



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

PATENTSCHRIFT A5

11

645 406

21 Gesuchsnummer: 2367/80	73 Inhaber: Tobishi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo (JP)
22 Anmeldungsdatum: 26.03.1980	
30 Priorität(en): 30.03.1979 JP 54-36980	72 Erfinder: Yamashina, Ikuo, Sakyo-ku/Kyoto (JP) Kawasaki, Toshisuke, Hirakata-shi/Osaka (JP) Tsukuda, Michiko, Takamatsu-shi/Kagawa-ken (JP)
24 Patent erteilt: 28.09.1984	
45 Patentschrift veröffentlicht: 28.09.1984	74 Vertreter: Dietlin, Mohnhaupt & Cie, Genève

54 Plasminogenaktivierende Substanz, deren Herstellung und Verwendung.

- 57 Eine neue plasminogenaktivierende Substanz hat folgende Eigenschaften:
- (a) ein Molekulargewicht von 80000 ± 10000 ;
 - (b) einen isoelektrischen Punkt von 7,1;
 - (c) ein Ultraviolett-Absorptionsspektrum mit einem Peak ($\lambda_{\max}$) bei einer Wellenlänge von 278 nm;
 - (d) eine derartige fibrinolytische Aktivität, dass eine Platte eines mit Calcium versetzten Standardfibrins durch Lyse angegriffen wird, eine erwärmte Fibrinplatte jedoch keine lytische Zersetzung erfährt;
 - (e) eine solche thermische Stabilität, dass bei zehnminütigem Erwärmen auf 80°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf die Hälfte der ursprünglichen Wirkung zurückgeht, und bei einer dreissigminütigen Erwärmung auf 60°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf 30 bis 40 % der ursprünglichen Wirkung zurückgeht;
 - (f) Löslichkeit in einer Salzlösung, jedoch Unlöslichkeit in wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln und
 - (g) eine lytische Wirksamkeit auf synthetische Substrate, derart, dass Glutaryl-Gly-Arg-MCA sowie Pro-Phe-Arg-MCA nur spärlich hydrolysiert werden (MCA bedeutet 4-Amino-7-methylcumarin).

Diese Substanz gewinnt man durch Extraktion aus Schweinegalle, indem man die Galle mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel fraktioniert, die gebildete Fällung mit einer Pufferlösung vom pH 7,0 bis 8,0

extrahiert, die so gebildete Extraktlösung mit Aceton fraktioniert, die anfallende Fällung einer zweiten Extraktion mit einer Pufferlösung vom pH 7,0 bis 8,0 unterwirft und die erhaltene zweite Extraktlösung durch Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit, durch Ionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher oder durch Adsorptionschromatographie an einem hydrophoben Adsorptionsmittel nochmals fraktioniert, wobei man eine Fraktion erhält, welche die genannte plasminogenaktivierende Substanz in guter Reinheit enthält.

Diese plasminogenaktivierende Substanz wird in einem Mittel zur Behandlung von Thrombosen verwendet, da die Substanz eine fibrinolytische Wirksamkeit auslöst.

PATENTANSPRÜCHE

1. Plasminogenaktivierende Substanz, die ein Extrakt aus Schweinegalle ist und die folgenden Eigenschaften aufweist:

- (a) ein Molekulargewicht von $80\,000 \pm 10\,000$;
- (b) einen isoelektrischen Punkt von 7,1;
- (c) ein Ultraviolett-Absorptionsspektrum mit einem Peak bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max}$ von 278 nm;
- (d) eine derartige fibrinolytische Aktivität, dass eine Platte eines mit Calcium versetzten Standardfibrins durch Lyse angegriffen wird, eine erwärmte Fibrinplatte jedoch keine lytische Zersetzung erfährt;
- (e) eine solche thermische Stabilität, dass bei zehnmütigem Erwärmen auf 80°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf die Hälfte der ursprünglichen Wirkung zurückgeht, und bei einer dreissigminütigen Erwärmung auf 60°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf 30 bis 40% der ursprünglichen Wirkung zurückgeht;
- (f) Löslichkeit in einer Salzlösung, jedoch Unlöslichkeit in wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln, und
- (g) eine lytische Wirksamkeit auf synthetische Substrate, derart, dass Glutaryl-Gly-Arg-(7-Amino-4-methyl-cumarin), sowie Pro-Phe-Arg-(7-Amino-4-methyl-cumarin) nur spärlich hydrolysiert werden.

2. Verfahren zur Herstellung einer plasminogenaktivierenden Substanz gemäss Anspruch 1 aus Schweinegalle, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst Schweinegalle mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel unter Erhalt einer ersten Fällung fraktioniert;

die erhaltene erste Fällung einer ersten Extraktion mit einer Pufferlösung vom pH 7,0 bis 8,0 unter Erhalt einer ersten Extraktlösung unterwirft;

diese erste Extraktlösung mit Aceton unter Erhalt einer zweiten Fällung fraktioniert;

diese zweite Fällung einer zweiten Extraktion mit einer Pufferlösung vom pH 7,0 bis 8,0 unter Erhalt einer zweiten Extraktlösung unterwirft, und

diese zweite Extraktlösung erneut fraktioniert, und zwar durch Adsorptionschromatographie unter Verwendung von Hydroxylapatit, durch Ionenaustauschchromatographie mittels eines Anionenaustauschers oder durch hydrophobe Adsorptionschromatographie mittels eines hydrophoben Adsorptionsmittels, wodurch man eine Fraktion erhält, welche die plasminogenaktivierende Substanz enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als wasserlösliches organisches Lösungsmittel Aceton, Methylalkohol, Äthylalkohol und/oder Isopropylalkohol verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die erste Fraktionierung in Gegenwart eines wasserlöslichen Salzes ausführt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als wasserlösliches Salz Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat, Kaliumacetat oder/und Natriumacetat verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die erste Fraktionierung bei Zimmertemperatur oder einer darunterliegenden Temperatur ausführt.

