

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 124538

Int. Cl. C 07 c 103/52 kl. 12q-6/01
C 07 g 7/02 6a-22/10

Patentsøknad nr. 2941/69	Inngitt	14.7.1969
Løpedag	-	
Søknaden alment tilgjengelig fra		16.1.1970
Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt		2.5.1972
Prioritet begjært fra:	15.7.1968 Tyskland, nr. P 17 68 934.8	

Farbenfabriken Bayer AG,
509 Leverkusen-Bayerwerk, Tyskland.

Oppfinnere: Eugen Werle, Rümelinstrasse 6, München og
Hans Fritz, Magdalenenstrasse 36, München,
Tyskland.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S

Fremgangsmåte til anrikning av polypeptider,
fortrinnsvis av enzymer og enzym-inhibitorer.

Gjenstand for DDR patent 62.646 er en fremgangsmåte til anrikning av polypeptider, idet denne fremgangsmåte er karakterisert ved at man binder et polypeptid (I) covalent til en oppløselig eller uoppløselig bærer og bringer det derved dannede addukt i vann i kontakt med en oppløsning som inneholder stoffer (II) som er i stand til å danne et kompleks med polypeptid (I), renser det derved dannede kompleks ved utvaskning eller kromatografisk bringer det til dissosiasjon og isolerer det kompleksdannende stoff (II).

En spesiell gjenstand for ovennevnte DDR patent er en fremgangsmåte til anrikning av enzym-inhibitorer ifølge det første krav, som er karakterisert ved at man covalent binder et enzym som

Kfr. kl. 30h-2/04

hemmes ved den angjeldende enzym-inhibitor til en bærer og bringer den derved dannede oppløselige forbindelsen i vann i kontakt med en oppløsning av enzym-inhibitoren, renser det derved dannede kompleks ved utvaskning, bringer til dissosiasjon og isolerer enzym-inhibitoren.

Ved den ved ovennevnte fremgangsmåte **anvendbare oppløselige og oppløselige bærer dreier det seg** fremfor alt om polymere stoffer. Disse må ha funksjonelle grupper som er istand til å reagere med de nevnte polypeptider, enzymer og enzym-inhibitorer etter metoder innen peptid-kjemien. Her skal i første rekke nevnes slike harpikser som inneholder anhydridgrupper, syrekloridgrupper, isocyanatgrupper og azidgrupper samt slike harpikser som inneholder aktiverte fluoratomer (Makro-molekular-Chemie 39 (1960) 13). Også de kjente, i handelen forekommende karboksyholdige ione-utvekslerharpikser kommer på tale etter innføring av aktiverte grupper. De fleste av disse harpikser betegnes i det følgende som A-harpikser. Innfører man i disse harpikser basiske grupper, får man såkalte polyamfotære harpikser, hvori harpiksens ensidige negative ladning er avsvakket til tilnærmet "nøytralisert"; de betegnes i det følgende som nøytrale harpikser.

Det er nå blitt funnet at man kan vesentlig forbedre fremgangsmåten i henhold til ovennevnte DDR patent når man som bærer anvender nøytrale harpikser.

Oppfinnelsen vedrører altså en fremgangsmåte til anrikning av polypeptider, fortrinnsvis enzymer og enzym-inhibitorer, idet man binder et polypeptid (I) - i tilfelle anrikning av enzym-inhibitorene det tilsvarende enzym, i tilfelle anrikning av enzymer tilsvarende enzyminhibitor - covalent på en bærer, bringer det dannede addukt i vann i kontakt med en oppløsning av polypeptider (II) som skal anrikes og renser det derved dannede kompleks ved utvaskning, bringer til dissosiasjon og isolerer det anrikede polypeptid (II), idet fremgangsmåten er karakterisert ved at man som bærer anvender copolymerisater av flere monomere, hvorav minst ett inneholder karboksyanhydridgrupper, at man først lar denne reagere med polypeptid (I) og deretter med alifatiske og/eller aromatiske polyaminer, hvori bare en aminogruppe er usubstituert.

Derved oppnåes følgende vesentlige fremskritt:

1. De nøytrale harpiksene har for det meste en høyere

bindingskapasitet enn A-harpikksene.

