



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **174111**

(13) B

(51) Int Cl⁵ C 12 N 9/64, A 61 K 37/547

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	861408	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	10.04.86	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	10.04.86	(30) Prioritet	11.04.85, DE, 3512910
(41) Alm. tilgj.	13.10.86		
(44) Utlegningsdato	06.12.93		

(71) Patentsøker	Behringwerke Aktiengesellschaft, D-3550 Marburg 1, DE
(72) Oppfinner	Eric Paul Pâques, Marburg, DE
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for rensing av vevsplasminogenaktivatorer (t-PA)

(56) **Anførte publikasjoner** FR 2362155, CH 647548, SE 426844,
Chemical Abstracts, vol. 90, s. 245, 1979, Abstr. nr. 18309a.

(57) **Sammendrag**

Fremgangsmåte for rensing av plasminogen-aktivator (PA), hvori en urokinase eller vev-plasminogenaktivatorholdige oppløsning bringes i kontakt med en bærerbundet polysvovelsyreester av et sakkarid eller sulfatert sukker, væsken adskilles og det av dette material bundede PA elueres.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for rensing av vevsplasminogenaktivatorer (t-PA).

Plasminogen omdannes ved hjelp av plasminogenaktivatorer til plasmin, Til katalysatorene av denne reaksjon hører urokinase og t-PA. Den terapeutiske anvendelse av disse aktivatorer som fibrinolytika er kjent. På grunn av dets store affinitet til fibrin er t-PA av spesiell betydning for lyse-terapi.

Det er allerede omtalt metoder til isolering og rensing av PA fra det overstående fra cellekulturer og urin (DE-OS 28 15 853, EP BL 00 41 766). Disse fremgangsmåter er omstendelige og derfor ikke egnet for en anvendelse i stor skala.

I EP BL 0 041 766 omtales en fremgangsmåte til isolering av t-PA. Hertil anvendes "Zink-Chelat-Sepharose", "Concanavalin-A-Agarose" og "Sephadex" G-150 (Superfine). Hver av disse rensetrinn er forbundet med store ulemper: Zink og konkanavalin A kan kontaminere produktet og "Sephadex" G-150 (Superfine) er på grunn av dets kapasitet og dets gjennomstrømningsegenskaper ikke anvendbar for en fremgangsmåte som anvendes i stor skala. I EP BL 0 023 869 beskrives rensingen av t-PA med en bærer, hvorpå oppløselige fragmenter av fibrin er fiksert ved hjelp av kovalent binding.

Denne fremgangsmåte egner seg heller ikke for isoleringsfremgangsmåter som anvendes i stor skala.

Til grunn for oppfinnelsen ligger den oppgave å tilveiebringe en enkel rensefremgangsmåte for PA.

Det ble overraskende funnet at det ovenfor betegnede PA har en høy affinitet til polysvovelsyreester og sakkarider eller sulfaterte sukkerer og en rensing av dette PA over en slik svovelsyreester er mulig når denne er bundet til en bærer.

Oppfinnelsens gjenstand er følgelig en fremgangsmåte for rensing av vevsplasminogenaktivatorer, idet fremgangsmåten er karakterisert ved at en oppløsning som inneholder vevsplasminogenaktivator eller et derivat derav, bringes i kontakt med en bærerbundet heparin, heparinderivat eller pentosansulfonat, væsken separeres, affinitetsmaterialet renses for forurensninger og det bundne t-PA eller et derivat derav elueres.

Forutsetninger som er bundet av affinitetsmaterialet fjernes fortrinnsvis før elueringen av aktivatoren ved vasking.

Affinitetsmaterialet vaskes fortrinnsvis med en buffer inneholdende natriumsulfat, ammoniumsulfat, NaCl, LiCl eller citrat befris for forurensninger og aktivatoren elueres med en bufferoppløsning inneholdende kalsiumnitrat, ammoniumklorid, bariumklorid, kaliumbromid, kalsiumklorid, magnesiumklorid, kaliumtiocyanat, urinstoff eller en blanding av disse stoffer.

Som bærermateriale for en kovlant kobling av polysvovelsyreestere av et sakkarid eller sulfaterte sukkerer kan det eksemplervis anvendes uoppløselige agarose-, dekstran-, akrylamid- eller polyetylenglykolyglycidylmetakrylat-polymere eller deres kombinasjon. Det foretrekkes dekstran- eller agarose-matriser.

Koblingen av polysvovelsyreestere av sakkarider eller sulfaterte sukkerer foregår etter kjente metoder som eksempelvis ved binding til bromcyan-foraktivert bærermateriale, respektivt til aminofunksjonalisert harpiks ved hjelp av karbodiimid-kondensasjon, fortrinnsvis imidlertid ved kobling til lysin-funksjonalisert bærermateriale ved hjelp av karbodiimid-kondensasjon.

Som polysvovelsyreestere av et sakkarid eller sulfatert

sukker kan det anvendes heparin, heparinderivat eller pentosansulfat.

En ytterligere fordelaktig fremgangsmåte består i at den
5 plasminogenaktivatorholdige oppløsning sammenbringes med en
bærerbundet polysvovelsyreester av et sakkarid eller
sulfatert sukker, fortrinnsvis heparin-lysin-sepharose, det
belastede affinitetsmaterialet vaskes med en buffer av pH 3-
9, som eventuelt inneholder NaCl, de til harpiksene bundede
10 forurensninger elueres med en buffer av pH 3-9 inneholdende
natriumsulfat, ammoniumsulfat, NaCl, LiCl eller citrat,
fortrinnsvis med en 0,1-2 mol/l citratoppløsning av pH 3-9,
fortrinnsvis med 0,5 mol/l citrat pH 3,5-6. og plasminogen-
aktivatoren elueres med en buffer av pH 3-9 inneholdende
15 KNO₃, KSCN, NH₄Cl, CaCl₂, MgCl₂, KBr, BaCl₂ eller urinstoff,
fortrinnsvis 1-2 mol/l KSCN, fortrinnsvis pH 5-8, inne-
holdende eventuelt detergenter, fortrinnsvis 0,1-1 g/l
"Tween" 80 (polyoksyetylensorbitan-monooleat).

20 I en spesiell foretrukket utførelsesform kan man gå fram
således at man blander den t-PA-holdige oppløsning, eks-
empelvis melamon-cellekulturoverstående eller urin, eventuelt
avsaltet, med heparin-, dekstran-sulfat- eller pentosan-
sulfat-"Sepharose", fortrinnsvis heparin-"Sepharose",
25 foretrukket heparin-lysin-"Sepharose", fortrinnsvis i et
forhold på 10 l cellekulturoverstående til 100 g affinitets-
materiale, harpiksen befris for forurensninger med 0,1-2
mol/l citratoppløsning, pH 3-9, fortrinnsvis med 0,5 mol/l
citrat, pH 3,5-6, og plasminogenaktivator elueres med en
30 buffer inneholdende 1-2 mol/l KSCN, pH 5-8, eventuelt
inneholdende 0,1-1 g/l "Tween" 80.

I en videre spesielt foretrukket utførelsesform kan man også
gå fram således at man eluerer PA med en bufferoppløsning,
35 inneholdende 1-2 mol/l CaCl₂ med en pH-verdi på 4-9,
fortrinnsvis med en 2 mol/l CaCl₂-oppløsning av pH 5-8,
inneholdende eventuelt 0,1-1 g/l "Tween" 80.

Fremgangsmåten utmerker seg ved at t-PA kan fåes med et rensetrinn i en renhetsgrad resp. av en spesifikk aktivitet som oppnås først etter flere rensetrinn etter vanlige fremgangsmåter.

5

Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp av nedenstående eksempler.

Eksempel 1

10

15

20

10 l cellekultursupernatant av t-PA produserende melanom-celler ble blandet med 100 g en heparin-"Sepharose" ved værelsestemperatur under omrøring. Affinitetsmaterialet ble etter adskillelse av proteinvasken vasket med 0,1 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l NaCl, pH 7,5, inneholdende 0,1% "Tween" 80, og deretter befridd for forurensninger med 0,5 mol/l citrat pH 5,0. PA ble eluert med en buffer inneholdende 0,1 mol/l Tris-HCl, 2 mol/l KSCN og 0,01% "Tween" 80 pH 7,5. Eluatet ble dialysert, konsentrert og undersøkt på t-PA-aktivitet. Av den i utgangsuppløsningen tilstedeværende t-PA-aktivitet ble 99% bundet til heparin-"Sepharose". Etter eluering ble det gjenfunnet ca 90% av t-PA-aktiviteten.

25

En polyakrylamidgelelektroforese viste to proteinbånd av forskjellig molekylvekt. Et bånd kunne immunologisk tilordnes t-PA.

Eksempel 2

30

10 l cellekultursupernatant ble behandlet som omtalt i eksempel 1, deretter eluert med en 2 mol/l CaCl_2 -oppløsning inneholdende 0,1 mol/l Tris med pH 8,0, inneholdende 0,1% "Tween" 80. Resultatene var sammenlignbare med de angitt i eksempel 1.

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for rensing av en vevsplasminogenaktivator (t-PA), k a r a k t e r i s e r t v e d at en oppløsning som inneholder vevsplasminogenaktivator eller et derivat derav, bringes i kontakt med en bærerbundet heparin, heparinderivat eller pentosansulfat, væsken separeres, 10 affinitetsmaterialet renses for forurensninger og det bundne t-PA eller et derivat derav elueres.

2.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at vevsplasminogenaktivatoren er av human opprinnelse.

3.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at heparin, heparinderivat eller pentosansulfat er bundet via lysin til en bærer.

4.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at bæreren er agarose.

5.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at før elueringen av vevsplasminogenaktivatoren fjernes de bundede forurensninger ved vasking av affinitetsmaterialet med en bufferoppløsning inneholdende NaCl, natriumsulfat, ammoniumsulfat, LiCl eller alkalicitrat.

6.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at før elueringen av vevsplasminogenaktivatoren

fjernes de bundede forurensninger ved vasking av affinitets-
materialet med en 0,4-0,6 mol/l citratoppløsning, pH 3,5-6.

7.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at affinitetsmaterialet, hvortil vevsplasminogens-
aktivator er bundet, renses for forurensninger med en buffer
og vevsplasminogenaktivatoren elueres med en bufferoppløsning
inneholdende 0,5-2 mol/l KSCN, pH 4-9.

10

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at affinitetsmaterialet, hvortil vevsplasminogens-
aktivator er bundet, vaskes med en buffer med pH 4-9, som
15 eventuelt inneholder NaCl, de bundede forurensninger fjernes
ved vasking av affinitetsmaterialet med en 0,4-0,6 mol/l
alkalicitrat-oppløsning, pH 3,5-6, inneholdende eventuelt
0,1-1 g/l polyoksyetylsorbitan-monooleat, og vevsplasmino-
genaktivatoren elueres med en bufferoppløsning inneholdende
20 0,5-2 mol/l kaliumtiocyanat, pH 4-9.

25

30

35