7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pufferlösung bei der ersten Extraktion Lösungen von Ammoniumformiat, Ammoniumacetat, Trischlorhydrat oder/und Natriumphosphat verwendet, welche jeweils einen pH-Wert im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweisen.

8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Pufferlösung der ersten Extraktion Ammoniumsulfat in einer molaren Konzentration von 0,01 bis 0,1 M enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Pufferlösung der ersten Extraktion ausser dem Ammoniumsulfat noch Harnstoff in einer molaren Konzentration von 2 bis 6 M enthält.

10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Extraktion bei einer Temperatur von 5°C oder darunter ausgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Fraktionierung bei einer Temperatur von 5°C oder darunter ausgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Extraktionslösung ein wasserlösliches Calciumsalz in einer molaren Konzentration von 0,01 bis 0,1 M enthält.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als wasserlösliches Calciumsalz Calciumacetat oder/und Calciumchlorid eingesetzt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Hydroxylapatit mit einer 0,02molaren Phosphatpufferlösung mit einem pH von circa 7,0, welche Harnstoff in einer Konzentration von 2 bis 6 M enthält, bis zum Adsorptionsgleichgewicht behandelt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Anionenaustauscher bei der Ionenaustauschchromatographie Cellulosederivate mit schwach basischen anionenaustauschenden Gruppen oder Gele verwendet.

16. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Ionenaustauschchromatographie bei einem pH im Bereich von 5 bis 8 ausführt.

17. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die bei der dritten Fraktionierung erhaltene Fraktion durch Eindampfen oder/und Ultrafiltration aufkonzentriert.

18. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die bei der dritten Fraktionierung erhaltene Fraktion zusätzlich durch ein Molekularsieb gereinigt wird.

19. Medikament gegen Thrombosen, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoffkomponente eine plasminogenaktivierende Substanz gemäss Anspruch 1 enthält.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine plasminogenaktivierende Substanz, auf ein Verfahren zu deren Herstellung sowie ein Medikament, welches diese Substanz enthält. Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz ist ein Extrakt aus der Galle von Schweinen und besitzt eine überragende plasminogenaktivierende Wirksamkeit in ausgedehnten Bereichen des pH und der Temperatur. Weiterhin betrifft die Erfindung die Herstellung dieser Substanz sowie deren Verwendung in einem Mittel gegen Thrombose.

Es ist bekannt, dass das Blut unter normalen Verhältnissen Plasminogen enthält, welches die Fibrinolyse nicht bewirkt, und dieses Plasminogen kann durch die Einwirkung einer plasminogenaktivierenden Substanz in das Plasmin überführt werden, welches nun in der Lage ist, Fibrin zu spalten. Es liegt auf der Hand, dass eine plasminogenaktivierende Substanz ein Medikament zur Bekämpfung von Thrombosen darstellt. Gegenwärtig wird die plasminogenaktivierende Substanz aus menschlichem Urin hergestellt, und man nennt diese Substanz Urokinase. Es leuchtet ein, dass es schwierig ist, Urokinase im industriellen Massstab herzustellen. Im Jahre 1963 wurde durch S. Oshiba und S. Hata gefunden, dass in der Galle von Hunden und Kaninchen eine Substanz enthalten ist, welche sich von den bekannten Gallensäuresalzen unterscheidet, jedoch in der Lage ist, Plasminogen zu aktivieren. Durch weitere Forschungen wurde dann

gefunden, dass die plasminogenaktivierende Substanz aus der Galle von Hunden und Kaninchen ein nicht dialysierbares Protein ist, welches in die Gruppe der Pseudoglobuline oder Albumine gehört und mit einer 50%igen gesättigten Ammoniumsulfatlösung ausgefällt werden kann. Diese Forscher benannten die erhaltene plasminogenaktivierende Substanz Bilokinase (BK) [siehe J. Physiol. Soc., Japan, 29, 116–126 (1967)].

Es wurde aber weiterhin gefunden, dass die aus der Galle von Hunden und Kaninchen isolierte plasminogenaktivierende Substanz durch dreissigminütiges Erwärmen auf eine Temperatur von 60°C leicht inaktiviert wird, und dass die plasminogenaktivierende Wirksamkeit nur in einem relativ engen pH-Bereich von 4 bis 9 auftritt. Weiterhin ist es schwierig, grosse Mengen an Hunde- und Kaninchengallen zusammenzutragen.

Unter diesen geschilderten Verhältnissen besteht ein starker Bedarf nach einer neuen plasminogenaktivierenden Substanz, die leicht und in grossen Mengen zugänglich ist, in einem weiten pH-Bereich eine ausgezeichnete plasminogenaktivierende Wirksamkeit entfaltet und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Denaturierung bei erhöhten Temperaturen aufweist.

Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung war daher eine plasminogenaktivierende Substanz, die einen Extrakt aus der Galle von Schweinen darstellt und eine ausgezeichnete plasminogenaktivierende Wirksamkeit in einem weiten pH-Bereich sowie eine hohe thermische Stabilität besitzt; weiterhin stellte sich als erfindungsgemässe Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung dieser Substanz aus Schweinegalle und ihre Verwendung in einem Mittel gegen Thrombose.

