på omtrent $1,8^{\circ}\text{C}$.

Andre forsøksbetingelser bragte ingen ytterligere fjerning av pyrogenene, hvorav det klart fremgår overlegenheten ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 14.

490 g DEAE-dekstrangel ble forbehandlet på vanlig måte og ekvilibrert med 0,05 M-ammoniumacetat pH 7,5, hvortil det var tilsatt mertiolat i en konsentrasjon på 20 mg/liter. Suspensjonen ble fylt i en til 4°C avkjølt søyle med en diameter på 20 cm. Laghøyde: 65 cm. 9,8 g av en rå-asparaginase med 46 E/mg ble oppløst i 880 ml 0,02 M-ammoniumacetat pH 7,5 og hatt på søylen. Eluering med lineær gradient fra 10 liter 0,05 M-ammoniumacetat pH 7,5 til 10 liter 0,5 M-ammoniumacetat pH 7,5. De asparaginaseholdige fraksjoner ble forenet.

Utbytte: 365.000 E = 81% av den anvendte mengde.

Spesifikk pyrogenprøve på kaniner: Ved 200 E/kg dyr utgjorde temperaturøkningens middelværdi $0,33^{\circ}\text{C}$.

Utgangsstoffet viste under samme betingelser en temperaturøkning rundt $1,8^{\circ}\text{C}$.

Eksempel 15.

Til 10 g DEAE-dekstrangel ekvilibrert i 0,05 M-ammoniumacetatoppløsning pH 7,5, has en oppløsning av 100 mg L-asparaginase med 39,7 E/mg i 100 ml 0,05 M-ammoniumacetatoppløsning pH 7,5. Blandingen omrøres i 15 minutter og frasuges deretter. Residuet elueres i rekkefølge med puffere av forskjellig ionestyrke (se tabellen). De ved lavere ionestyrke allerede eluerte L-asparaginasemengder er pyrogenholdige, mens de med sterkere puffere eluerte mengder er pyrogenfrie. Utbytterne fremgår av tabellen.

Puffer	Aktivitet E	Utbytte %	Pyrogenitet $\Delta T/\text{dyr } (^{\circ}\text{C})$
0,05 M-ammoniumacetat pH 7,5	5010	24	1,1
0,10 M-ammoniumacetat pH 7,5	3820	18	1,2
0,20 M-ammoniumacetat pH 7,5	7850	37	0,9
0,40 M-ammoniumacetat pH 7,5	4060	19	0,3
0,80 M-ammoniumacetat pH 7,5	520	2	0,3

Eksempel 16.

100 g asparaginase med en spesifikk aktivitet på 100 E/mg oppløses i 1 liter vann. Det tilsettes ca. 40 g glycin og oppløsningen innstilles på pH 8,9. Oppløsningen holdes i 90 timer ved $+50^{\circ}\text{C}$, det deretter utfelte protein sentrifugeres ved 6000 E/min. i 20 minutter. Det klare sentrifugat innstilles med 2-n saltsyre på pH 5,2 og utfelles fraksjonert med 50%-ig polyetylenglykoloppløsning. Den etter tilsetning av ca. 200 ml polyetylenglykol dannede mengde fraslynges, vaskes med aceton og tørkes.

Utbytte: ca. 35 g med 200 til 220 E/mg stoff.

Av fig. 4 fremgår produktets minimale pyrogeninnhold.

Febervirkningen av preparatene prøves etter forskriftene ifølge DAB (Deutsches Arzneibuch). Ifølge dette skal summen av kvadratet av en temperaturøkning av tre dyr ikke overstige tallet 0,59. På figur 4 ble fire dyr anvendt i feberprøven. Summen av kvadratet av temperaturøkningen utgjorde 0,51. Dette resultat angis ved uttrykket "DAB = 0,51". Det undersøkte preparat var således fritt for feberfrembringende stoffer.

Eksempel 17.

Det gåes frem som i eksempel 16, imidlertid oppvarmes oppløsningen av L-asparaginase i 24 timer ved 60°C .

Utbytte: 34 g med 220 E/mg stoff.

Eksempel 18.

Det gåes frem som i eksempel 16, oppløsningens pH-verdi innstilles imidlertid til ca. 8,2.

Utbytte: 29 g med 180 E/mg stoff.

Eksempel 19.

Det gåes frem som i eksempel 17, imidlertid tilsettes det bare 20 g glycin til L-asparaginaseoppløsningen.

Utbytte: 35 g med 210 E/mg stoff.

Eksempel 20.

100 g L-asparaginase med en spes. aktivitet på 100 E/mg

oppløses i 1 liter vann. Det tilsettes 100 ml metanol og 40 g glycin og oppløsningen innstilles på pH 8,9. Oppløsningen holdes i 90 timer ved +50°C, det deretter utfelte protein frasentrifugeres ved 6000. omdr./min. i 20 min. Det klare sentrifugat innstilles med 2-n HCl til pH 5,2 og utfelles fraksjonert med 50%-ig polyetylenglykoloopløsning. Den etter tilsetning av omtrent 200 ml polyetylenglykol dannede mengde fraslynges, vaskes med aceton og tørkes.

