

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147266 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **2486/78**

(51) Int.Cl.³: **C 12 N 9/72**

(22) Indleveringsdag: **02 jun 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **04 dec 1978**

(44) Fremlagt: **28 maj 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: **03 jun 1977 JP 65975/77**

(71) Ansøger: ***SUMITOMO CHEMICAL COMPANY LIMITED; Osaka, JP.**

(72) Opfinder: **Hideki *Yanagi; JP, Yasuo *Bai; JP, Junichi *Yoshikawa; JP, Shigeo *Ogino; JP.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co**

(54) **Fremgangsmåde til rensning af urokinase**

DN 147266 B

0

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til rensning af urokinase, ved hvilken en rå urokinaseholdig opløsning kontaktes med en stærkt sur kationbytter, som har sulfonsyregrupper og er indstillet til NH_4^+ -typen, til adsorption af urokinase, hvorpå den adsorberede urokinase elueres fra den nævnte kationbytter.

Urokinase er et enzym, som kan aflede plasmin, et fibrinolytisk enzym, fra plasminogen, og det er kendt, at dette stof ikke blot er anvendeligt til behandling af forskellige slags thromboser, men også kan forbedre carcino-
10 statiske midlers virkning væsentligt, når det anvendes sammen med de nævnte midler. Urokinase isoleret fra menneskeurin har ingen skadelige bivirkninger såsom antigen-antistof-reaktion og anvendes nu generelt med god virkning.

Der kendes flere fremgangsmåder til rensning af rå urokinase, f.eks. fremgangsmåder, ved hvilke der anvendes forskellige former for svagt sure kationbyttere eller svagt basiske anionbyttere eller gelfiltreringsmidler såsom tværbundet dextran. Imidlertid er ingen af disse fremgangs-
20 måder tilstrækkeligt tilfredsstillende i henseende til produktudbytte og -renhed.

I forbindelse med den foreliggende opfindelse er det blevet forsøgt at udvikle en fordelagtig fremgangsmåde til rensning af urokinase, og det har vist sig, at når urinstof sættes til en rå urokinaseholdig opløsning i en sådan mængde, at den endelige molkoncentration af urinstof i opløsningen er 3-8 mol, og den fremkomne opløsning derpå kontaktes med en stærkt sur kationbytter, der har sulfonsyregrupper og er indstillet til NH_4^+ -typen, adsorberes urokinase specifikt på den nævnte kationbytter, hvilket resulterer i en bemærkelsesværdig aftagen af mængden af ikke-
30 adsorberet urokinase sammenlignet med det tilfælde, hvor der ikke sættes urinstof til den rå urokinaseholdige opløsning, således at derved eluering af den adsorberede uro-

35

0

kinase med en alkalisk opløsning eller andre saltopløsninger fås rensset urokinase, som har praktisk taget konstant og højere specifik aktivitet med højere udbytte uanset renheden af den rå urokinase.

5

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

10

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte stærkt sure kationbyttere med sulfonsyregrupper er af typen, som fremstilles ved indføring af sulfonsyregrupper i en syntetisk harpiks, der har en tredimensioneret netværksstruktur såsom polystyrenharpiks eller phenol/formalin-harpiks, f.eks. "Dowex"[®] 50W osv., forhandlet af Dow Chemical Company, "Amberlite"[®] IR-120B, CG-120 osv., forhandlet af Rohm and Haas Company, og "Duolite"[®] C-20 osv., forhandlet af Diamond Shamrock Company, eller typen fremstillet ved indføring af sulfoethyl- eller sulfopropylgrupper i cellulose eller tværbundet dextran, f.eks. SE-cellulose forhandlet af Serva Entwicklungslabor. osv., eller SP-"Sephadex"[®], forhandlet af Pharmacia Fine Chemicals. Enhver af disse typer er kommercielt tilgængelig.