Diese genannten Aufgaben werden nun durch die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz gelöst, welche einen Extrakt aus der Galle von Schweinen darstellt und die folgenden Eigenschaften aufweist:

- (a) ein Molekulargewicht von $80\,000 \pm 10\,000$;
 - (b) einen isoelektrischen Punkt von 7,1;
 - (c) ein Ultraviolett-Absorptionsspektrum mit einem Peak (λ_{max}) bei einer Wellenlänge von 278 nm;
 - (d) eine derartige fibrinolytische Aktivität, dass eine Platte eines mit Calcium versetzten Standardfibrins durch Lyse angegriffen wird, eine erwärmte Fibrinplatte jedoch keine lytische Zersetzung erfährt;
 - (e) eine solche thermische Stabilität, dass bei zehnminütigem Erwärmen auf 80°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf die Hälfte der ursprünglichen Wirkung zurückgeht, und bei einer dreissigminütigen Erwärmung auf 60°C die plasminogenaktivierende Wirkung auf 30 bis 40% der ursprünglichen Wirkung zurückgeht;
 - (f) Löslichkeit in einer Salzlösung, jedoch Unlöslichkeit in wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln und
 - (g) eine lytische Wirksamkeit auf synthetische Substrate, derart, dass Glutaryl-Gly-Arg-MCA sowie Pro-Phe-Arg-MCA nur spärlich hydrolysiert werden.
- «MCA» ist hier und im folgenden die Abkürzung für den 7-Amino-4-methylcumarinrest.

Die derart definierte plasminogenaktivierende Substanz wird vorzugsweise nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhalten, welches aus den folgenden Schritten besteht:

eine erste Fraktionierung der Schweinegalle mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel unter Erhalt einer ersten Fällung;

erste Extraktion der erhaltenen ersten Fällung mit einer Pufferlösung, welche ein pH im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweist, wobei eine erste Extraktlösung anfällt;

zweite Fraktionierung der ersten Extraktlösung mit Aceton unter Erhalt einer zweiten Fällung;

Ausführung einer zweiten Extraktion an der zweiten Fällung mit einer ein pH im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweisenden Pufferlösung unter Herstellung einer zweiten Extraktlösung und

eine dritte Fraktionierung der zweiten Extraktlösung durch Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit, durch Ionenaustauschchromatographie mit einem Anionenaustauscher oder durch hydrophobe Adsorptionschromatographie mit einem hydrophoben Adsorptionsmittel, wobei eine Fraktion anfällt, die die oben beschriebene plasminogenaktivierende Substanz enthält.

Falls es erforderlich ist, können die beschriebenen Schritte des Verfahrens durch weitere einfache Schritte ergänzt werden, insbesondere Aufkonzentrierung und/oder zusätzliche Reinigung der nach der dritten Fraktionierung erhaltenen Fraktion.

Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz kann als Wirkstoffkomponente in einem Medikament gegen Thrombose verwendet werden.

Die Erfindung soll nun an Einzelheiten anhand der Zeichnung und der folgenden Beschreibung näher erläutert werden.

In der Zeichnung stellen dar:

Fig. 1 ein Ultraviolett-Absorptionsspektrogramm der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz, und Fig. 2 ein Infrarot-Absorptionsspektrogramm der gleichen erfindungsgemässen Substanz.

Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz stellt einen Extrakt aus Schweinegalle dar und ist durch die oben definierten Eigenschaften charakterisiert. Es sollte insbesondere daraufhingewiesen werden, dass die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz nicht nur in einem weiten pH-Bereich von 3 bis 10 eine ausgezeichnete Wirksamkeit ausübt, sondern ausserdem eine solche ausgezeichnete thermische Stabilität, dass dreissigminütiges Erwärmen auf 60°C nur in einem Abfall der plasminogenaktivierenden Wirksamkeit von 30 bis 40% resultiert.

Die bekannte Bilokinase besitzt demgegenüber nur eine derartig geringe Wärmostabilität, dass die gleiche erwähnte Erwärmung zur völligen Inaktivierung der Wirksamkeit führt. Ausserdem kann die bekannte Bilokinase ihre plasminogenaktivierende Wirkung nur in einem engen pH-Bereich, nämlich von 4 bis 9 ausüben. Daraus geht hervor, dass die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz sich von der bekannten Bilokinase unterscheidet und ihr überlegen ist. Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz besitzt ein hohes Molekulargewicht, nämlich von 80000 ± 10000 , und zeigt eine besondere Esterasewirkung bei der Hydrolyse des synthetischen Substrats. Dies bedeutet, dass Glutaryl-Bly-Arg-MCA und Pro-Phe-Arg-MCA durch die Einwirkung der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz nur unbedeutend hydrolysiert werden. Demgegenüber kann die bekannte, aus menschlichem Urin hergestellte Urokinase Glutaryl-Gly-Arg-MCA stark zersetzen, greift jedoch Pro-Phe-Arg-MCA nicht an. Daraus geht hervor, dass die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz von Urokinase verschieden ist.

Der von den Erfindern für die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz vorgeschlagene Name lautet «Biloplasminokinase (Hog)». Es wurde weiterhin gefunden, dass man die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz als Wirkstoffkomponente eines Medikaments gegen Thrombose verwenden kann, und dass dieses Medika-

ment keine unerwünschten Nebenwirkungen aufweist.

Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz besitzt das in Fig. 1 dargestellte Ultraviolett-Absorptionsspektrum. Dieses zeigt einen charakteristischen Peak bei einer Wellenlänge von 278 nm.