Utbytte: ca. 33 g med 220 E/mg stoff.

Eksempel 21.

Det gâes frem som angitt i eksempel 20, imidlertid tilsettes 200 ml metanol.

Utbytte: 25 g med 230 E/mg stoff.

Eksempel 22.

Det gâes frem som i eksempel 20, imidlertid tilsettes det til oppløsningen 100 ml etanol.

Utbytte: 27 g med 210 E/mg stoff.

P a t e n t k r a v :

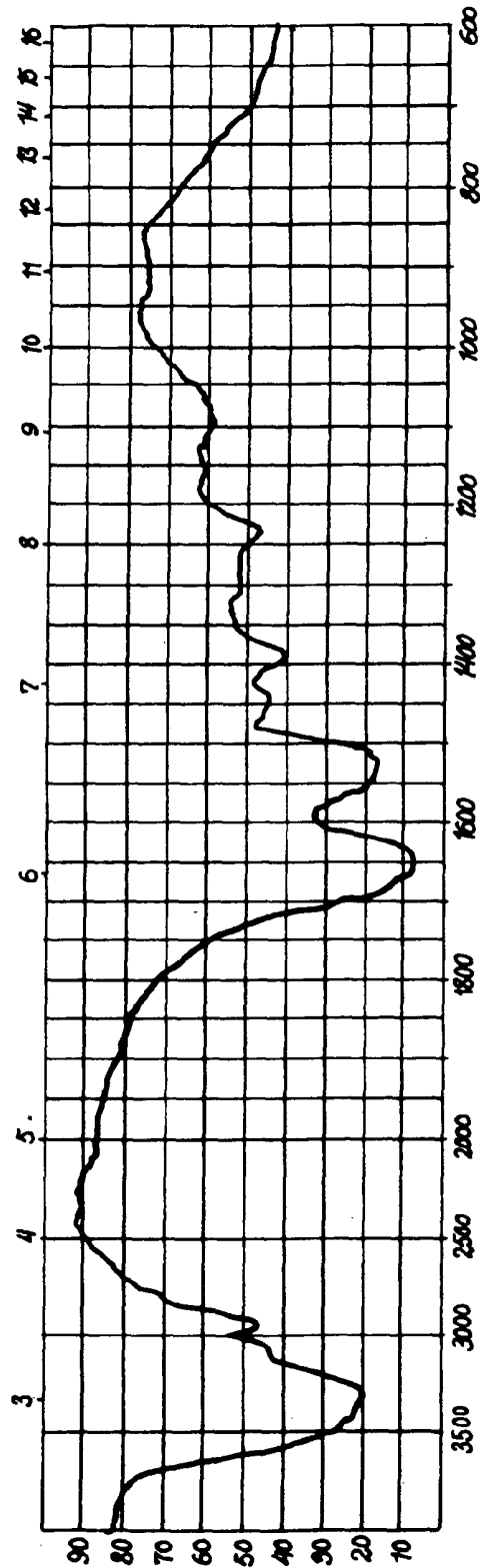
Fremgangsmåte til selektiv anrikning og til rensning av L-asparaginase og spesielt til fremstilling av krystallinsk L-asparaginase, k a r a k t e r i s e r t v e d at man, fortrinnsvis etter adskillelse av pyrogener, blander rå vandige oppløsninger av L-asparaginase, eventuelt etter tilsetning av et vannoppløselig amid, fortrinnsvis urinstoff, med polyetylenglykol av molekylvekt 1000-6000 og fraskiller den dannede L-asparaginaseholdige utfelling, eventuelt vidererenser og bringer L-asparaginasen til krystallisasjon.

Anførte publikasjoner:

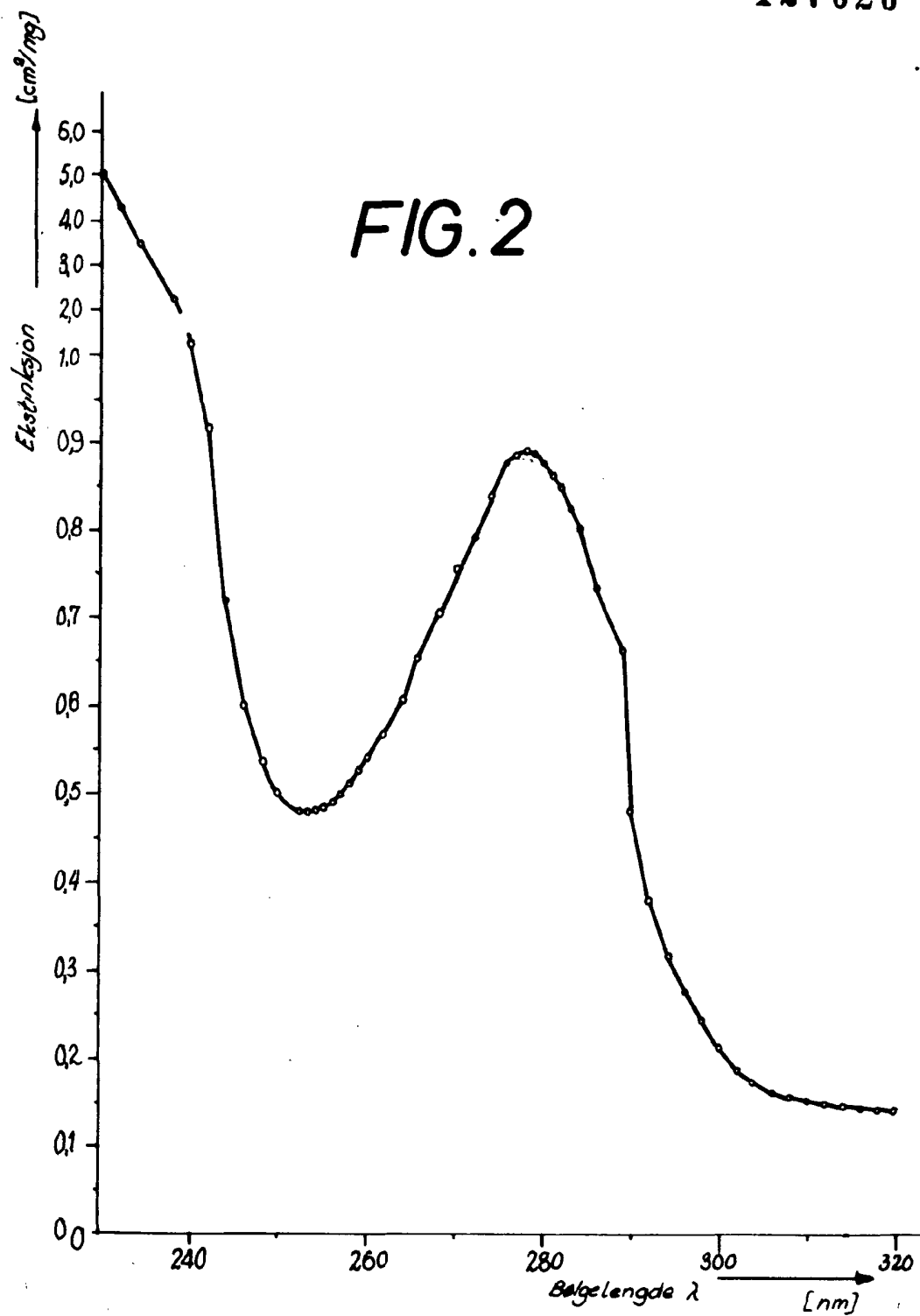
Britisk patent nr. 1006258

127626

FIG. 1



127626

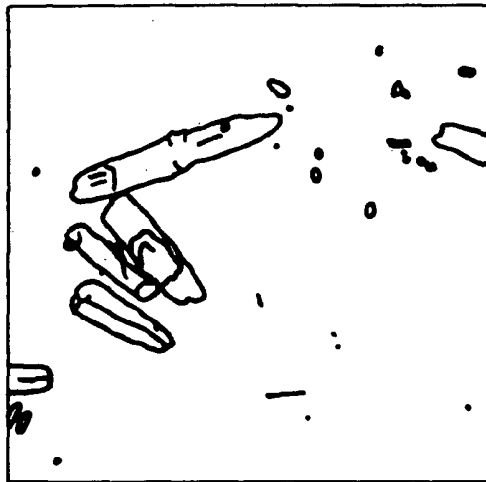


127626

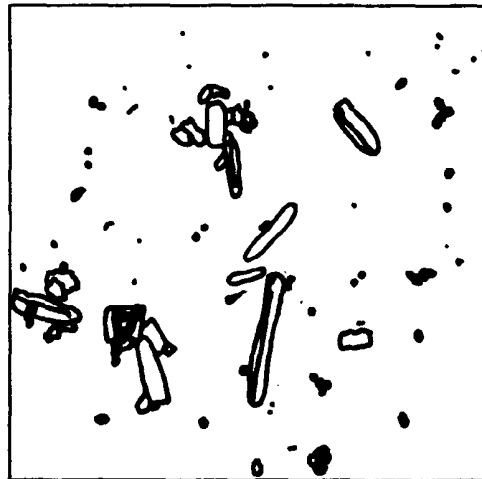
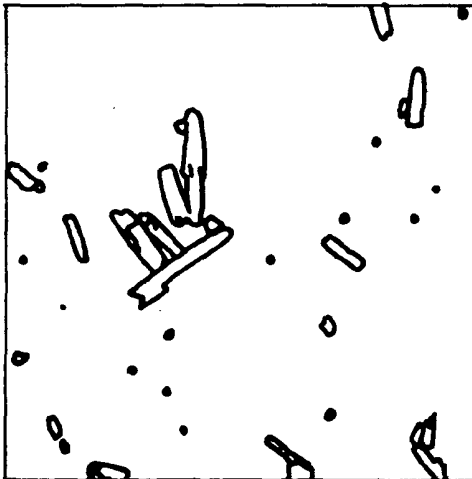
FIG.3



Forstørret ca. 350 ganger



Forstørret ca. 700 ganger



Forstørret ca. 400 ganger

127626

FIG.4