20

Ved fremgangsmåden til rensning af urokinase i overensstemmelse med opfindelsen gås der frem som beskrevet i det følgende.

25

En rå urokinaseholdig opløsning indstillet på pH 4-9, fortrinsvis 6-8, hvortil der i forvejen er tilsat urinstof i en sådan mængde, at den endelige molkoncentration af urinstof i opløsningen er 3-8 mol, kontaktes med en stærkt sur kationbytter, som har sulfonsyregrupper og er indstillet til NH_4^+ -typen, til specifik adsorption af urokinase på den nævnte kationbytter. Denne kontakt kan gennemføres ved enten batch- eller søjledrift. Kationbytteren indstilles til NH_4^+ -typen på gængs måde, dvs. en ammoniumchloridopløsning kontaktes med en kationbytter af

30

35

0

H^+ -typen, og, når det ved måling af pH-værdien er blevet konstateret, at alle H^+ -ionerne er blevet erstattet af NH_4^+ -ioner, vaskes ionbytteren med destilleret vand. Den ønskede pH-regulering af den rå urokinaseholdige opløsning kan gennemføres ved anvendelse af en pufferopløsning såsom en phosphatpufferopløsning. Den urokinaseadsorberede kationbytter vaskes med vand eller en lavkoncentreret saltopløsning til fjernelse af en stor del af urenhederne indbefattende andet proteinstof end urokinase samt i forvejen tilsat urinstof. Derpå kan urokinase adsorberet på den nævnte ionbytter nemt elueres med en alkalisk opløsning eller en højkoncentreret saltopløsning eller en kombination deraf. Som alkalisk opløsning til dette formål kan der anvendes fortyndet ammoniakvand eller en pufferopløsning med pH 10-12, og som saltopløsning kan der anvendes en ammoniumchloridopløsning eller lignende. Det er også muligt at anvende en alkalisk opløsning med pH 8-12 indeholdende et salt såsom ammoniumchlorid.

En sammenligning mellem fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvor urinstof sættes til en rå urokinaseholdig opløsning, og en fremgangsmåde, hvor der ikke tilsættes urinstof, er vist i nedenstående sammenligningseksempel. I dette eksempel anvendes "Dowex"[®] 50W x 8 som den stærkt sure kationbytter med sulfonsyregrupper, og urokinaseaktiviteten måles ifølge Ploug's fibrinplademetode, jf. Ploug et al, Biochim. Biophys. Acta, bind 24, side 278 (1957).

Sammenligningseksempel

30

Til 4 ml af en opløsning indeholdende 11900 i.e. (internationale enheder) rå urokinase med en specifik aktivitet på 820 i.e./mg protein, som i forvejen er dialyseret imod 0,1 mol phosphatpufferopløsning med pH 6,5 og indeholdende 0,1 mol natriumchlorid, sættes henholdsvis

35

0

1,2 g og 2,0 g urinstof. Endvidere fremstilles den samme opløsning som ovenfor uden indhold af urinstof. Hver af de således fremstillede opløsninger ledes gennem en søje fyldt med 5 ml "Dowex" 50W x 8 (200-400 mesh) indstillet til NH_4^+ -type til adsorption af urokinase. Derefter vaskes søjlen med 25 ml destilleret vand, hvorpå urokinasen elueres med 3 ml 4%'s ammoniakvand. Egenskaberne af den således fremstillede urokinase er anført i nedenstående tabel I.

10

		<u>Elueret urokinase</u>	
Tilsat urinstof (g)	Ikke adsorberet urokinase (%)	Specifik aktivitet i.e./mg	Udvinding (%)
0	20,3	8.990	66,0
15 1,2	6,1	15.500	81,0
2,0	4,6	17.100	74,3

Resultaterne af sammenligningseksemplet viser tydeligt den fremragende virkning opnået ved tilsætningen af urinstof i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse bestående i, at mængden af ikke-adsorberet urokinase aftager, og at den specifikke aktivitet samt udvindingen af elueret urokinase forøges.

