



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 32 807 T2** 2009.02.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 343 873 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 32 807.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP01/15047**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 271 435.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/050253**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.12.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **27.06.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.09.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **13.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 9/50** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 9/76** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**0004808**      **20.12.2000**      **SE**

(73) Patentinhaber:

**DSM IP Assets B.V., Heerlen, NL; GE Healthcare  
Bio-Sciences AB, Uppsala, SE**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**FÄHRENMARK, Johan, S-191 62 Sollentuna, SE;  
LAGERLUND, Inger, S-168 32 Bromma, SE;  
MORENWEISER, Robert, 93055 Regensburg, DE;  
CAUSSETTE, Mylene, F-59000 Lille, FR; PIRON,  
Eric, F-59130 Lambersart, FR**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR AUFREINIGUNG VON CHYMOsin**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## TECHNISCHES GEBIET

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Chymosin, bei dem man:

- (i) eine wäßrige Flüssigkeitsprobe bereitstellt, die Chymosin und eine hydrophile Basismatrix und mehrere fest gebundene Liganden, die zur Bindung von Chymosin befähigt sind, umfassendes Trennmedium enthält,
- (ii) die Matrix unter Bedingungen mit der Probe in Berührung bringt, welche die Bindung von Chymosin an die Matrix erlauben, und
- (iii) Chymosin von der Matrix desorbiert.

**[0002]** Unter dem Begriff Chymosin sind das Aspartatprotease-Zymogen und alle davon abgeleiteten Zwischenformen, die proteolytisch aktiv oder inaktiv sind, zu verstehen. Eingeschlossen sind auch die verschiedenen Typen von Chymosin, die natürlich vorkommen (Typ a, b, c) und die gentechnisch oder durch Rekombinationstechniken gewonnen werden.

## TECHNISCHER HINTERGRUND

**[0003]** Chymosin ist ein Milchgerinnungsenzym, das aus dem Magen von Säugetieren stammt, in dem es zusammen mit anderen Milchgerinnungsenzymen, wie Pepsin, produziert wird. Zubereitungen von Milchgerinnungsenzymen werden in der Lebensmittelindustrie verwendet, beispielsweise bei der Käseherstellung. Daher besteht Bedarf an gereinigten Chymosinzubereitungen mit hoher und gut charakterisierter spezifischer Milchgerinnungsaktivität.

**[0004]** Ursprünglich wurde Chymosin aus Rindermagenextrakten, insbesondere von Kälbern, gereinigt. Ein Hauptproblem bei dieser Art von natürlichen Quellen bestand darin, daß die Extrakte auch andere Milchgerinnungsenzyme, wie Pepsin, und auch verschiedene Proformen der Enzyme enthalten. Demgemäß enthielten ältere Reinigungsvorschriften Schritte zur Umwandlung von Proformen in aktive Enzyme und Schritte zur Abtrennung von Chymosin von Pepsin. Ein anderes Hauptproblem bestand in der beträchtlich schwankenden Aktivität des Ausgangsmaterials.

**[0005]** Bei der Abtrennung von Chymosin von Pepsin wurde in erster Linie die Ionenaustauschadsorption in Kombination mit der Tatsache, daß sich die isoelektrischen Punkte von Pepsin und Chymosin stark unterscheiden (pI 2 bzw. pI 4,8), verwendet. Mit anderen Worten wird ein Kationenaustauscher, der im Intervall pH 2–4,8 negativ geladen sein kann, in diesem pH-Bereich zur Adsorption von Chymosin in der Lage sein. Analog wird ein Anionenaustauscher, der im gleichen pH-Intervall positiv geladen sein kann, zur Adsorption von Chymosin in der Lage sein. Dies wurde beispielsweise in der US 5,888,966 (Larsen et al.) und der US 4,745,063 (Birschbach) ausgenutzt. Außerdem wurde in der US 4,666,843 (Subramanian et al.) die Affinitätsadsorption auf Basis von Farbstoffaffinitätsliganden vorgeschlagen.