Die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz kann aus Schweinegalle nach dem oben definierten erfindungsgemässen Verfahren hergestellt werden, bei dem eine erste Fraktionierung, eine erste Extraktion, eine zweite Fraktionierung, eine zweite Extraktion und eine dritte Fraktionierung erforderlich sind.

Bei der ersten Fraktionierung wird die Schweinegalle mittels eines wasserlöslichen organischen Lösungsmittels fraktioniert. Dieses kann eines oder mehrere der folgenden Substanzen sein: Aceton, Methylalkohol, Isopropylalkohol, Äthylalkohol. Das am meisten bevorzugte Lösungsmittel ist Aceton. Die Menge an wasserlöslichem organischem Lösungsmittel, die mit der Schweinegalle vermischt wird, unterliegt keiner Begrenzung. Üblicherweise wird das wasserlösliche organische Lösungsmittel in etwa äquivalenten Gewichtsmengen, bezogen auf die Schweinegalle, eingesetzt.

Um die Bildung der ersten Fällung schneller einzuleiten, gibt man bevorzugt ein wasserlösliches Salz zum Fraktionierungsgemisch. Dieses kann Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat, Kaliumacetat oder/und Natriumacetat sein. Normalerweise verwendet man das wasserlösliche Salz in einer Konzentration im Bereich von 0,01 bis 0,1 M.

Man bevorzugt weiterhin, dass die erste Fraktionierung bei Zimmertemperatur oder darunter ausgeführt wird, insbesondere bei 5°C oder darunter. Beispielsweise kühlt man die Schweinegalle auf eine Temperatur von 5°C oder darunter vor und mischt sie dann mit dem wasserlöslichen Salz in solchen Mengen, dass sich in der letztlich erhaltenen Mischung eine Salzkonzentration von 0,01 bis 0,1 M ergibt; dann fügt man das auf eine Temperatur von 0°C oder darunter vorgekühlte wasserlösliche organische Lösungsmittel nach und nach in einer Menge zu, die derjenigen der Schweinegalle entspricht, während das Gemisch gerührt wird. Schliesslich lässt man dieses Gemisch bei 5°C oder darunter, vorzugsweise bei 0°C so lange stehen, bis sich die erste Fällung gebildet hat und vollständig ist. Diese erste Fällung wird nun vom Gemisch beispielsweise mittels Dekantieren und/oder Zentrifugieren abgetrennt.

Im Verlaufe der ersten Extraktion wird die abgetrennte erste Fällung mit einer Pufferlösung behandelt, die so zusammengesetzt und eingestellt ist, dass sie ein pH im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweist, vorzugsweise zwischen 7,5 und 8,0, damit lösliche Anteile der ersten Fraktion aufgelöst werden. Unlösliche Anteile der ersten Fällung werden von der erhaltenen ersten Extraktlösung beispielsweise durch Dekantieren, Filtrieren und/oder Zentrifugieren abgetrennt. Die bei der ersten Extraktion eingesetzte Pufferlösung ist nicht auf besonders zusammengesetzte Lösungen beschränkt, sie muss nur einen pH-Wert im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweisen. Üblicherweise wählt man die Pufferlösung aus Lösungen von Ammoniumformiat, Ammoniumacetat und Gemischen aus Tris und Salzsäure, die jeweils ein pH im Bereich von 7,0 bis 8,0 aufweisen müssen.

«Tris» ist die Abkürzung für Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, eine oft verwendete Puffersubstanz.

Die Pufferlösung kann die gleichen wasserlöslichen Salze wie diejenigen der ersten Fraktionierung enthalten, und zwar ebenfalls in einer Konzentration von 0,01 bis 0,1 M. In diesem Falle ist es günstig, Harnstoff in Mengen von 2 bis 6 M zur Pufferlösung zuzugeben. Die Zugabe von Harnstoff steigert die Extraktionsgeschwindigkeit der Fraktion mit der wirksamen, erfindungsgemässen Substanz bei der Extraktion durch die Pufferlösung. Die erste Extraktion wird bevorzugt

bei einer Temperatur von 5,0°C oder darunter ausgeführt.

Die zweite Fraktionierung geschieht im allgemeinen durch Vermischen vorgekühlten Acetons, vorzugsweise auf eine Temperatur von 0°C oder darunter mit der ersten Extraktlösung, die ebenfalls vorgekühlt wurde, insbesondere auf eine Temperatur von 5°C oder darunter, während man die Mischung umrührt, und man erhält eine zweite Fällung. Die zweite Fraktionierung kann in zwei oder mehreren Etappen erfolgen, beispielsweise wird in einer ersten Fraktionierungsetappe die erste Extraktlösung zunächst mit solchen Mengen an vorgekühltem Aceton vermischt, dass dessen Konzentration in dem gebildeten ersten Gemisch etwa 30 Gewichtsprozent beträgt und aus diesem Gemisch wird eine Fällung abgetrennt; in der nachfolgenden zweiten Fraktionierungsetappe wird der Rest des ersten Gemisches mit solchen Mengen an vorgekühltem Aceton vereinigt, dass dessen Konzentration in dem entstandenen zweiten Gemisch etwa 50 Gewichtsprozent beträgt, und die dabei entstehende Fällung wird wiederum vom Gemisch abgetrennt.

Die zweite Fraktionierung kann so geschehen, dass man die erste Extraktlösung mit solchen Mengen eines wasserlöslichen Calciumsalzes vermischt, dass dessen Konzentration im Gemisch 0,01 bis 0,1 M beträgt. Das wasserlösliche Calciumsalz kann Calciumacetat und/oder Calciumchlorid sein. Die entstandene zweite Fällung wird nun von der acetonhaltigen Extraktlösung abzentrifugiert.