2. Ved anvendelsen av de nøytrale harpikser kan stoffene som skal isoleres, isoleres under vesentlig mildere betingelser, f.eks. ved mindre sur pH-verdi enn ved anvendelsen av A-harpikser (sml. figuren).

3. De nøytrale harpikser binder også enzymer og enzym-inhibitorer med lave isoelektriske punkter som ikke eller bare lite bindes av A-harpikser. Således binder f.eks. N-kallikreininhibitor-harpikser kallikrein, som ikke bindes ved A-kallikreininhibitor-harpikser, og N-trypsinharpikser binder inhibitorer fra soyabønner, høns-eggehvite og serum, som ikke resp. bare i meget mindre grad bindes ved A-trypsinharpikser.

De nøytrale harpiksene fremstilles idet man til systemet av bærer og enzym resp. av bærer og enzym-inhibitor rettidig tilsetter alifatiske og/eller aromatiske polyaminer, hvor bare en amino-gruppe er fri, mens alle andre aminogrupper er beskyttet mot acyleringen. Eksempler på slike aminer er N,N-dimetyletylendiamin, agmatin, N-metyl-N'(3-aminopropyl)-piperazin, 4-aminopyridin, 2-aminopyridin, 3-amino-1-cykloheksyl-aminopropan, osv.

Ved gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen vaskes det dannede og til den nøytrale harpiksen fikserte kompleks for fjerning av følgestoffer og forurensninger grundig med vann og pufferoppløsninger og bringes deretter til dissosiasjon. Denne dissosiasjon kan oppnåes ved pH-forskyvning og/eller forandring av ionekonsentrasjonen og/eller fortrenghing ved kompetitiv hemstoffer eller substrater, f.eks. tryptamin eller n-butylamin for trypsin og/eller ved tilsetning av slike stoffer som f.eks. urinstoff og guanidinsalter, er istand til å løsgjøre resp. å oppløse molekulære vekselvirkninger, hvilket eventuelt foregår ved en reversibel denaturering av de deltagende proteiner.

Av de enzymer som kan anrikes, renses og isoleres fra deres mer eller mindre urene oppløsninger ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, skal det i første rekke nevnes trypsin, chymotrypsin, kallikrein, plasmin, pepsin, renin, ribonuclease, tombin, amylase, papain, hyaluronidase, karbopeptidase A og B, pancreatopeptidase E, penicillinase og cholinestereaser.

Av de ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anrikbare, rensbare og isolerbare inhibitorer henvises fremfor alt til den kjente

kallikrein-trypsin-inhibitor (Kunita-Inhibitor "Trasylol"), den spesifikke, utelukkende trypsinhemmende trypsin-inhibitor fra svinepankreas og storfepankreas, trypsin-inhibitoren fra sædblærer og trypsin-inhibitoren fra plantefrø og poteter.

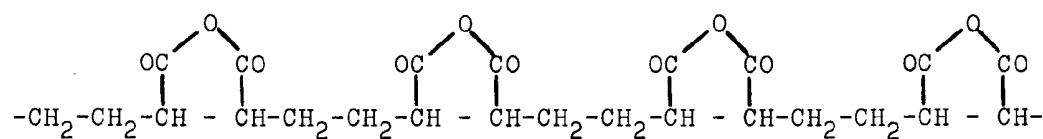
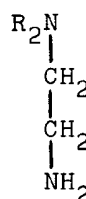
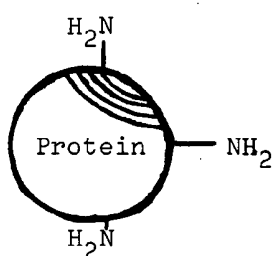
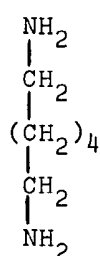
Dessuten byr fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen den mulighet å finne nye inhibitorer for kjente enzymer og omvendt nye enzymer som hemmes ved bestemte inhibitorer. I første tilfelle binder man det angjeldende enzym covalent til bæreren og behandler det derved dannede addukt så lenge med oppløsninger som muligvis inneholder inhibitorer for dette enzym, inntil enzymets biologiske aktivitet går ned. I sistnevnte tilfelle går man frem analogt, men omvendt.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har den fordel at den byr den mulighet også på enkel måte med gode utbytter og renhetsgrader å anrike, rense og isolere også slike polypeptider, enzymer og enzym-inhibitorer hvis anrikning fra uren oppløsning hittil var vanskelig og omstendelig.

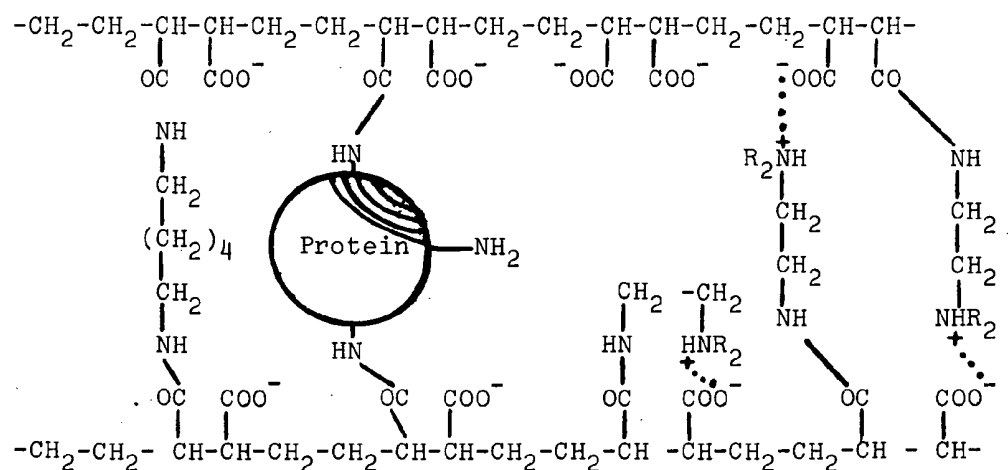
Eksempel 1.

Fremstilling av den vannoppløselige N-trypsinharpiks (sml. formelskjema).

200 mg "EMA-31"-harpiks fra firma Monsanto ble under omrøring satt til en til 0 til 4°C avkjølt blanding av 20 ml 0,1%-ig heksametylendiamin og 75 ml av en 0,2 molar salt-pufferoppløsning (0,1 molar trietanolamin, 0,1 molar NaCl), pH 7,8. Suspensjonen ble homogenisert kort under avkjøling, omrørt og etter 2 minutter (fra harpikstilsetningen) blandet med en avkjølt (0 til 4°C) oppløsning av 1 g trypsin i 75 ml av salt-pufferoppløsningen. Etter 4 minutters lang omrøring av denne reaksjonsblanding ble det hertil satt en vandig oppløsning av 4 g N,N-dimetyletylendiamin (i molforhold 1:1 blandet med vann og med 2-n HCl innstilt på 7,8), den avkjølte reaksjonsblanding omrørt i 2 timer og deretter sentrifugert. I den overstående oppløsning befant det seg dessuten 320 mg trypsin, dvs. 68% av det anvendte trypsin ble bundet til den vannoppløselige harpiks. Den vannoppløselige N-trypsinharpiks ble blandet med det dobbelte volum cellulosepulver "Cellex XF 1", helt i en til 0-4°C avkjølt søyle og deretter vasket så lenge (natten over) med salt-pufferoppløsning (0,1 molar trietanolamin, 0,1 molar NaCl, 0,01 molar CaCl₂), pH 7,8 inntil det i gjennomløpet ikke mer var påvisbart noen tryptisk aktivitet. Tilsvarende utbytter av N-trypsinharpikser får man, når man

$$\begin{array}{ccccccc} -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} & - & \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} & - & \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} & - & \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ & & \text{OC} & & \text{OC} & & \text{OC} & & \text{OC} \\ & & \diagdown & & \diagdown & & \diagdown & & \diagdown \\ & & \text{O} & & \text{O} & & \text{O} & & \text{O} \\ & & \diagup & & \diagup & & \diagup & & \diagup \\ & & \text{CO} & & \text{CO} & & \text{CO} & & \text{CO} \end{array}$$


pH 7-8



Zwitteriondannelse

(dimetyletylendiamin)

Formelskjema: Fremstilling av N-proteinharpikser $R = -CH_3$

Eksempel 2.

Isolering av inhibitorer ved hjelp av N-trypsinharpiksen.

a) Spesifikk trypsin-inhibitor fra svinepankreas.