**[0006]** Chymosin ist auch durch sogenannte Rekombinationstechniken erhalten worden, d. h. aus zur Transformation von Chymosin (oder Proformen davon) transformierten Wirtszellen. In diesem Fall ergeben sich andere Reinigungsprobleme, da die Verunreinigungen nicht die gleichen sind; beispielsweise fehlt Pepsin (es sei denn, die Wirtszellen produzieren auch Pepsin), und es müssen andere Verunreinigungen entfernt werden. Typische Wirtszellen können mikrobiellen Ursprungs sein, wie Hefe, Pilze (insbesondere *Aspergillus niger*), Bakterien usw., wobei Säugetierzellen nicht ausgeschlossen sind. Für diese Art von Chymosin wird in der US 4,743,551 (Subramanian) und der US 4,721,673 (Subramanian et al.) die Farbstoffaffinitätsligandenadsorption und in der US 5,122,467 (Heinsohn et al.) die Adsorption an Phenyl-Sepharose (Sepharose ist das Warenzeichen von Amersham Pharmacia Biotech. Die entsprechenden Produkte basieren auf Agarose) vorgeschlagen. Aus der US 5,122,467 (Spalte 3, Zeile 31–50) geht hervor, daß ein Vergleich zwischen Phenyl-Sepharose und Agarosen mit anderen Funktionalitäten einschließlich Octyl angestellt wurde. Als Schlußfolgerung wird angegeben, daß die Phenylfunktionalität die einzige ist, die die gewünschte Selektivität für Chymosin in Fermentationsbrühen bereitstellt. In der WO 9600735 (Burton et al.) und der WO 9609116 (Burton et al.) sind auch Experimente unter Verwendung anderer Liganden, die aromatische Ringe enthalten, vorgestellt worden.

**[0007]** In einer neueren Studie von Burton et al. („One-step purification of chymosin by mixed mode chromatography” in *Biotech. Bioengin.* 56(1) (1997) 45–55) wurde eine Reihe von mit einer Ladung versehbaren und nicht mit einer Ladung versehbaren aromatischen Liganden für die Adsorption von Chymosin aus einer Fermentationsbrühe untersucht.

[0008] Ungeachtet der Zahl vorher vorgeschlagener Reinigungsvorschriften besteht nach wie vor Bedarf an Verbesserungen bezüglich Ausbeute/Gewinnung, Reinheit, spezifischer Chymosinaktivität, leichter Durchführung, Bedarf an Elutionsmitteln usw.

#### AUFGABEN DER ERFINDUNG

[0009] Die erste Aufgabe besteht in der Bereitstellung von Adsorptions-/Desorptionsvorschriften für Chymosin, was zu Verbesserungen bezüglich mindestens eines der Punkte Ausbeute/Gewinnung, Reinheit, spezifischer Chymosinaktivität, leichter Durchführung, Bedarf an Elutionsmitteln usw. führt.

[0010] Die zweite Aufgabe besteht in einem Verfahren zur Optimierung mindestens eines der Punkte Ausbeute/Gewinnung, Reinheit, spezifische Chymosinaktivität, leichte Durchführung, Bedarf an Elutionsmitteln usw.

[0011] Eine Verbesserung kann sich auf den Adsorptions-/Desorptionsschritt als solchen oder auf das Verfahren insgesamt beziehen. Mit anderen Worten kann eine Erhöhung der Reinheit im Adsorptions-/Desorptionsschritt implizieren, daß ein normalerweise durchgeführter vorhergehender Schritt unnötig sein kann.

#### DIE ERFINDUNG

[0012] Bei eigenen Untersuchungen wurde erkannt, daß diese Aufgaben zumindest teilweise erfüllt werden können, wenn es sich bei den Liganden um nichtaromatische Kohlenwasserstoffgruppen handelt. Dies steht im Gegensatz zu den Ausführungen in der US 5,122,467 (Heinsohn et al.).

[0013] Der erste Aspekt der Erfindung ist somit ein Verfahren, wie es unter der Überschrift „Technisches Gebiet“ definiert ist. Das kennzeichnende Merkmal des Verfahrens lehrt, daß die Matrix hydrophil ist und es sich bei den Liganden in den mehreren Liganden um Kohlenwasserstoffgruppen, wobei alle Kohlenstoffatome  $sp^3$ -hybridisiert sind, mit einem in einer oder mehreren Positionen in mindestens einer der Kohlenwasserstoffgruppen zwischen zwei Kohlenstoffatomen eingeschobenen Ether-Sauerstoff (-O-) oder Thioether-Schwefel (-S-), wobei das Verhältnis der Summe von Schwefel- und Sauerstoffatomen zur Zahl der Kohlenstoffatome in jeder Kohlenwasserstoffgruppe  $< 1$  ist, und gegebenenfalls ein Wasserstoffatom in einer oder mehreren Positionen in mindestens einer der Kohlenwasserstoffgruppen durch eine Hydroxygruppe ersetzt ist, handelt.

[0014] Die Kohlenwasserstoffgruppen können identisch sein oder auch nicht.

#### Der Ligand

[0015] Die Kohlenwasserstoffgruppen können gerade, verzweigt oder cyclisch sein. Sie können 1-30 Kohlenstoffatome und typischerweise 3-25 Kohlenstoffatome enthalten.