Bei der zweiten Extraktion wird die abgetrennte zweite Fällung der Lösekraft einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,0 bis 8,0 ausgesetzt, um aus der Fällung eine lösliche Fraktion ausziehen, die den erfindungsgemässen Wirkstoff enthält. Die unlösliche Fraktion der zweiten Fällung wird von der erhaltenen zweiten Extraktlösung abgetrennt. Diese zweite Extraktlösung zeigt bereits eine ausgeprägte plasminogenaktivierende Wirksamkeit. Die zweite Extraktion kann auf die gleiche Weise wie die erste Extraktion ausgeführt werden. Bei der zweiten Extraktion bringt es jedoch keinen Vorteil, Harnstoff der Pufferlösung zuzusetzen.

Die zweite Extraktlösung wird nun einer dritten Fraktionierung unterworfen, und zwar durch Adsorptionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder hydrophobe Adsorptionschromatographie. Jede dieser genannten chromatographischen Methoden kann entweder in einer Säule oder absatzweise ausgeführt werden.

Bei der Adsorptionschromatographie verwendet man als Fraktionierungsmittel Hydroxylapatit, welcher der Formel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ entspricht. Bei Verwendung von Hydroxylapatit bringt man diesen zunächst vorzugsweise mit einer 0,02 M-Phosphatpufferlösung vom pH 7,0 ins Gleichgewicht, welche weiterhin Harnstoff enthält. Dieser ist vorzugsweise in einer Konzentration von 2 und 6 M in der Pufferlösung anwesend.

Führt man die dritte Fraktionierung mit dem Hydroxylapatit an einer Kolonne aus, so giesst man die zweite Extraktlösung auf eine mit dem Hydroxylapatit gefüllte Kolonne, wobei ein Teil der Extraktlösung, welcher die erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz enthält, am Hydroxylapatit adsorbiert wird. Dann wird der Hydroxylapatit mit der gleichen Pufferlösung gewaschen, die zur Gleichgewichtseinstellung des Hydroxylapatits verwendet wurde, so lange bis der Ablauf aus der Kolonne keine Ultraviolettabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm mehr zeigt. Nun wird die am Hydroxylapatit adsorbierte Fraktion mit einer harnstoffhaltigen 0,2 M-Phosphatpufferlösung eluiert. Die in dem adsorbierten Anteil enthaltene plasminogenaktivierende Substanz kann durch diese Extraktion vollständig wiedergewonnen werden.

Die Ionenaustauschchromatographie wird unter Verwendung eines Anionenaustauschers ausgeführt. Dieser kann ein

Cellulosederivat mit einem schwach basischen Ionenaustauschenden Rest sein, beispielsweise die Äthylaminoäthylcellulose; auch sind Gele verwendbar wie Agarosegele und vernetzte hochmolekulare Dextronge, beispielsweise Sephoro- und Diäthylaminoäthyl-Sephadex, hergestellt von der Firma Pharmacia Feinchemikalien in Schweden.

Bei der Fraktionierung durch Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe des Anionenaustauschers wird ein Anteil der Lösung, welcher die erfindungsgemäße plasminogenaktivierende Substanz enthält, am Anionenaustauscher bei einem pH im Bereich von 5 bis 8 festgehalten. Um jedoch die Fraktionierung hochwirksam zu gestalten, wird bevorzugt, dass man die Ionenaustauschchromatographie bei einem pH im Bereich von 7,5 bis 8,0 ausführt, und zwar unter Verwendung einer Pufferlösung, welche eine erhöhte Konzentration an wasserlöslichem Salz aufweist. Um die Löslichkeit der plasminogenaktivierenden Substanz zu erhöhen, bevorzugt man eine Zugabe von Harnstoff zur Pufferlösung in einer Konzentration von 2 bis 6 M.

Beispielsweise kann die Fraktionierung durch Ionenaustauschchromatographie derart vorgenommen werden, dass man die Fraktionierung durch Ionenaustauschchromatographie derart vornimmt, dass man einen Anionenaustauscher, der aus Diäthylaminomethyl-Sephadex A-50 besteht (Handelsmarke eines Anionenaustauschers der Pharmacia Feinchemikalien Schweden) mit einer Pufferlösung aus 0,1 M Tris und Salzsäure mit einem pH von 8,0, welche 2 M Harnstoff enthält ins Gleichgewicht bringt und dann die zweite Extraktlösung auf die Kolonne aufgibt. Die plasminogenaktivierende Substanz der Erfindung wird dann am Anionenaustauscher gebunden. Dann wird der Anionenaustauscher, an den die erfindungsgemäße plasminogenaktivierende Substanz gebunden ist, mit der gleichen Pufferlösung gespült, die zur Gleichgewichtseinstellung des Austauschers verwendet wurde. Schliesslich wird die Fraktion, welche die plasminogenaktivierende Substanz enthält, mit einer Pufferlösung aus Tris und Salzsäure, die Natriumchlorid in einer Konzentration von 0,2 M enthält, eluiert.