Ved behandling av med 3%-ig perklorisyre av høyere-molekylære eggehvitestoffer befridde ekstrakter fra svinepankreas (sml. H. Fritz, G. Hartwich og E. Werle, Z. physiol. Chem. 348 150 (1966)) inneholder inhibatoren i en spesifikk aktivitet på 0,014 ImU/ μ g biuret-protein (fordefinisjon av InU se ovennevnte litteratursted, 1 ImU for trypsin hemmer ca. 1 μ g "Trypure Novo").

N-trypsinharpiksen (fremstilt av 10 g trypsin) ble innrørt i den inhibitorholdige, nøytrale oppløsning (2,14 liter, 745.000 ImU for trypsin) under avkjøling ved 0-4°C. Etter 2½ times omrøring (0-4°C) ble det sentrifugert og det overstående kassert. Det uoppløselige inhibitor-trypsinharpiks-kompleks ble deretter utrørt 3 ganger i 0,2 molar saltpufferoppløsning (0,1 molar trietanolamin; 0,1 molar NaCl, 0,01 molar CaCl₂) (0-4°C) og det overstående kassert hver gang etter sentrifugering. Deretter ble harpiks-komplekset utrørt i 0,2 molar KCl-oppløsning, suspensjonens pH ved tilsetning av 2-n HCl innstilt til 2,0 og deretter omrørt under avkjøling i 1½ time. Deretter ble det sentrifugert og residuet (enzymharpiks pluss harpiks-kompleks) igjen som omtalt behandlet med 0,2 molar KCl/HCl-oppløsning, pH 2,0. I de to forenede overstående væsker befant det seg en inhibitormengde på tilsammen 458.600 ImU for trypsin, dvs. 68,5% av den for isoleringen anvendte mengde. Den spesifikke aktivitet er inhibitorpreparatet utgjorde 0,32 ImU/ μ g biuret-protein og etter avsaltning over en Sephadex-G-25-søyle (dekstran-gel fra firma Pharmacia, Uppsala, Sverige) 2,73 ImU/ μ g biuret-protein.

På tegningen er det vist dissosiasjonsforholdet av inhibatoren av svinepankreas vist på hver gang et kompleks med N- og A-inhibitorharpiks. Det viser seg at fra N-harpiksen foregår utløsningen i mindre surt område enn fra A-harpiksen.

b) Den polyvalente kallikrein-inhibitor fra storfeorganer.

Kunita-inhibitor, "Trasylol", ble anriket på analog måte som den spesifikke trypsininhibitor fra svinepankreas (2a) over en trypsinharpiks. Dissosiasjonsforholdene av det vannuoppløselige kompleks av den polyvalente inhibitor med en N- resp. A-trypsinharpiks ved forskjellige pH-verdier av de vandige suspensjoner er likeledes angitt på tegningen. Som utgangsmateriale tjente teknisk kallikrein-

inhibitor. Dessuten ble det over N-trypsinharpiksene i 86%-ig utbytte utvunnet en ren kallikreininhibitor med en spesifikk aktivitet på 3,75 ImU/ μ g protein (ekseperimentelle enkeltheter som under eksempel 2a).

c) Inhibitor fra soyabønner.

Trypsin-chymotrypsin-inhibitoren fra soyabønner (molekylvekt ved 23.000) ble anrikt på analog måte som angitt i eksempel 2a. Som utgangspreparater tjente et teknisk inhibitorpreparat (inhibitor fra soyabønne, pract., lyophil. fra firma Serva, Heidelberg) med en spesifikk aktivitet på 0,36 ImU for trypsin pr. μ g biuretprotein. 149.400 ImU for trypsin ble bundet fullstendig til en nøytral N-trypsinharpiks fremstilt av 5 g trypsin. Etter 1 times omrøring av N-trypsinharpiks-inhibitorkomplekset i 0,3 molar KCl-HCl-puffer befant seg 135.000 ImU, dvs. 90% av den bundne mengde i den overstående oppløsning (150 ml). Den spesifikke aktivitet av den således isolerte inhibitor fra soyabønne utgjorde collidinacetatpuffer pH 8,0 2,0 ImU/ μ g biuret-protein, hvilket tilsvarer en omtrent seks gangers anrikning.

Eksempel 3.

Fremstilling av vannuoppløselige inhibitorer ("Trasyol") harpikser.

