



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **228 563 A1**

4(51) C 12 N 9/72
C 12 N 11/08

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 269 343 7 (22) 12.11.84 (44) 16.10.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD; Coupek, Jiri, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., CS

(54) **Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Urokinase**

(57) Die Erfindung beschreibt ein einfaches Chromatographieverfahren zur Gewinnung und Reinigung des Plasminogenaktivators Urokinase. Erfindungsgemäß werden urokinasehaltige Lösungen bei schwach saurem bis neutralem pH-Wert mit neuen Cyanoalkylgruppen enthaltenden Trägern vom Methacrylattyp in Kontakt gebracht. Dabei wird die Urokinase durch Adsorption an die Träger aus den Lösungen abgetrennt. Durch Desorption von den Trägern mit Lösungen alkalischen pH-Wertes, Dialyse und Lyophilisation wird die Urokinase in reiner Form erhalten.

Kühn
Coupek

"Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Urokinase"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung und Reinigung des Enzyms Urokinase aus Urokinase enthaltenden Lösungen. Das Verfahren ist in der enzymherstellenden Industrie, Medizin und Biochemie anwendbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Enzyme finden gegenwärtig Anwendung in technologischen Prozessen, bei der qualitativen und quantitativen Analyse und in der Enzymtherapie. Dabei sind die Reinheitsanforderungen für die genannten Einsatzgebiete sehr unterschiedlich und im Falle des Einsatzes in der Enzymtherapie besonders groß. Hochspezifische Isolier- und Reinigungsmethoden, die eine möglichst vollständige Trennung von Begleitproteinen erlauben, besitzen daher für Enzyme zur Enzymtherapie besondere Bedeutung. Ein Enzym, das für die Enzymtherapie thromboembolischer Erkrankungen in Frage kommt, ist die Urokinase. Urokinase ist ein Plasminogenaktivator, der für die Umwandlung des Plasminogens in das Plasmin verantwortlich gemacht wird und in hochgereinigter Form in der Klinik zum Auflösen von Blutgerinnseln eingesetzt wird. Die Isolierung und Reinigung der Urokinase aus urokinasehaltigen Lösungen gelingt nach verschiedenen Methoden. Beschrieben wurden unter anderem Fällungsreaktionen mit Schwermetallionen (US-PS 2 901 382), die aber den Nachteil der Giftigkeit der Schwermetallionen besitzen. Weiter sind auch Verfahren zur Isolierung der Urokinase

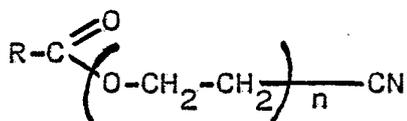
auf der Basis einer Adsorption bekannt geworden, zum Beispiel die chromatographische Reinigung mit Ionenaustauschern (Methods in Enzymology, Vol. 35 (1976), 241 oder US-PS 2 983 647) oder die Reinigung auf affinitätschromatographischem Wege (Methods in Enzymology Vol. 34 (1975), 53/. Diese Verfahren besitzen aber auch eine ganze Reihe von Nachteilen, weil sie Urokinasepräparate mit nur geringer spezifischer Aktivität ergeben oder die Affinitätsträger schwer zugänglich beziehungsweise mechanisch wenig stabil sind. Über die Verwendung synthetischer, organischer und makroporöser Trägermaterialien, speziell vom Akrylat- oder Methakrylattyp liegen bisher keine Angaben vor.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein technisch anwendbares Verfahren zur Gewinnung von Urokinase aus urokinasehaltigen Lösungen zu entwickeln, das zu guten Ausbeuten führt und wenig arbeitsintensiv ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß erfolgt die Isolierung und Reinigung des Enzyms Urokinase aus Urokinase enthaltenden Lösungen durch Adsorption im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich an Träger der Struktur



Nach einem Waschprozeß wird die gebundene Urokinase mit Lösungen eluiert, deren pH-Wert 9 - 11 betragen soll und nach Dialyse und Lyophilisierung isoliert.

Unter Urokinase enthaltenden Lösungen versteht man vorzugsweise Urin oder Lösungen von rohen oder teilweise gereinigten Urokinasepräparaten, die man nach bekannten Reinigungsverfahren erhält, wie sie oben beschrieben wurden.