Die Fraktionierung durch hydrophobe Adsorptionschromatographie wird unter Verwendung eines hydrophoben Adsorptionsmittels ausgeführt, beispielsweise Phenyl-Sephadex der Pharmacia Feinchemikalien, Schweden. In diesem Falle unterwirft man die bei der zweiten Fraktionierung erhaltene Fällung der zweiten Extraktion durch eine Pufferlösung mit 0,05 M Tris-Salzsäure und einem pH von 8,0. Die erhaltene zweite Extraktlösung vermischt man mit Natriumchlorid oder Ammoniumsulfat in solchen Mengen, dass die Salzkonzentration im Gemisch zwischen 1 und 10 Gewichtsprozent liegen. Diese erhaltene Mischung wird dann auf eine mit Phenyl-Sephadex gefüllte Kolonne gegeben, und die erfindungsgemäße plasminogenaktivierende Substanz wird an der Phenyl-Sephadex adsorbiert. Danach wird die Phenyl-Sephadex mit der oben genannten Pufferlösung ausgewaschen, und dann wird eine Fraktion, welche die plasminogenaktivierende Substanz enthält, mit einer Pufferlösung extrahiert, die die gleiche Zusammensetzung wie erwähnt besitzt, mit der Änderung jedoch, dass die Konzentration an Ammoniumsulfat auf 3 Gewichtsprozent vermindert wird. Schliesslich wird die in der Kolonne verbleibende restliche Fraktion mit einer Pufferlösung eluiert, die die obige Zusammensetzung mit Ausnahme von Ammoniumsulfat hat.

Wenn erforderlich, kann die bei der dritten Fraktionierung gewonnene Fraktion aufkonzentriert und/oder weiter gereinigt werden. Das Aufkonzentrieren kann durch Eindampfen oder/und Ultrafiltration geschehen. Bei der gegebenenfalls vorgenommenen zusätzlichen Reinigung kann man ein Molekularsieb einsetzen.

Wenn es erforderlich ist, die Fraktion, welche den erfin-

dungsgemässen Wirkstoff enthält, weiter aufzuarbeiten, engt man diese zweckmässig zunächst durch ein Eindampfen und/oder Ultrafiltration ein und nimmt dann eine zusätzliche Reinigung vor. Zu diesem Zweck bringt man ein Molekularsieb in eine Kolonne und stellt unter Verwendung der gleichen Pufferlösung, wie sie bei der dritten Fraktionierung zur Gleichgewichtseinstellung der Kolonne verwendet wurde, das Gleichgewicht an der Molekularsiebkolonne ein. Dann bringt man die konzentrierte Fraktion auf das im Gleichgewicht befindliche Molekularsieb. Danach wird eine chromatographische Fraktionierung unter Verwendung der oben genannten Pufferlösung vorgenommen. Diese zusätzliche Reinigung erlaubt die Gewinnung der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz in hoher Reinheit.

Die Vorteile der vorliegenden Erfindung werden durch die nachfolgenden Beispiele weiter gestützt.

In den Beispielen wird die plasminogenaktivierende Wirksamkeit der erfindungsgemässen Substanz durch die fibrinolytische Wirkung dargestellt, da letztere ein Parameter ist, der unmittelbar mit der plasminogenaktivierenden Wirksamkeit gekoppelt ist. Dabei wurde die fibrinolytische Aktivität nach der Fibrinplattenmethode bestimmt, welche von J. Ploug u. Mitarb. in *Biochim. Biophys. Acta* 24, 278 bis 282 (1957) beschrieben ist. Als plasminogenaktivierende Vergleichssubstanz wurde Urokinase mit 6000 internationalen Einheiten (I.E.), hergestellt von Midori Juji Co., Japan, in der gewünschten Konzentration eingesetzt.

Die fibrinolytische Aktivität (A) der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz wird nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$A = B \times \frac{a}{b}$$

worin A die fibrinolytische Aktivität in Einheiten der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz, B eine vergleichsweise fibrinolytische Aktivität in Urokinaseeinheiten, a das Gebiet einer Fibrinplatte, welches durch die erfindungsgemäße plasminogenaktivierende Substanz zer-
40 setzt wurde und b die zum Vergleich dienende Fläche der durch Urokinase zersetzten Fibrinplatte bedeutet.

Die Esteraseaktivität der plasminogenaktivierenden Substanz wurde durch Messung derjenigen Menge an 7-Amino-4-methylcumarin (MCA) bestimmt, welche durch Reaktion der plasminogenaktivierenden Substanz mit einem ersten synthetischen Substrat (A), bestehend aus Glutaryl-Gly-Arg-MCA, und mit einem zweiten synthetischen Substrat (B) aus Pro-Phe-Arg-MCA bei dreissigminütiger Einwirkung bei 37°C erzeugt wurde. Die Messung wurde mit Hilfe eines
50 Fluorophotometers ausgeführt, und die Esteraseaktivität wurde als Einheiten von picomol/min (pmol/min) dargestellt.

Der Gehalt an Proteinen in der plasminogenaktivierenden Substanz wurde durch Ultraviolett-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$E_{1\%}^{280\text{ nm}} = 10$$

Beispiel 1

Erste Fraktionierung

2 Liter Schweinegalle wurden mit so viel Ammoniumsulfat vermischt, dass dessen Konzentration im entstehenden Gemisch 10 Gewichtsprozent betrug. Dann wurde das
65 Gemisch auf 5°C abgekühlt. Dann wurden 2 Liter Aceton, welches zuvor auf -10°C vorgekühlt worden war, unter kräftigem Rühren nach und nach zum Gemisch zugegeben. Das Gemisch wurde bei 0°C bis zur Beendigung der Abscheidung

einer unlöslichen Fällung stehen gelassen. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und die erste Fällung von dem Gemisch abzentrifugiert.