[0016] In den Kohlenwasserstoffgruppen ist in einer oder mehreren Positionen in mindestens einer der in dem verwendeten Trennmedium vorliegenden Kohlenwasserstoffgruppen zwischen zwei Kohlenstoffatomen ein Ether-Sauerstoffatom (-O-) oder ein Thioether-Schwefelatom (-S-) eingeschoben. Ein an ein Kohlenstoffatom gebundenes Wasserstoffatom kann in einer oder mehreren Positionen durch eine Hydroxygruppe ersetzt sein. Das Verhältnis der Summe von Schwefel- und Sauerstoffatomen zur Zahl der Kohlenstoffatome in jeder Kohlenwasserstoffgruppe ist  $< 1$ , vorzugsweise  $\leq 0,8$  oder  $\leq 0,5$  oder  $\leq 0,25$ .

[0017] Für die Kohlenwasserstoffgruppen gelten allgemeine Stabilitätsanforderungen, was bedeutet, daß sowohl ein Ether-Sauerstoffatom als auch ein Thioether-Schwefelatom in beiden Richtungen an  $sp^3$ -hybridisierte Kohlenstoffatome gebunden sein müssen. Ferner sollte jedes  $sp^3$ -hybridisierte Kohlenstoffatom in einer Kohlenwasserstoffgruppe an höchstens ein unter Ether-Sauerstoffatomen, Hydroxy-Sauerstoffatomen und Thioether-Schwefelatomen ausgewähltes Heteroatom gebunden sein.

[0018] Die Kohlenwasserstoffgruppe kann eine oder mehrere reine Alkylgruppen enthalten, wozu auch reine Alkylengruppen gehören, d. h. Kohlenwasserstoffgruppen, in denen nur Wasserstoffatome und  $sp^3$ -hybridisierte Kohlenstoffatome vorliegen. Typische reine Alkyl-/Alkylengruppen weisen 1-12 Kohlenstoffatome und vorzugsweise 2-10 Kohlenstoffatome, wie 3-10 Kohlenstoffatome, auf. Diese Alkylgruppen können gerade, verzweigt oder cyclisch sein.

[0019] Typische Kohlenwasserstoffgruppen, die Liganden sein können, sind:

- Reine Alkylgruppen gemäß obiger Erörterung. Illustrative Beispiele sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl,

n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, verschiedene Isoformen von Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl usw. Für Pentyl und höhere Homologe können die Gruppen cyclische Strukturen enthalten.

- Kohlenwasserstoffgruppen, die durch Hydroxyalkylierung einer Basismatrix erhältlich sind, z. B. 2-Hydroxyalkylgruppen.
- Kohlenwasserstoffgruppen, die durch Umsetzung einer Basismatrix mit Dialkylethern, in denen eine oder beide der Alkylgruppen eine Epoxidgruppe enthält, erhältlich sind, beispielsweise die Verwendung von Glycidylalkylether zum Einschub der Gruppe  $-\text{[CH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{O]}_m\text{R}$ , worin R für eine reine Alkylgruppe mit einer cyclischen Struktur ( $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ ) oder nur einer geraden und/oder verzweigten Struktur ( $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ ) steht und m und n für ganze Zahlen  $\geq 1$  stehen.

**[0020]** Bei den Liganden handelt es sich vorzugsweise um Kohlenwasserstoffgruppen mit drei, vier oder fünf Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt vier Kohlenstoffatomen.

**[0021]** Neben den Liganden, die die oben definierten Kohlenwasserstoffgruppen enthalten, können im Trennmedium auch noch andere Arten von Liganden vorliegen.

#### Spacer

**[0022]** Die Liganden/Kohlenwasserstoffgruppen können gegebenenfalls über einen Spacer an der Basismatrix immobilisiert sein. Im Rahmen der Erfindung beginnt der Spacer am Grundgerüst der Basismatrix und endet unmittelbar nach (a) dem letzten Heteroatom, bei dem es sich nicht um ein Thioether-Atom oder ein Ether-Atom handelt, oder (b) dem letzten  $\text{sp}^2$ -hybridisierten Kohlenstoffatom, das Teil der Kettenverknüpfung des Liganden mit der Basismatrix ist. Wenn es sich bei jedem Heteroatom um ein Ether-Sauerstoffatom oder ein Thioether-Schwefelatom handelt und jedes Kohlenstoffatom  $\text{sp}^3$ -hybridisiert ist, liegt kein Spacer vor (der Ligand ist direkt an die Basismatrix gebunden).

**[0023]** Der Spacer, sofern vorhanden, kann somit unter Ethergruppen, Thioethergruppen, bivalenten Kohlenwasserstoffgruppen, Estergruppen, Amidgruppen, Azogruppen, Sulfongruppen usw. ausgewählte Gruppen umfassen, wie in der Technik gut bekannt ist. Die einzige Maßgabe besteht darin, daß das zur Basismatrix distale Ende des Spacers kein Etheratom oder Thioetheratom oder  $\text{sp}^3$ -hybridisiertes Kohlenstoffatom sein kann. Eine bivalente Kohlenwasserstoffgruppe in einem Spacer weist eine Kette von  $\text{sp}^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen, die ungeladene oder nicht mit einer Ladung versehbare Substituentengruppen tragen und gerade, verzweigte oder cyclische Strukturen enthalten kann, auf. Amidgruppen können durch Alkyl N-substituiert sein, welches wiederum gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxygruppen substituiert ist, wie oben für Kohlenwasserstoffgruppen beschrieben.

**[0024]** In ein und demselben Trennmedium können die Kohlenwasserstoffliganden über einen Spacer an die Basismatrix gebunden sein oder auch nicht. Es können auch verschiedene Spacer gemäß obiger Definition vorliegen.

**[0025]** Im typischsten Fall beträgt die Länge des Spacers 1-20 Atome (die Kette von Atomen zwischen dem Grundgerüst der Basismatrix und dem Liganden). Ein einziges Heteroatom, wie ein Ether-Sauerstoffatom, das sich von der Basismatrix ableitet und zur Verankerung des Spacers oder des Liganden an der Basismatrix verwendet wird, ist Teil der Basismatrix und nicht des Spacers oder Liganden.

**[0026]** Für den Spacer gelten normale Stabilitätsanforderungen; beispielsweise sollte höchstens ein unter Schwefel, Sauerstoff und Stickstoff ausgewähltes Heteroatom an ein und dasselbe  $\text{sp}^3$ -hybridisiertes Kohlenstoffatom gebunden sein.

#### Basismatrix

**[0027]** Die Basismatrix basiert auf organischem und/oder anorganischem Material.

**[0028]** Die Basismatrix ist vorzugsweise hydrophil und in Form eines Polymers, das in Wasser unlöslich und mehr oder weniger quellbar ist. Diese Definition umfaßt auch hydrophobe Polymere, die durch Derivatisierung hydrophil gemacht worden sind. Geeignete Polymere sind Polyhydroxypolymere, z. B. auf Basis von Polysacchariden, wie Agarose, Dextran, Cellulose, Stärke, Pullulan usw. und vollsynthetische Polymere, wie Polyacrylamid, Polymethacrylamid, Poly(hydroxyalkylvinylether), Poly(hydroxyalkylacrylate) und Polymethacrylate (z. B. Polyglycidylmethacrylat), Polyvinylalkohole und Polymere auf Basis von Styrolen und Divinylbenzolen und Copolymere, in denen zwei oder mehr der oben aufgeführten Polymeren entsprechenden Monomeren ent-

halten sind. Wasserlösliche Polymere können so derivatisiert werden, daß sie unlöslich werden, z. B. durch Vernetzung und Kupplung an einen unlöslichen Körper mittels Adsorption oder kovalenter Bindung. Hydrophile Gruppen können an hydrophoben Polymeren (z. B. an Copolymeren von Monovinyl- und Divinylbenzolen) durch Einpolymerisieren von Monomeren mit Gruppen, die in OH umgewandelt werden können, oder durch Hydrophilisierung des fertigen Polymers, z. B. durch Adsorption geeigneter Verbindungen, wie hydrophiler Polymere, eingeführt werden.

**[0029]** Geeignete in Basismatrices zu verwendende anorganische Materialien sind Siliciumdioxid, Zirconiumoxid, Graphit, Tantaloxid usw.

**[0030]** Die Matrix kann porös oder nichtporös sein. Das bedeutet, daß die Matrix für die zu entfernende Verbindung ganz oder teilweise durchlässig (porös) oder vollkommen undurchlässig (nichtporös) sein kann. Für präparative Verfahren sollte die Porengröße so beschaffen sein, daß die Matrix einen Kav-Wert hat, der für Chymosin im Intervall 0,10–0,95 liegt, wobei das Subintervall 0,40–0,95 insbesondere für Basismatrices gilt, die keine sogenannten Extender aufweisen. Siehe unten.

**[0031]** In einer besonders interessanten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt die Matrix in Form von unregelmäßigen oder kugelförmigen Teilchen mit Größen im Bereich von 1–1000 µm, vorzugsweise 5–50 µm für Hochleistungsanwendungen und 50–300 µm für präparative Zwecke, vor.

**[0032]** Eine interessante Form von Matrices hat höhere oder niedrigere Dichten als die Flüssigkeit. Diese Art von Matrices eignet sich besonders gut für großmaßstäbliche Arbeiten für die Wirbelschicht- oder Expanded-Bed-Chromatographie und für verschiedene diskontinuierliche Verfahrensweisen, z. B. in Rühr tanks. Wirbelschicht- und Expanded-Bed-Verfahrensweisen werden in der WO 9218237 (Amersham Pharmacia Biotech AB) und der WO 92/00799 (Kem-En-Tek) beschrieben.