Zur Herstellung der Träger obiger Struktur, worin R für das Trägergrundgerüst in hydrophilen und makroporösen Kopolymeren aus Hydroxyalkylakrylaten oder Hydroxyalkylmethakrylaten mit Alkyl von C_2-C_6 und divinylischen oder polyvinylischen Monomeren als Vernetzungsmittel steht und n die Ziffern 1 - 3 bedeuten soll, kommen eine Reihe aus der Polymerenchemie unter dem Namen polymeranaloge Reaktionen bekannte Synthesemöglichkeiten in Frage. Kopolymere vom genannten Methakrylattyp eignen sich aber besonders gut für polymeranaloge Umsetzungen. Ihre hohe hydrolytische Stabilität erlaubt einfache und vielfältige Modifikationen der polymeren Oberfläche sowohl in organischen als auch wäßrigen Lösungsmitteln unter stark sauren oder alkalischen Reaktionsbedingungen. Unter polymeranalogen Reaktionen zur Synthese der Affinitätsträger obiger Struktur sollen nukleophile Substitutionsreaktionen zwischen nach der DDR-Patentschrift 157 340 hergestellten vernetzten Polyalkylmethakrylat-arylsulfonaten (Alkyl = C_2-C_6 und Aryl = C_6H_5 beziehungsweise $CH_3-C_6H_4$) mit Natriumcyanid in einem aprotischen Lösungsmittel wie Dimethylformamid oder Additionsreaktionen von Hydroxyalkylmethacrylaten (Alkyl = C_2-C_6) mit Akrylnitril in Gegenwart einer Base wie Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid in wäßriger oder wäßrig-äthanolischer Lösung verstanden werden. Aber auch hydrophile und makroporöse Kopolymere aus Hydroxyalkylmethakrylaten (Alkyl C_2-C_6) und Nitrilgruppen enthaltenden Monomeren beziehungsweise Pfropfkopolymerisate, die obige Struktur besitzen, können zur Isolierung und Reinigung der Urokinase eingesetzt werden. Die Adsorption der Urokinase an die unlöslichen, hydrophilen und makroporösen Träger obiger Struktur wird im Batchverfahren unter Rühren oder Säulenverfahren bei pH-Werten von 5 - 8, vorzugsweise 6,8, und Temperaturen von 2 - 30°C, vorzugsweise Umgebungstemperatur durchgeführt. Die Träger werden nach der Behandlung mit den urokinasehaltigen Lösungen mit einer 10 %igen Natriumchloridlösung gewaschen, die zusätzlich

1×10^{-3} mol/l EDTA enthält. Zur Elution der gebundenen Urokinase werden alkalische Lösungen vom pH-Wert 9 - 11 verwendet. Als solche Lösungen eignen sich zum Beispiel Boratpuffer vom pH-Wert 9 - 11, vorzugsweise 10 oder Natronlaugebeziehungsweise Ammoniumhydroxidlösungen mit einer Konzentration von 1×10^{-2} - 1×10^{-3} mol/l. Das vorgeschlagene Verfahren zur Gewinnung und Reinigung der Urokinase überwindet viele der bisher bekannten Schwierigkeiten und ist durch seine einfache Durchführbarkeit gekennzeichnet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Träger besitzen gegenüber bisher bekannten Trägermaterialien besondere praktische Vorteile. Ihre makroporöse innere Struktur garantiert besonders große Porendurchmesser mit erheblicher innerer Oberfläche. Zusammen mit dem hohen spezifischen Bindungsvermögen der Träger für die Urokinase ergeben sich somit hohe Bindungsraten des Enzyms mit sehr guten Reinigungseffekten. Die Trägermatrix ist darüber hinaus mechanisch, thermisch und chemisch sehr stabil und wird durch Mikroorganismen nicht angegriffen, so daß die Affinitätsträger zur Urokinasegewinnung und -reinigung mehrmals eingesetzt werden können und dadurch der Herstellungspreis für das Enzym verringert werden kann.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Urokinase in reiner Form und hoher Ausbeute gewonnen, und durch Lyophilisation nach einer Dialyse gegen destilliertes Wasser kann sie auch in fester Form erhalten werden.

Nachstehend wird die Erfindung an einem Beispiel näher erläutert:

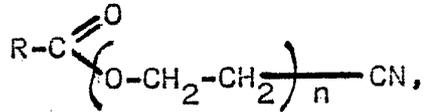
Ausführungsbeispiel

Zwei Liter menschlichen Urins werden mit 50 ml Natronlauge (10^{-1} mol/l) versetzt, und der gebildete Niederschlag wird abgetrennt. Zur Lösung wird unter Rühren und Eiskühlung Salzsäure (10^{-1} mol/l) addiert, bis die Lösung einen pH-Wert von 6,8 - 7,0 erreicht hat. Diese Lösung wird auf eine Säule

(1 x 10 cm) aufgetragen, die 1,5 g eines sphärischen makroporösen Kopolymeren der erfindungsgemäßen Struktur enthält und die mit destilliertem Wasser äquilibriert war. Nach dem Durchlauf der Lösung wird die Kolonne mit einem Liter einer 10 %igen Natriumchloridlösung gewaschen, die zusätzlich 1×10^{-3} mol/l Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält. Anschließend wird die Urokinase durch Elution mit einem ammoniakhaltigen Boratpuffer (0,1 mol/l) vom pH-Wert 10,0 vom Affinitätsträger abgetrennt. Das Eluat wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, durch Ultrafiltration eingeengt und lyophilisiert. Nach dem beschriebenen Verfahren werden 90 % der im Urin enthaltenen Urokinase isoliert mit einer spezifischen Aktivität von 1 600 Esteraseeinheiten pro Milligramm Protein.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Urokinase, dadurch gekennzeichnet, daß Urokinase enthaltende Lösungen mit Trägern der Struktur



wobei R für das Trägergrundgerüst in hydrophilen und makroporösen Kopolymeren aus Hydroxyalkylakrylaten oder Hydroxyalkylmethakrylaten mit Alkyl von C₂-C₆ und divinylischen oder polyvinylischen Monomeren als Vernetzungsmittel steht und n die Ziffern 1 - 3 bedeuten soll, bei pH-Werten von 5 - 8 und Temperaturen von 2 - 30°C im Säulen- oder Batchverfahren in Kontakt gebracht werden, Fremdproteine mit Pufferlösungen höherer Ionenstärke und einem pH-Wert von 7 - 8 ausgewaschen werden und die gebundene Urokinase mit wäßrigen Lösungen vom pH-Wert 9 - 11 eluiert, gegen eine wäßrige Lösung vom pH-Wert 6 - 7 dialysiert und lyophilisiert wird.