Erste Extraktion

Die abgetrennte und gesammelte erste Fällung wurde nun mit einem Puffer 0,01 M Tris-Salzsäure, pH 8,0, enthaltend 5 M Harnstoff, extrahiert. Unlösliche Substanzen der ersten Fällung wurden von der erhaltenen ersten Extraktlösung abzentrifugiert.

Zweite Fraktionierung

Die erste Extraktlösung wurde mit so viel Calciumacetat vermischt, dass dessen Konzentration in der erhaltenen Mischung 0,01 M betrug. Dann wurde diese Mischung auf 5°C abgekühlt. Die gekühlte Mischung wurde mit weiterem Aceton versetzt, welches auf -10°C vorgekühlt war, bis dessen Konzentration im Gemisch 35% betrug. Dabei bildete sich eine Fällung. Diese wurde vom Fraktionierungsgemisch abzentrifugiert. Die erhaltene Mischung wurde nun mit weiterem gekühlten Aceton vermischt, bis dessen Konzentration 50% betrug, und es bildete sich eine weitere Fällung. Diese wurde abzentrifugiert und mit der oben genannten Fällung vereinigt.

Zweite Extraktion

Die vereinigten Fällungen wurden mit 500 ml eines 0,01 M Tris-Salzsäure-Puffers enthaltend 2 M Harnstoff, mit einem pH von 8,0 extrahiert. Ein verbleibender unlöslicher Rest wurde von der gebildeten zweiten Extraktlösung abgetrennt. Diese enthielt 41000 Einheiten an erfindungsgemässer plasminogenaktivierender Substanz.

Dritte Fraktionierung

Eine Kolonne mit einem Innendurchmesser von 4 cm und einer Höhe von 50 cm wurde mit Hydroxylapatit gefüllt, welcher zuvor mit einem 0,02 M Phosphorsäurepuffer mit einem pH von 7,0, enthaltend 2 M Harnstoff, ins Gleichgewicht gebracht worden war. Nun wurde die zweite Extraktlösung auf die Kolonne aufgegeben, wobei eine Fraktion, enthaltend die plasminogenaktivierende Substanz, am Hydroxylapatit adsorbiert wurde. Dann wurde das Fraktionsmittel in der Kolonne mit der oben genannten, zur Gleichgewichtseinstellung dienenden Pufferlösung gewaschen, bis der Kolonnenablauf bei einer Wellenlänge von 280 nm eine Ultraviolett-Absorption von 0,05 oder weniger zeigte. Zu diesem Auswaschen wurden etwa 500 ml Pufferlösung benötigt.

Dann wurden 300 ml einer 0,2 M Phosphatpufferlösung mit einem pH von 7,0, enthaltend 2 M Harnstoff, auf die Kolonne aufgegeben, um die adsorbierte Fraktion zu eluieren. Die erhaltenen 300 ml Eluat wurden durch Ultrafiltration auf 50 ml aufkonzentriert. Die konzentrierte Lösung enthielt 1,2 g der plasminogenaktivierenden Substanz mit einer fibrinolytischen Aktivität von 30 Einheiten pro mg Protein.

Es wurde gefunden, dass die erhaltene plasminogenaktivierende Substanz verschiedene Aminosäuren enthielt, nämlich Asp, Thr, Ser, Gln, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His und Arg. Die erhaltene plasminogenaktivierende Substanz zeigte das in Fig. 2 dargestellte Infrarot-Absorptionsspektrum.

Beispiel 2

Die in Beispiel 1 beschriebenen Schritte und Arbeitsweisen wurden wiederholt, wobei jedoch die dritte Fraktionierung mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Diäthylaminoäthyl-Sephadex A-50 als Anionenaustauscher ausgeführt wurde. Bei der dritten Fraktionierung wurde

eine Ionenaustausch-Chromatographiekolonne derart hergestellt, dass das Diäthylaminoäthyl-Sephadex A-50 zunächst mit Wasser imprägniert und vorgequollen, dann durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure aktiviert und schließlich mit Natriumhydroxyd alkalisiert wurde. Dann wurde dieses Material mit einem 0,01 M Tris-Salzsäurepuffer der 2 M Harnstoff enthielt, ins Gleichgewicht gebracht und schließlich in eine Kolonne mit einem Innendurchmesser von 4 cm und einer Höhe von 50 cm gebracht.

Die zweite Extraktlösung, 500 ml, wurde auf die Kolonne gegeben, wobei eine Fraktion mit der plasminogenaktivierenden Substanz am Anionenaustauscher adsorbiert wurde. Dann wurde die Säule mit 300 ml des zur Gleichgewichtseinstellung verwendeten Puffers gewaschen, und dann wurde mit dem zur Gleichgewichtseinstellung verwendeten Puffer eluiert, der jedoch anstelle von Harnstoff 0,2 M Natriumchlorid enthielt, und es wurden dazu 450 ml Puffer verwendet. Nachdem 200 ml des Puffers aus der Säure ausgelaufen waren, wurden die verbleibenden 200 ml Eluat gesammelt. Dieses Eluat wurde mittels Ultrafiltration auf 50 ml konzentriert. Diese konzentrierte Lösung enthielt 1,0 g der plasminogenaktivierenden Substanz mit einer fibrinolytischen Aktivität von 35 Einheiten pro mg Protein.

Beispiel 3

Zusätzliche Reinigung mit Molekularsieb

Es wurde eine Reinigungssäule so hergestellt, dass Sephadex G-150, ein Molekularsieb hergestellt von der Firma Pharmacia Feinchemikalien, mit Wasser vollständig aufgequollen und dann mit einer 0,01 M Ammoniumformiat-Pufferlösung ins Gleichgewicht gebracht wurde. Das so vorbereitete Molekularsieb brachte man in ein vertikales Rohr mit einem Innendurchmesser von 4 cm und einer Länge von 100 cm. Das Gemisch der konzentrierten Fraktionen der Beispiele 1 und 2 wurde auf die Säule gebracht, wobei eine Fraktion mit der gereinigten plasminogenaktivierenden Substanz am Molekularsieb adsorbiert wurde. Nun wurden 850 ml der zur Gleichgewichtseinstellung verwendeten Pufferlösung auf die Kolonne gegeben, um die genannte Fraktion vom Molekularsieb zu eluieren. Nach Ablauf von 700 ml Eluat wurden die übrigen 150 ml ablaufender Pufferlösung gesammelt. Diese Lösung wurde gefriergetrocknet. Man erhielt 680 mg einer trockenen plasminogenaktivierenden Substanz mit einer fibrinolytischen Wirksamkeit von 50 Einheiten pro mg Protein.

Die Esteraseaktivität der erhaltenen plasminogenaktivierenden Substanz ist in Tabelle 1 im Vergleich zu derjenigen der Urokinase aufgeführt.

Tabelle 1

Substanz	Esteraseaktivität (picomol/min)	
	Glutaryl-Gly-Arg-MCA	Pro-Phe-Arg-MCA
Urokinase	8,11	keine
erfindungsgemässe plasminogenaktivierende Substanz	0,52	2,66

Beide Substanzen wurden in einer Konzentration von 20 fibrinolytischen Einheiten pro ml angewendet.

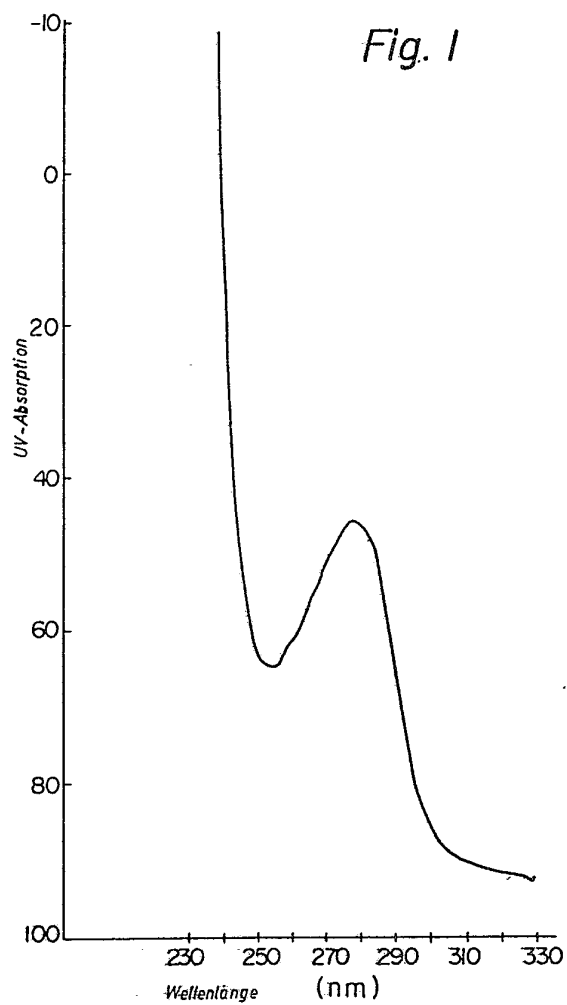
Tabelle 1 zeigt in klarer Weise, dass die Esteraseaktivität der erfindungsgemässen plasminogenaktivierenden Substanz wesentlich verschieden von derjenigen der Urokinase ist.

Beispiel 4

Die gleiche Arbeitsweise wie in Beispiel 1 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von Hydroxylapatit Phenyl-Sepharose CL-4B, eine Handelsbezeichnung eines hydrophoben Adsorptionsmittels der Pharmacia Feinchemikalien, Schweden, in die Kolonne gebracht und mit einem 0,05 M Tris-Salzsäurepuffer, der 5 M Harnstoff enthielt, ins Gleichgewicht gebracht wurde. Die zweite Fällung wurde mit der gleichen Pufferlösung wie zur Gleichgewichtseinstellung extrahiert. Die erhaltene zweite Extraktlösung wurde auf die oben genannte Kolonne aufgegeben, so dass eine die plasminogenaktivierende Substanz enthaltene Fraktion sich an die Phenyl-Sepharose DL-4B binden konnte. Nun wurde die für die Gleichgewichtseinstellung verwendete Pufferlösung mit Natriumchlorid und Ammoniumsulfat vermischt, bis deren

Konzentrationen im erhaltenen Gemisch 1% bzw. 10% betragen, und das Gemisch wurde zum Auswaschen der Säule verwendet. Dann wurde die in der Kolonne verbliebene Fraktion mit Lösungsgemisch eluiert, welches die eben genannte Zusammensetzung hatte, ausser dass die Konzentration an Ammoniumsulfat nur 3% betrug, und anschließend mit einer zweiten Eluierungslösung der gleichen Konzentration jedoch ohne Ammoniumsulfat.

- 10 Die aus der Säule ablaufenden Lösungen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Dann wurde das konzentrierte Extrakt zusätzlich unter Verwendung des gleichen Molekularsiebs wie in Beispiel 3 gereinigt. Das so erhaltene gereinigte Extrakt zeigte die gleiche fibrinolytische
- 15 Wirksamkeit wie das Produkt des Beispiels 1.

*Fig. 2*