**[0033]** Der Begriff „eine hydrophile Basismatrix“ bedeutet in der Praxis, daß die zugängliche Oberfläche der Basismatrix in dem Sinne hydrophil ist, daß sie von wäßrigen Flüssigkeiten durchdrungen werden kann. Typischerweise exponieren die zugänglichen Oberflächen einer hydrophilen Basismatrix mehrere polare Gruppen, die beispielsweise Sauerstoff- und/oder Stickstoffatome enthalten. Beispiele für derartige polare Gruppen sind Hydroxy, Amino, Carboxy, Ester, Ether von Niederalkylgruppen (wie  $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ , worin n für eine ganze Zahl steht).

**[0034]** Sofern vorhanden, werden Extender, Tentakel und dergleichen, wie in WO 9833572 (Amersham Pharmacia Biotech AB) beschrieben, als Teil der Basismatrix erachtet.

#### Bindungskapazität für Chymosin

**[0035]** Im Gegensatz zu den in der US 5,122,467 (Heinsohn et al.) vorgestellten Befunden wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung erkannt, daß Trennmedien auf Basis von hydrophilen Basismatrices und der richtigen Hydrophil/Hydrophob-Balance, die durch das Vorliegen der oben erwähnten Kohlenwasserstoffgruppen verursacht werden kann, bei verbesserten Trennvorschriften für Chymosin verwendet werden können. Das Bindungsvermögen sollte ausreichen, um eine ausreichende Bindungskapazität und Bindungsfestigkeit zu ergeben, die eine Desorption unter Bedingungen, die keine irreversible Denaturierung von Chymosin verursachen, ermöglichen. Der an Sepharose Fast Flow gebundene Ligand n-Butyl-OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>-, wie er im experimentellen Teil beschrieben wird, wird für weniger hydrophobe Varianten B und C gut funktionieren, wohingegen hydrophobere Varianten A im Desorptionsschritt verringerte Ausbeuten ergeben werden.

**[0036]** Aus dem vorhergehenden Absatz folgt, daß die Effizienz verschiedener Trennmedien mit der Hydrophil/Hydrophob-Balance in der Basismatrix, dem Substitutionsgrad der Kohlenwasserstoffgruppen (Liganden) und der Hydrophil/Hydrophob-Balance im Liganden (Kohlenwasserstoffgruppe) variieren wird. Unter Berücksichtigung der großen Zahl verschiedener verfügbarer Basismatrices und der großen Zahl verschiedener Liganden wird es unmöglich, einen Bereich für den Substitutionsgrad anzugeben, es sei denn, es wird ein weites Intervall festgesetzt, wie 0–500, wie 0–100 oder 5–500 µmol/ml feuchtes Gel. Der Extremwert 0 µmol/ml feuchtes Gel steht für den Fall, in dem die Basismatrix als solche die richtige Hydrophil/Hydrophob-Balance bereitstellt.

**[0037]** Um zu bestimmen, ob ein bestimmtes Trennmedium für die Chymosinreinigung effizient oder optimal ist, wurde im Rahmen eigener Arbeiten ein Verfahren zur Bestimmung der Hydrophil/Hydrophob-Balance von Trennmedien entwickelt. Das Verfahren wird im experimentellen Teil beschrieben und bedeutet, daß ein Trenn-

medium in eine Säule gepackt wird, wonach  $\alpha$ -Chymotrypsinogen unter den angegebenen Standardbedingungen durchgehen gelassen wird. Geeignete bei der Erfindung zu verwendende Trennmedien finden sich unter denjenigen Medien, die bei diesem Test eine Retentionszeit ( $r$ ) für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen ergeben, die im Intervall  $r_{\text{Standard}} \pm 50\%$  liegt, wobei  $r_{\text{Standard}}$  für die Retentionszeit für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen an Variante B von n-Butyl-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>-Sephacryl Fast Flow gemäß der Beschreibung im experimentellen Teil steht. Optimale Varianten weisen normalerweise Retentionszeiten im Intervall  $r_{\text{Standard}} \pm 10\%$  auf.

**[0038]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Reinigung von Chymosin, bei dem man:

- (i) eine wäßrige Flüssigkeitsprobe bereitstellt, die Chymosin und ein eine hydrophile Basismatrix umfassendes Trennmedium enthält,
- (ii) die Matrix unter Bedingungen mit der Probe in Berührung bringt, welche die Bindung von Chymosin an die Matrix erlauben, und
- (iii) Chymosin von der Matrix desorbiert.

**[0039]** In diesem Aspekt der Erfindung besteht das kennzeichnende Merkmal darin, daß das Trennmedium eine Hydrophil/Hydrophob-Balance aufweist, die bei dem im experimentellen Teil angegebenen Test eine Retentionszeit ( $r$ ) für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen ergibt, die im Intervall  $r_{\text{Standard}} \pm 50\%$  liegt, wobei  $r_{\text{Standard}}$  für die Retentionszeit für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen an Variante B von n-Butyl-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>-Sephacryl Fast Flow gemäß der Beschreibung im experimentellen Teil steht. Optimale Varianten finden sich normalerweise unter denjenigen Trennmedien, die Retentionszeiten im Intervall  $r_{\text{Standard}} \pm 10\%$  aufweisen.