Anionisk A-harpiks: Til 23 ml 0,2 molar fosfatpuffer, pH 8,0 pluss 2,0 ml av en 0,1%-ig heksametylendiaminoppløsning (HMD) ble det satt 120 mg EMA-81- resp. EMA-31-harpiks fra firma Monsanto. Blandingen ble kort homogenisert, utomrørt og ved nøyaktig 5 minutter (ved "EMA-31"-harpiks 3 minutter) etter harpiksens tilsetning blandet med en oppløsning av 200 mg (ca. 600.000 ImU for trypsin) av trypsin-kallikrein-inhibitoren i 30 ml av samme fosfatpuffer. Reaksjonsblandingen ble omrørt natten over (16 timer) i kjøleskap, deretter sentrifugert og den ikke bundne inhibitormengde bestemt i det overstående. Inhibitorharpiks-utfellingen ble vasket med 0,2 molar trietanolaminpuffer, pH 7,8 flere ganger, inntil vaskevannet forble inhibitorfritt. Alle operasjoner ble gjennomført under avkjøling ved 0 til 4°C.

Nøytral N-harpiks: Blanding som ved A-harpiks. Nøyaktig 8 minutter etter tilsetning av inhibitoroppløsningen til harpikssuspensjonen ("EMS-81") ble det endelig satt en med 2-n saltsyre til pH 8 innstilt oppløsning av 1,6 g N,N-dimetyletylendiamin (NND) i lite vann (volumforhold 1:1) til reaksjonsblandingen (harpiks + inhibitor). Den således dannede blanding ble omrørt ennå i 2 timer,

deretter sentrifugert og den uoppløselige inhibitorblanding viderebehandlet som ovenfor. En ytterligere N-harpiks, hvor N,N-dimetylendiaminhydroklorid istedenfor etter 8 minutter allerede ble tilsatt etter 5 minutter til reaksjonsblandingen (harpiks + inhibitor), er likeledes oppført i tabellen.

Anvendt harpikstype	Omrørings- HMD- og NND-tilsetning	Til harpiksen bundet inhibi- tormengde i %	Inhibitor- harpiks betegnelse
"EMA-31"	3 -	92	A-harpiks
"EMA-81"	5 8	81	N ₈ -harpiks
"EMA-81"	5 5	32	N ₅ -harpiks

a) Adsorpsjon og dissosiasjon av trypsin og chymotrypsin til anioniske (A) og nøytrale (N) inhibitorharpikser.

Adsorpsjon: Inhibitorharpiksen opprøres i ca. 20 ml 0,1 molar trietanolaminpuffer (pluss 0,1 molar NaCl pluss 0,01 molar CaCl₂), pH 7,8 og blandet med et overskudd av enzymet oppløst i litt puffer. Etter 2 timers omrøring (eventuelt natten over) sentrifugeres det og enzyemmengden som forblir i det overstående bestemt. Det uoppløselige harpikskompleks vaskes med puffer, pH 7,8 inntil det i vaskevannet ikke mer er påvisbar noen enzymaktivitet. Arbeidstemperatur 0 til 4°C.

Dissosiasjon og elusjon: Etter den siste vasking oppslemmes det uoppløselige enzym-inhibitorharpiks-kompleks i ca. 50 ml 0,3 molar KCl-oppløsning og den ønskede pH-verdi av suspensjonen innstilt ved tilsetning av 2-n HCl. Etter 2 timers omrøring av den sure suspensjon sentrifugeres det igjen og enzymaktiviteten bestemt i den overstående. Til fullstendig avløsning av enzymet fra harpiksen gjentas denne prosess så lenge (3 til 4 ganger med hver gang 50 ml) inntil det ikke mer er påvisbar nevneverdige enzyemmengder i det overstående.

Anvendt inhibitor- harpiks i harpiksen bundet inhibitormengde type (IU) for trypsin		Adsorbert enzymmengde (mg) % ^a		Avløst enzyemmengde i % (den adsorbte enzyemmengde) ved pH					til- sammen
				3,5	3,0	2,5	2,0	1,7	
Trypsin									
A	66,8	11,8 _b	18	0	0	1	9	60	
N ₅	42,9	18,8	44	1	11	36	69	90	
Chymotrypsin									
A	66,8	3,7	3,5	0	1	6	17	17	
N ₅	42,9	15,7	37	31	45	37		80	

^a referert til enzymmengde som ble hemmet i oppløsningen av samme inhibitormengde og

^b ved første anvendelsen av harpiksen 27,3 mg (63%) ifølge 4 gangers anvendelse konstant 13 mg (30%^a).

b) Anrikning av kallikrein ved hjelp av nøytral inhibitorharpiks.

Det ble anvendt inhibitorharpiksene N₅ og N₈. Til adsorpsjon oppløses kallikrein i ca. 20 ml 0,1 molar trietanolin-puffer (pluss 0,1 molar NaCl), pH 7-8 og inhibitorharpiksen innrøres i kallikreinoppløsningen. Etter ca. 14 timers omrøring (natten over, det er tilstrekkelig med 2 timer) sentrifugeres det og ikke bundet kallikrein bestemmes i det overstående. Det uoppløselige kallikrein-inhibitorharpiks-kompleks vaskes med puffer kallikreinfritt og proteinfritt.

Utløsningen av kallikreinet fra inhibitor-harpiks-komplekset foregikk med 0,38-1 M guanidinsaltoppløsninger, som med 0,1 molar natriumacetatpuffer ble innstilt til den ønskede pH-verdi. For fullstendig utløsning av kallikreinet må harpiskkomplekset omrøres 4 til 5 ganger, hver gang i ca. 20 ml av guanidinsaltoppløsningen i 1 time og deretter frasentrifugeres inhibitorharpiksen (arbeidstemperatur o til 4°C).

Inhibitorharpiks i harpiksen bundet inhibitormengde type (IU) ^a	Adsorbert kallikreinmengde (KE) ^b % ^c		Utløst kallikreinmengde i % (av den adsorberte kallikrein- mengde) med 0,4-1 M guanidin- saltoppløsninger ved pH 7,0 6,0 5,0 tilsammen			
N ₈	9	790 4,9	15	53	59	72
N ₇	24	940 6,2		64		64

^a ImU for trypsin: 1 ImU hemmer ca. 1 µg trypsin og tilsvarer 0,27 µg av den rene inhibitor og 0,33 µg av foreliggende inhibitorprøve.

^b 1 KE (biologisk kallikreinenhet ¹), forårsakes av ca. 0,7 µg protein av det rene kallikrein ²).

^c referert til enzymmengden som hemmes av samme inhibitormengde i oppløsning.

1) E.K. Frey, H. Kraut og E. Werle, kallikrein-padutin, F. Enke-Verlag, Stuttgart 1950.

2) H. Fritz, I. Eckert og E. Werle, A. physiol. Chem. 348, 1120 (1967).

Tegningsforklaring.

N-trypsinharpiksene ble fremstilt som angitt i teksten, A-trypsinharpikser analogt, imidlertid uten tilsetning av N,N-dimetyl-etylendiamin.

Opptrukne kurver: N- resp. A-trypsinharpiks-kompleks med kallikrein-inhibitor.

Stiplede kurver: N- resp. A-trypsinharpiks-kompleks med den spesifikke trypsin-inhibitor fra svinepankreas.

Ordinat: % av den hver gang i komplekset utløste inhibitor ved den angjeldende pH-verdi av suspensjonen.

P a t e n t k r a v :

Fremgangsmåte til anrikning av polypeptider, fortrinnsvis enzymer og enzyminhibitorer, idet man binder et polypeptid (I) - i tilfelle anrikning av enzyminhibitorer det tilsvarende enzym, i tilfelle anrikning av enzymer en tilsvarende enzyminhibitor - covalent på en bærer, bringer det dannede addukt i vann i kontakt med en oppløsning av polypeptidet (II) som skal anrikes, og renser det derved dannede kompleks ved utvaskning, bringer til disosiasjon og isolerer det

anrikede polypeptid (II), k a r a k t e r i s e r t ved at man som bærer anvender copolymerisater av flere monomere, hvorav minst ett inneholder karboksyanhydridgrupper, at man først lar denne reagere med polypeptid (I) og deretter med alifatiske og/eller aromatiske polyaminer, hvori bare en aminogruppe er usubstituert.

Anførte publikasjoner:

Tysk patent nr. 62 646 (30h-2/04)

124538