25

Eksempel 1

26,3 g urinstof sættes gradvis til 54 ml af en opløsning indeholdende 314.000 i.e. rå urokinase med en specifik aktivitet på 1.080 i.e./mg protein, som i forvejen er dialyseret imod en fosfatpufferopløsning med pH 6,5 og indeholdende 0,1 mol natriumchlorid, og den fremkomne opløsning ledes gennem en søjle (2,8 x 25 cm) fyldt med "Dowex" 50W x 8 (200-400 mesh) indstillet til NH_4^+ -typen til adsorption af urokinase. Søjlen vaskes med 900 ml destilleret vand, hvorpå 160 ml 4%'s ammoniakvand ledes

35

0

gennem søjlen til eluering af urokinase, og fraktionen med urokinaseaktiviteten udvindes. Den således fremkomne urokinase har en samlet aktivitet på 235.000 i.e. og en specifik aktivitet på 18.200 i.e./mg protein og er 16,9 gange renere end rå urokinase. Den udvundne aktivitet er på 74,8%.

5

Eksempel 2

10

87,8 g urinstof sættes til 180 ml af en opløsning indeholdende 298.000 i.e. rå urokinase med en specifik aktivitet på 560 i.e./mg protein, som i forvejen er dialyseret som i eksempel 1, og den fremkomne opløsning ledes gennem en søjle (2,8 ø x 25 cm) fyldt med "Dowex" 50W x 8 (200-400 mesh) indstillet til NH_4^+ -typen til adsorption af urokinase. Søjlen vaskes med 900 ml destilleret vand, hvorpå urokinasen elueres med 160 ml 4%'s ammoniakvand, og fraktionen med urokinaseaktiviteten udvindes. Den således fremkomne urokinase har en samlet aktivitet på 239.000 i.e. og en specifik aktivitet på 17.000 i.e./mg protein og er 30,4 gange renere end rå urokinase. Den udvundne aktivitet er på 80,2%.

15

20

De ovennævnte resultater viser, at selv når der anvendes rå urokinase med omtrent den halve specifikke aktivitet af den i eksempel 1 anvendte, er det muligt at udvinde rensset urokinase med praktisk taget samme grad af høj specifik aktivitet som den i eksempel 1 opnåede.

25

Eksempel 3

30

53,6 g urinstof sættes til 110 ml af en opløsning indeholdende 140.000 i.e. rå urokinase med en specifik aktivitet på 660 i.e./mg protein, som i forvejen er dialyseret som i eksempel 1, og den fremkomne opløsning ledes gennem en "Duolite" C-20 -søjle (2,8 ø x 25 cm) ind-

35

0

stillet til NH_4^+ -typen til adsorption af urokinase. Søjlen vaskes med 750 ml destilleret vand, hvorpå urokinasen elueres med 150 ml 4%'s ammoniakvand, og fraktionen med urokinaseaktiviteten udvindes. Den således fremkomne

5

urokinase har en samlet aktivitet på 96.600 i.e. og en specifik aktivitet på 13.600 i.e./mg protein og er 20,6 gange så ren som rå urokinase. Den udvundne aktivitet er på 69,0%.

0

P a t e n t k r a v .

5 Fremgangsmåde til rensning af urokinase, ved hvilken
en rå urokinaseholdig opløsning kontaktes med en stærkt
sur kationbytter, som har sulfonsyregrupper og er ind-
stillet til NH_4^+ -typen, til adsorption af urokinase, hvor-
på den adsorberede urokinase elueres fra den nævnte kat-
ionbytter, k e n d e t e g n e t ved, at urinstof i for-
vejen sættes til den nævnte rå urokinaseholdige opløsning,
10 der er indstillet på en pH-værdi inden for området 4-9,
i en sådan mængde, at den endelige molkoncentration af
urinstof i opløsningen er 3-8 mol.

Fremdragne publikationer:
