한국생물공학회지 제5권 제2호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 5. No. 2. 183-189(1990)

# 인뇨로부터 유로키나제 대량정제공정의 단순화

정 광 회 · *선우 명 환 · *우 한 상 · 백 승 복
(재)목암생명공학연구소, *(주)녹십자

# A Simplified Procedure for the Large-Scale Purification of Urokinase from Human Urine

Kwang-Hoe Chung, Myung-Whan Sunwoo*, Han-Sang Woo*, and Sung-Bok Baik
*Biotechnology Research Institute and *Korea Green Cross Corp*

## ABSTRACT

An efficient method has been developed for the purification of urokinase from 1,000 liter batches of human urine. The procedure involved precipitation of urokinase with 2mM zinc chloride, resuspension of the precipitate with 0.1M EDTA / 0.5M Glycine solution, and CM-Toyopearl and benzamidine-Sepharose column chromatography. The purified urokinase was fully active and possessed a specific activity of $1.07\times10^5$IU / mg. The recoveries ranged from 42 to 65% in several preparations(mean value was 51%). And the urokinase purified by this process consisted of about 13% of single chain urokinase (pro-urokinase) as evaluated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in reducing condition and by S-2444 amidolytic activity under plasmin treatment.

## 서 론

Urokinase(EC 3.4.99.26)는 비활성의 plasminogen을 활성형의 plasmin으로 전환시키는 serine protease로서, 분자량이 53,000 dalton이다. Plasmin은 혈관내 응고된 혈전(fibrin clot)을 용해시키는 매우 중요한 효소이다. 현재 혈전용해제로 인체에 사용되는 plasminogen activator 에는 urokinase 이외에 streptokinase와 재조합 tPA (tissue-type plasminogen Activator)가 있으나, 한국과 일본을 비롯한 아시아에서는 urokinase가 많이 사용되고 있다.

Urokinase는 1951년 동물의 오줌속에 소량존재한다는 사실이 처음 보고되었으며(1), 그 뒤 여러종류의 동물조직(2, 3)과 신장세포(4) 및 특정한 암세포 배양액(5)에서도 분리되었다. 최근에는 유전자 재조합 방법에 의해 대량생산이 시도되고 있다(6).

Urokinase는 1960년대부터(7) 인체의 여러 혈관질환에 널리 사용되어 왔으며, 특히 뇌혈전, 폐색전, 심근경색, 항암제와의 병용투여에 사용되어 왔다. 그러나, 사람의 뇨에서 urokinase를 분리하는데는 농도가 30~80㎍ / l 로 매우 낮기 때문에 정제공정의 초기단계에서 효과적으로 농축하는 과정이 매우 중요하게 인식되고 있다.

산업적으로 널리 이용되고 있는 방법으로는 bentonite 분말을 사용한 흡착법이 오랫동안 사용되어 왔다(8). 그런데 bentonite 등의 흡착제를 사용하는 경우, 흡착제로부터 용출하는 조건이 매우 복잡하고 활성을 감소시킬 우려가 있다.

아연과구리 등 2가 금속이온은 histidine의imidazole기와 cysteine의 thiol기와 비교적 강한 결합력을 가지고 있는 사실이 최근에 밝혀진 후(9), 여러 재조합 단백질의 선택적 침전과 농축에 새롭게 사용되고 있다.

이미 이들 2가 이온들이 단백질 침전에 1930년대부터

사용되었다는 보고가 있으나 (11, 12), 소량의 시료에 불과하였으며 실용화되지는 못하였다.

본 실험에서는 2가의 아연이온을 이용하여 대량의 인뇨로부터 urokinase를 선택적으로 침전시켜 고농축하는 전처리공정이 시도되었고, 산업적 규모로 완전정제하는 공정이 연구되었다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

인체 urokinase, plasminogen이 함유된 fibrinogen, thrombin은 (주)녹십자 제품을 사용하였고, pyroGlu-Gly-Arg-pNA는 스웨덴 Kabi사에서, $ZnCl_2$, EDTA, Benzamidine-Sepharose는 Sigma사에서, CM-Toyopearl은 일본 Toyosoda사에서 구입하였다.

$ZnCl_2$용액을 최종농도가 1M이고, pH가 4.15가 되도록 만든뒤 실온에서 보관하여 사용하였고, 용출액은 0.5 M Glycine과 0.1M EDTA 혼합액을 pH 9.0이 되도록 하여 사용하였다.

## 실 험 방 법

### 인뇨수거

건강한 성인의 뇨를 10℃ 이하의 조건에서 10시간 이내에 수거한 뒤 1500리터 tank에 pooling하였고, 5N NaOH를 사용하여 pH가 7.5~8.0가 되도록 적정하였다. 1~2시간 방치하여 뇨중의 많은 salt와 고형성분이 침전되게 한 후 상층액을 urokinase 정제원으로 사용하였다.

### Urokinase 활성측정

Urokinase 활성은 plasminogen이 포함된 fibrin plate를 이용한 lysis 방법(13)과 pryo Glu-Gly-arg-pNA(S-2444)를 이용한 발색방법(14)으로 측정하였다.

### Pro-urokinase 활성측정

Urokinase 내에 함유된 pro-urokinase의 양을 측정하기 위하여 Kohno(15)의 방법에 따라 S-2444의 amidolytic activity를 측정하였다.

Pro-urokinase는 single-chain form으로 two-chain인 urokinase 와 달리 S-2444에 대한 amidolytic activity가 500배~1,000배 정도 낮다는 보고가 이미 발표되었기 때문에(16), single-chain pro-urokinase를 plasmin으로 처리하여 two-chain urokinase로 전환시킨뒤 증가된 활성을 측정하였다.

### 단백질 정량

뇨중의 단백질은 Bradford(17)법으로 정량하였는데, 뇨중에는 280nm에서 흡광을 나타내는 색소들이 많이 들어있기 때문에 Lowry법으로는 정량이 매우 어려웠다.

### $ZnCl_2$에 의한 *urokinase* 침전

$ZnCl_2$에 의한 urokinase의 침전은 1 $l$ 이하의 small-scale 과 1,000 $l$ 규모의 large-scale로 구분하여 수행하였다. Small-scale 침전은 실험실에서 수행하였으며, $ZnCl_2$를 첨가하여 urokinase를 흡착시킨뒤 Sorvall RC-5B 원심분리기를 사용하여 4,000×$g$에서 15분간 침전시켰다.

1,000 $l$ 규모의 large-scale 침전은 Sharpless사의 연속원심분리기를 사용하여 수행하였으며, 이때 회전속도는 12,000rpm이었고 유속은 10 $l$ / min이었다. 이상의 조건으로 회수된 침전물은 urokinase 정제시까지 -70℃에 보관하였다.

### Urokinase 정제

모든 정제공정은 4℃~8℃에서 수행하였다.

침전물에서 urokinase를 용출하기 위하여 chelating ahent로 많이 사용되어온 EDTA와 glycine용액을 적당량 조정하여 사용하였으며, 용출액속에 포함된 $ZnCl_2$ 이온과 뇨중의 고형성분, 그리고 chromatography에 영향을 주는 뇨색소, 그리고 chelating agent를 효과적으로 제거하기 위하여 CM-Toyopearl chromatography를 수행하였다.

$ZnCl_2$ 침전물을 EDTA / Glycine, pH 9.0 용액으로 용해한 뒤, pH를 6.0으로 낮춰 0.1M phosphate. pH 6.0으로 평형시킨 CM-Toyopearl column(5×10㎝)에 시간당 1 $l$ 속도로 통과시켰다. 이어서 동일 완충 용액으로 column을 세척한 뒤, 0.5M NaCl / 0.1M phosphate, pH 7.0 용액으로 urokinase를 유출하였으며, 활성이 강한 분획만을 모아 다음 Column에 직접 적용하였다.

Benzamidine-Sepharose colum (2.5×5㎝)을 0.15M NaCl / 0.1M phosphate, pH 7.5로 평형시킨 뒤, CM-Toyopearl 유출액 800ml를 시간당 150ml 속도로 통과시켰고, 동일 완충용액으로 충분히 세척한 뒤 0.1M glycine, pH 2.5 용액으로 urokinase를 유출하였다. 또한 유출된 urokinase는 즉시 pH를 7.5로 적정한 뒤 활성이 높은 분획을 pooling 하였다.

## 결과 및 고찰

### $ZnCl_2$에 의한 뇨중의 urokinase 침전(Small-

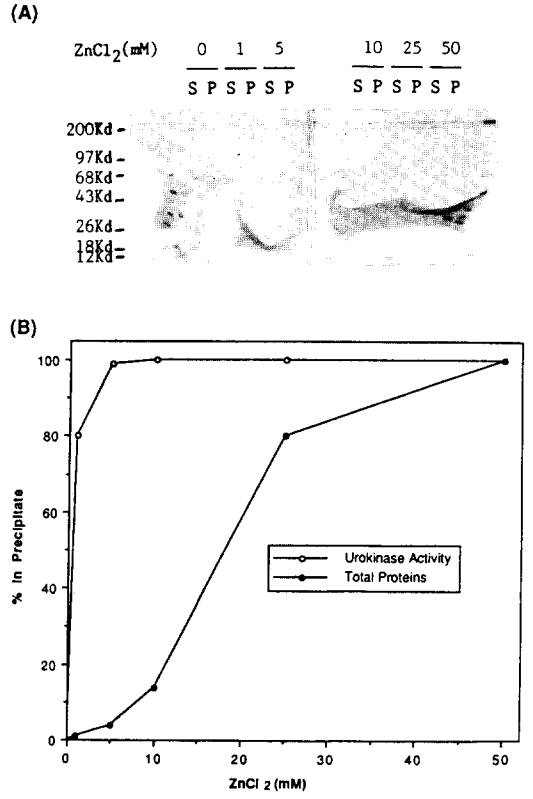


Fig. 1. Relationship between amounts of protein and urokinase activity in the precipitates at various zinc concentrations. (A) SDS-Polyacryl amide gel electrophoresis of the concentrated urine. For the visualization of the precipitation of proteins, human urine was concentrated 30 times by ultrafiltration using PM 10 membrane. S: supernatant, P: precipitate. Standard proteins used were myosin, H chain(M.W. 200,000), phosphorylase b(M.W. 97,400), bovine serum albumin(M.W. 68,000) ovalbumin (M.W. 43,000) $\alpha$-chymotrypsinogen(M.W. 25,000), $\beta$-lactoglobulin(M.W. 18,400), and cytochrome C(M.W. 12,300). (B) The relationship between the amounts of proteins and urokinase activity in the precipitate.

**scale**) pH 7.5로 전처리한 뇨 1 $l$를 $ZnCl_2$ 농도에 따라 urokinase 활성과 단백질의 침전을 조사한 결과, urokinase는 5mM에서 99% 이상 침전되었으나 단백질은 4% 정도밖에 침전되지 않았다(Fig. 1). 따라서 5mM $ZnCl_2$ 농도에서 타단백질이 제거된 상태로 urokinase를 효과적으로 분리침전시킬 수 있었다.

뇨 단백질의 60~90%가 albumin이고, albumin의 $ZnCl_2$에 의한 침전은 10mM 이상에서 이루어지므로(10), 뇨중의 urokinase를 분리하는데 아연침전법은 매우 효과적이었다.

$Zn^{+2}$ 이외에, $Cu^{+2}$, $Fe^{+2}$, $Fe^{+3}$, $Mg^{+2}$, $Mn^{+2}$, $Ca^{+2}$ 등에 대하여도 urokinase의 침전을 수행하였으며, 그 결과 $Cu^{+2}$에 대한 뇨중의 urokinase 침전과 단백질의 침전경향은 $Zn^{+2}$의 경우와 거의 유사하였다. 그러나 $Zn^{+2}$와 $Cu^{+2}$ 이외의 다른 이온들에 의한 urokinase의 침전은 타단백

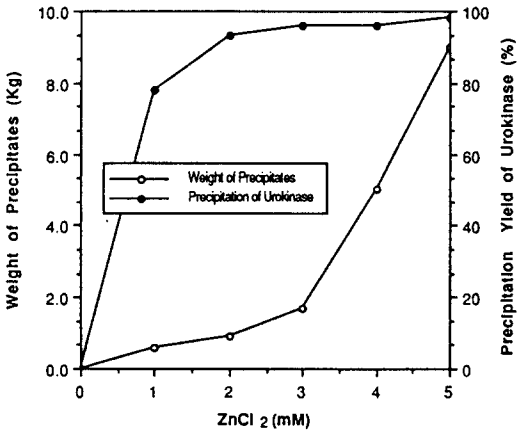


Fig. 2. Precipitation yield of urokinase and total weight of solids precipitated from 1,000 liters of urine as a function of zinc concentration.

질과의 분리침전이 이루어지지 않아 효과적이지 못하였다.

### 1,000 $l$ 규모(large-scale)의 urokinase 침전

1 $l$ 이하의 뇨를 $ZnCl_2$ 농도에 따라 urokinase 침전 최적조건을 정한 뒤, 100 $l$ ~1,000 $l$ 의 large-scale에서 urokinase를 침전한 결과 small-scale에서는 고려하지 않았던 점이 나타났다. 즉, 5mM $ZnCl_2$에서 urokinase 침전율

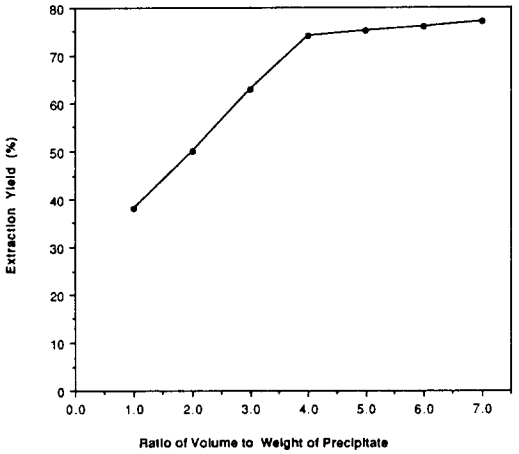


Fig. 3. Effect of volume of extraction solution on the recevery yield.

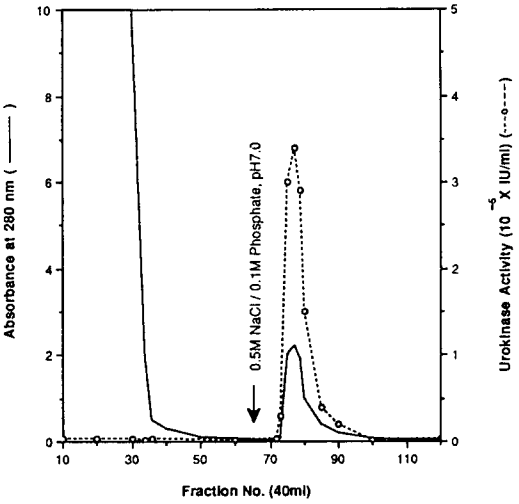


Fig. 4. Chromatography of the solution extracted with EDTA / glycine on a column of CM-Toyopearl.

은 99%이상 되었으나 침전물의 무게가 9kg정도가 되어 하루 10만 liter의 뇨를 처리하는 plant scale에서는 다음 공정에 커다란 문제가 되었다.

따라서, 침전율은 다소 떨어지더라도 침전물의 무게가 줄어드는 경제적 조건을 잡은 결과, Fig. 2와 같이 2mM 에서 침전물의 무게가 0.9kg이 되고 침전율이 93%일 때 가장 효율적이었다.

또한 침전물속에 포함된 urokinase를 용출하기 위하여 EDTA와 glycine을 조정하여 혼합액을 만든 결과, 0.1M EDTA / 0.5M glycine, pH 9.0 용액을 침전물의 무게당 4배의 부피로 첨가하였을 때 용출율과 부피, 그리고 cost면에서 최적조건임이 밝혀졌다(Fig. 3).

## Urokinase의 정제

1,000리터 뇨를 2mM $ZnCl_2$로 처리한 후 연속 원심분리하여 침전된 900 g 의 침전물을 약 4 *l* 의 0.1M EDTA / 0.5M glycine, pH 9.0으로 용해한 뒤, pH를 6.0으로 조정하여 CM-Toyopearl coulumn에 통과시켰다(Fig. 4).

EDTA / glycine 용액으로 침전물을 용해한 용출액속에는 $ZnCl_2$, 뇨중의 salt, 고형성분, 고농도의 EDTA, glycine이 포함되어 있으며, 특히 뇨색소물질은 benzamidine-Sepharose chromatography 과정에 많은 제한을 주고 있다. 따라서, 효과적으로 이들 물질을 제거하기 위한 여러가지 시도를 수행한 결과 dialysis법과 CM-Toyopearl colun법이 가장 적합한 system이라고 생각되었다. 그런데 dialysis는 역시 시간이 길고 plant scale에서는 적합하지 못한 것으로 생각되었다.

CM-Toyopearl column은 plant scale에서 scale-up하고 column의 수를 증가시키면 수시간내에 10만 liter뇨의

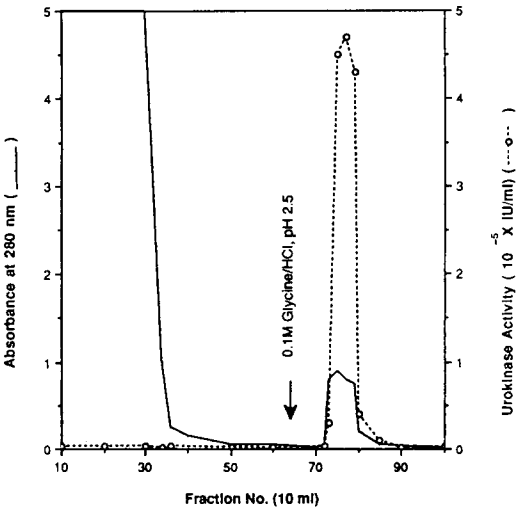


Fig. 5. Benzamidine-Sepharose coulumn chromatography of high activity urokinase peak from CM-Toyopearl column.

Table 1. Purification of urokinase from large-volume of human urine

| | Volume (liter) | Total Proteina (mg) | Total activity (IU) | Specific actibity (IU / mg) | Yield (%) | Purification (×fold) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Urine | 1,000 | 75,000 | $6.0\times10^6$ | 80 | 100 | 1 |
| Supernatant after Zn precipitation | 999 | 72,000 | $4.2\times10^{5b}$ | – | – | – |
| EDTA / glycine Extract | 4 | 4,6000 | $3.9\times10^6$ | 847 | 65 | 11 |
| CM-Toyopearl Eluate | 0.8 | 800 | $3.4\times10^6$ | 4,250 | 53 | 57 |
| Benzamidine-Sepharose Eluate | 0.12 | 29 | $3.1\times10^6$ | 107,000 | 51 | 1,330 |

a Protein determined by the method of Bradford *et al.* using bovine albumin as standard.

b Urokinase activity(about 7~8% of total activity) remaining in solution after Zn precipitation.

(The data represent mean values of six preparation.)

침전물 용출액을 처리할 수 있을 것으로 생각된다.

CM-Toyopearl column을 0.1M phosphate, pH 6.0 용액으로 충분히 세척한 뒤, 0.5M phosphate, pH 7.0으로 urokinase를 유출하였다. 그 결과 EDTA / glycine 용출액 속에 포함된 대부분의 salt와 색소들이 완전히 제거되었고, 4~5배의 정제효과를 얻을 수 있었다.

Urokinase 활성이 높은 분획만을 모아 최종 정제과정으로 benzamidine-Sepharose column chromatography를 수행하였다. 800ml의 CM-Toyopearl 유출액을 0.15M NaCl / 0.1M phosphate, pH 7.0으로 이미 형평시킨 benz amidine-sepharose column에 통과시킨 뒤, 0.1M glycine, pH 2.5 용액으로 소순도의 urokinase를 분리하였다(Fig. 5).

이상의 전 공정을 통하여 1,000리터의 뇨에서 urokinase 를 순수분리한 결과는 Table 1.과 같다. 즉, 1,000리터의 뇨중에서 specific activity가 10만 I.U. / mg 이상인 순수한 urokinase를 약 30mg 분리하였고, 전체수율은 42%에서 65% 사이였으며 평균적으로 51%이었다. 이와 같은 결과는 기존의 bentonite 흡착 및 ion exchange column chromatography에 의한 정제공정에 비해 전체수율이 10~15% 향상되었고, 공정기간이 약 50%, 인원이 절반가량 절감하는 효과를 나타내었다.

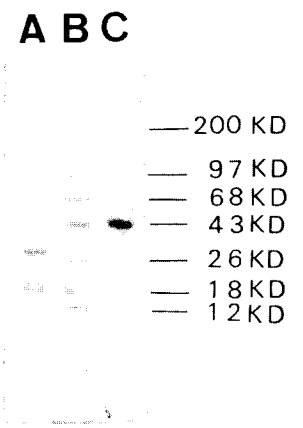


Fig. 6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified urokinase under reducing condition and non-reducing condition. Electrophoresis was carried out with PhastGel Gradient 8-25.
Lane A, purified urokinase under reducing condition; lane B, molecular weight standard proteins; lane C, purified urokinase without reduction.

### 정제 Urokinase 특성

$ZnCl_2$ 침전과 affinity column을 이용하여 순수분리된 urokinase는 specific activity가 100,000 I.U./mg 정도이었으며, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 non-reducing 조건에서 대부분 54kd의 high M. W.형이었으며, DTT로 reducing한 조건에서는 33kd과 21kd으로 분해됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

그러나, reducing 조건에서도 54kd의 high M. W.형이 존재함이 확인 되었는데, 이것은 two-chain urokinase가 아닌 single-chain의 prourokinase로 추정되어 kohno 등의 방법(15)으로 분석한 결과 약 12~14%의 pro-urokinase가 포함되어 있음이 확인되었다.

## 고 찰

뇨중에는 총단백질이 40~150mg/$l$로 존재하며, 그 대부분이 albumin이다. 그러나 나머지 단백질에는 의학적으로 매우 중요한 성분들이 포함되어 있으나 그 농도가 너무 낮아 산업적으로 이용되지 못하고 있는 실정이다.

본 연구에서 분리한 urokinase는 혈전증치료제로 매우 중요한 물질이며, 30~80$\mu$g/$l$로 뇨중에 존재한다.

$ZnCl_2$에 의한 뇨단백질의 침전을 조사한 결과 뇨 albumin 은 5mM에서 침전이 시작되어, 20mM에서 약 50%가, 그리고 50mM에서 완전히 침전이 이루어진 반면, urokinase는 1~2mM에서 99%이상이(large-scale에서는 93%) 침전되므로 매우 효과적인 농축법이라 생각된다. 더우기 타 단백질이 제거되므로 10~20배의 정제효과도 얻을 수 있다.

이상의 공정을 통하여 현재 10,000liter 규모의 뇨에서 urokinase를 정제하고 있으며, 기존의 bentonite 흡착과 ion exchange column chromatography법과 비교했을 때 전체수율 10~15%, 공정 기간이 50%, 인원이 50%이상 절감하는 결과를 얻었다.

또한 정제된 urokinase 속에는 10~15%의 pro-urokinase 가 함유되어 있음이 확인되었으며, 현재 pro-urokinase만을 순수 분리하고자 하는 시도가 진행중이다.

## 요 약

1,000 $l$ 규모의 인뇨로부터 순수한 urokinase를 정제하는 새로운 공정이 고안되었다. 2가 금속이온인 아연을 첨가하여 선택적으로 urokinase를 침전시켰으며, 이 방법은 뇨 중에 포함된 다른 단백질을 100~1,000배 농축할 때도 사용할 수 있으며 10~20배의 경제효과를 얻었다. 침전물 속에 포함된 urokinase를 경제적으로 용출하기 위하여 0.1M EDTA/0.5M glycine, pH 9.0 용액이 조성되었고, 용출액속에 포함된 높은 농도의 salt와 ion, 뇨색소 등이 CM-Toyopearl column에 의해 신속하고 효과적으로 제거되었다.

최종적으로 사용된 benzamidine-Sepharose chromatography 는 urokinase 정제에 매우 효과적이었다.

이상의 공정을 통해, 1,000 liter의 인뇨로부터 3×10$^6$IU의 urokinase가 순수 정제되었으며, 수율은 약 50%, 정제도는 1,300배이었다. 또한 urokinase 중에 12~14%의 pro-urokinase가 함유되어 있음이 확인되었다.

## References

1. J. R. B. Williams(1951), *Brit. J. Exp. Pathol.* **32**, 530
2. O. K. Albrechtsen(1957), *Acta Physiol. Scand.* **39**, 284
3. O. K. Albrechtsen(1957), *Brit. J. Haematol.* **3**, 284
4. G. H. Barlow and L. Lazer(1973). *Thromb. Res.* **1**, 201
5. T. C. Wun, L. Ossowski, and E. Reich(1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 7262
6. W. E. Holmes, D. Pennica, M. Blaber, M. W. Rey, W. A. Guenzler, G. J. Stettens, and H. L. Heyneker (1985), *Bio/Technology*. **3**, 923
7. A. D. Fletcher, N. Alkjaersig, S. Sherry, E. Genton, J. Hirsh, and F. Bachmann(1965), *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 713
8. A. Lesuk(1967), *U. S. Patent* **3,355, 361**
9. P. A. Roche and S. V. pizzo(1987), *Arch, Biochem. Biophys.* **256**, 265
10. P. G. Zaworski and G. S. Gill(1988), *Anal. Biochem.* **173**, 440
11. D. A. Scott(1934), *Biochem. J.* **28**, 1592
12. E. J. Cohn, F. R. Gurd, D. M. Surgnnor, B. A. Barnes, r. K. Brown, G. Derouaux, J. M. Gillespie, F. W. Kahnt, W. F. Lever, C. H. Liu, D. Milttleman, R. F. Mouton, K. schimid, and E. Uroma (1950), *j. Amer. Chem. Soc.* **72**, 465
13. P. Brakman(1967), *Fibrinolysis: A Standardized Fibrin Plate Method and a Fibrinolytic Assay of Plasminogen*. Amsterdam, p 1.
14. D. C. Stemp, M. Thienpoit, and D. Collen(1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 1267

15. T. Kohno, P. Hopper, J. S. Lillquist, R. L. Sudith, r. Greenlee, and D. L. Moir(1984), *Bio/technology* **2**, 628
16. V. Gurewich, J. M. Stassen, M. Winkler, and M. Verstraete and P. T. Moire(1984), *Biotechnology* **2**, 688
17. M. Bradford(1976), *Anal. Biochem.* **72**, 248

**(Received: July 10, 1990, Accepted: August 7, 1990)**