**[0040]** Das in diesem Aspekt der Erfindung verwendete Trennmedium kann gegebenenfalls Liganden und Spacer aufweisen, wie für den ersten Aspekt der Erfindung definiert. Die Basismatrix ist wie für den ersten Aspekt definiert. Wenn keine Liganden der oben definierten Art vorliegen, fehlt es dem Medium immer an anderen Liganden mit einer aromatischen Ringstruktur.

#### Die Vorschrift zur Durchführung der Adsorption/Desorption

**[0041]** Der Adsorptionsschritt wird typischerweise unter adsorptionsfördernden Bedingungen durchgeführt, was wäßrige Flüssigkeiten mit nicht denaturierendem pH-Wert für Chymosin und eine verhältnismäßig hohe Ionenstärke, beispielsweise einer Salzkonzentration im Intervall 0,01–2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entsprechend (insbesondere > 0,2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entsprechend), bedeutet. Der pH-Wert liegt vorzugsweise unter dem oder um den pI (d. h. 4,8) von Chymosin, d. h. im pH-Intervall zwischen 2 und 5, vorzugsweise zwischen 3,5 und 4,8 und besonders bevorzugt zwischen 4,0 und 4,5. Diese Ionenstärke kann durch Zugabe von wasserlöslichen Salzen, beispielsweise Salzen der Elemente der Gruppe IA und IB, wie Chloriden, Sulfaten usw., auch einschließlich entsprechender Ammoniumsalze, erreicht werden. Besonders wertvolle Salze sind in dieser Hinsicht NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**[0042]** Nach dem Adsorptionsschritt können die Trennmedien mit einem wäßrigen Medium mit geeigneter Ionenstärke und geeignetem pH-Wert gewaschen werden. Illustrative Ionenstärken entsprechen dem Intervall 0,1–2,0 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (insbesondere > 0,2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entsprechend), und der pH-Wert im Intervall 3,5–7,5. Die in den Waschlösungen vorliegenden Salze werden aus der gleichen Art ausgewählt, wie sie für den Adsorptionsschritt verwendet werden.

**[0043]** Schließlich wird Chymosin von dem Trennmedium desorbiert, indem man die Ionenstärke/Salzkonzentration verringert, bis Desorption auftritt. Die genaue Ionenstärke/Salzkonzentration, bei der Desorption auftreten wird, hängt von dem verwendeten speziellen Trennmedium ab. Die Salzkonzentration kann häufig im Intervall 0,0–1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder der entsprechenden Ionenstärke bei Verwendung anderer Salze gewählt werden. Als Faustregel liegt die Ionenstärke für die Desorption typischerweise unter der Ionenstärke von 1,0 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Insbesondere wenn der pH-Wert während der Adsorption unter dem pI für Chymosin gelegen hat, kann die Verringerung der Ionenstärke mit einer Erhöhung des pH-Werts, beispielsweise im pH-Intervall zwischen 5,0 und 8,0, vorzugsweise zwischen 6,0 und 7,0 und besonders bevorzugt zwischen 6,4 und 6,8 kombiniert werden. Die in die Desorptionslösungen eingearbeiteten Salze können unter gleichen Salzen wie für die Adsorptionslösung ausgewählt werden.

**[0044]** Die Änderung der Ionenstärke und/oder des pH-Werts während der Desorption kann als schrittweiser oder kontinuierlicher Gradient erfolgen. Ein schrittweiser Gradient kann einen oder mehrere Schritte enthalten. Die Änderung des pH-Werts kann nach, vor oder gleichzeitig mit der Änderung der Ionenstärke erfolgen. Die Anfangsexperimente wurden bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 durchgeführt (Beladung und Elution). Die Reinheit des Chymosins war ähnlich, aber die Ausbeute etwa 10% niedriger und das Elutionsvolumen höher.

**[0045]** Typische Puffersubstanzen sind wasserlösliche Acetate, Citrate, Phosphate, insbesondere Natriumphosphat, usw., und die richtige Wahl hängt vom gewünschten pH-Wert ab.

**[0046]** Die bevorzugte Vorschrift ist im experimentellen Teil angegeben.

**[0047]** Die Adsorptions- und/oder Desorptionsschritte können als diskontinuierlicher Prozeß, bei dem das Trennmedium beispielsweise durch Rühren oder eine durchfließende wäßrige Flüssigkeit bewegt wird, durchgeführt werden. Ganz besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren als chromatographischer Prozeß durchgeführt, d. h. mit dem Trennmedium in Form von Teilchen/Perlen, die zu einem Bett gepackt oder zu einem expandierten Bett fluidisiert sind. Für chromatographische Prozesse kann das Trennmedium auch in monolithischer Form vorliegen, beispielsweise in Form eines Stopfens oder eines Filters.

**[0048]** Bei bevorzugten Varianten ist der erfindungsgemäße Prozeß zyklisch, d. h. das Trennmedium wird nach Schritt (iii) zurückgewonnen und in Schritt (i) wiederverwendet, möglicherweise unter Einschub eines Regenerationsschritts und/oder Reinigungsschritts zwischen Schritt (iii) und Schritt (i) eines nachfolgenden Zyklus. Regenerations-/Reinigungslösungen enthalten typischerweise NaOH (beispielsweise > 0,1 M, wie 0,5 M oder 1 M). Durch Mitverwendung von Isopropanol ist es möglich, die NaOH-Konzentration zu verringern.

**[0049]** Die beim Desorptionsschritt erhaltene Ausbeute an Chymosin ist typischerweise  $\geq 60\%$ , wie  $\geq 85\%$ , der in der aufgebrachten Probe bereitgestellten Gesamtmenge an Chymosin. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Ausbeute in diesem Schritt größer gleich 90% sein kann. Die Reinheit von gereinigtem Chymosin liegt vorteilhafterweise über 90%, bezogen auf Protein (basierend auf der Peakflächenbestimmung bei 280 nm im Chromatogramm), wie durch Analyse mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie auf Größenausschlußbasis (HPLC-SEC, siehe ferner den experimentellen Teil) bestimmt. Vorzugsweise beträgt die Reinheit mehr als 92% und besonders bevorzugt mehr als 95%.

**[0050]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann entweder vor oder nach den Schritten (i) bis (iii) gemäß obiger Beschreibung auch zusätzliche Schritte umfassen. Vorgeschaltete Schritte sind beispielsweise die Umwandlung von Prochymosin, Pseudochymosin usw. in vollständig aktives Chymosin, Fällung, Filtration, andere Adsorptionsschritte usw., wie auf dem Gebiet der Proteinreinigung gut bekannt ist. Potentielle nachgeschaltete Schritte sind Entsalzung, Polierschritte, die typischerweise eine weitere Reinigung bedeuten, beispielsweise durch Affinitätsadsorption, Trocknen, beispielsweise durch Lyophilisation oder Sprühtrocknen, usw.

**[0051]** Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für rekombinante Formen von Chymosin aus Präparaten, die im wesentlichen frei von Pepsin sind.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### SYNTHESE VON PROTOTYP-TRENNMEDIEN

**[0052]** 100 ml Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) werden auf einer Glasfilternutsche mit mindestens 10 Gelvolumina destilliertem Wasser gewaschen. Die Basismatrix wird in den Reaktionsbehälter überführt. Das Gesamtvolumen, siehe Tabelle 1, wird mit destilliertem Wasser eingestellt, und der Rührer wird eingeschaltet. Es werden 16,5 g Natriumsulfat, 50%iges Natriumhydroxid, siehe Tabelle 1, und 0,2 g Natriumborhydrid zugegeben. Die Salze werden mindestens 1 h auflösen gelassen. Die Temperatur wird auf 50°C erhöht, wonach Butylglycidylether, siehe Tabelle 1, zugegeben wird. Die Reaktion wird 17–24 Stunden bei  $50 \pm 3^\circ\text{C}$  ablaufen gelassen. Dann wird die Temperatur auf 20–25°C verringert. Durch Zugabe von Essigsäure wird ein pH-Wert von 5–7 eingestellt. Das Adsorptionsmittel wird auf einer Glasfilternutsche mit mindestens 2 Gelvolumina destilliertem Wasser, 6 Gelvolumina Ethanol und schließlich mit 10 Gelvolumina destilliertem Wasser gewaschen. Die Medien werden in 20%igem Ethanol gelagert.

Tabelle 1

Prototyp	Gesamtvolumen (ml)	50%iges Natriumhydroxid (g)	Butylglycidylether (g)
A	120	34	23,0
B	133	29	16,7
C	125	32	18,0

## TEST AUF HYDROPHIL/HYDROPHOB-BALANCE

## Adsorptionspuffer

**[0053]** 0,02 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan + 1,70 M Ammoniumsulfat, mit Salzsäure auf pH  $7,5 \pm 0,1$  eingestellt.

## Elutionspuffer

**[0054]** 0,02 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, mit Salzsäure auf pH  $7,5 \pm 0,1$  eingestellt.

## Probe

**[0055]** Das Protein wird in Adsorptionspuffer gelöst.

## Packen der Säule

**[0056]** Ungefähr 25 ml Gel werden auf einer Glasfilternutsche mit 250 ml destilliertem Wasser und dann mit 100 ml Desorptionspuffer in kleinen Portionen gewaschen. 10 ml Gel werden in jede Säule mit einer Durchflußrate von 2 ml/Minuten gepackt, wonach die Betthöhe auf 10,5–11,0 cm eingestellt wird. Nach Anbringen des Kopfadapters wird noch 20 Minuten mit einer Durchflußrate von 4 ml/Minute gepackt. Die Betthöhe wird während des Durchflusses markiert, und der Kopfadapter wird knapp unter der Bettoberfläche eingestellt. Die Betthöhe sollte nun  $10 \pm 0,2$  cm betragen.

## Chromatographische Verfahrensweise

- Der Test wird bei  $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durchgeführt.
- Es wird mit 39 ml Adsorptionspuffer mit einer Durchflußrate von 1 ml/Minute äquilibriert.
- 1,0 ml Proteingemisch werden mit einer Durchflußrate von 0,5 ml/Minute injiziert.
- Die Proteine werden mit einem Gradienten, 0 bis 100%, des Desorptionspuffers mit einer Durchflußrate von 1 ml/Minute über einen Zeitraum von 60 Minuten eluiert.
- Die Retentionszeit ist die Zeit vom Beginn des Gradienten bis zur Elution des Peakmaximums der Proteine.

**[0057]** Alle drei Prototypen wurden gemäß den obigen Vorschriften getestet. Die Testergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Prototyp	Retentionszeit für $\alpha$ -Chymotrypsinogen (min)
A	68
B	58
C	62

**[0058]** Durch Variation der Komponenten in der Reaktionsmischung konnte für eine gegebene Kombination von Alkylglycidylether und Basismatrix über verschiedene Routen die gleiche Hydrophob/Hydrophil-Balance erhalten werden.

**[0059]** Bei diesem Verfahren wurde im Handel erhältliches Octyl Sepharose Fast Flow getestet, wobei sich eine Retentionszeit von  $45 \pm 4$  min ergab. Bei der Prüfung in der oben angegebenen chromatographischen Verfahrensweise zur Bindung von Chymosin wurde gefunden, daß die Bindung schwächer war. Diese Ergebnisse legen nahe, daß man für eine Octylvariante von Sepharose Fast Flow mit ähnlicher Bindung von Chymosin wie die obigen Varianten B und C eine hydrophobere Variante synthetisieren muß, beispielsweise durch Variation der Bedingungen, unter denen die Octylgruppe eingeführt wird.

Chromatographische Experimente mit Chymosin

Beispiel 1:

**[0060]** Das Beispiel beschreibt die chromatographische Reinigung von Chymosin unter Verwendung der obigen Variante B von mit Butylglycidylether derivatisiertem Sepharose 4 Fast Flow.

**[0061]** Die Chymosinprobe wurde aus einem Fermentationsprozeß eines genetisch modifizierten Kluyveromyces-Wirtsstamms wie in EP 301679 (Rietveld et al.) beschrieben erhalten.

**[0062]** Etwa 20.000 iMCU Chymosinaktivität wurden mit einer linearen Durchflußrate von 200 cm/h auf eine 4,6 × 150 mm große, mit oben beschriebenen Trennmedium Variante B gepackte Säule geladen. Die Säule wurde mit 25 mM NaAc, pH 4,0, 0,35 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> äquilibriert. Die Chymosinkapazität für das Trennmedium betrug 8000 iMCU feuchtes Medium (35 mg/ml feuchtes Harz).

**[0063]** Nach der Beladung wurde die Säule mit Äquilibrierungspuffer (200 cm/h) gewaschen, bis die Basislinie erreicht war. Die Elution von Chymosin erfolgte mit einem Schrittgradienten bei 200 cm/h (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5). Typischerweise wurde Chymosin als ein einziger Peak eluiert.

**[0064]** Das eluierte Chymosin besaß eine Reinheit von 98% gemäß HPLC-SEC-Analyse. Die Prozeßausbeute betrug etwa 85%. Die Chymosinkonzentration wurde gemäß International Dairy Federation 157, Remcat-Methode, bestimmt.

**[0065]** Die HPLC-SEC-Analyse wurde an TSK G 3000 SW, TosoHaas – 7,5 mm ID – 30 mm, mobile Phase 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8, 1,0 ml/min, durchgeführt.

Beispiel 2:

**[0066]** Das Beispiel beschreibt die chromatographische Reinigung von Chymosin unter Verwendung der obigen Variante B von mit Butylglycidylether derivatisiertem Sepharose 4 Fast Flow und 1,2-Propandiol als Additiv im Elutionspuffer:

Ein Chymosin enthaltendes Prozeßfluid wurde auf eine das Trennmedium enthaltende Säule geladen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Nach der Beladung wurde die Säule mit Äquilibrierungspuffer (200 cm/h) gewaschen, bis die Basislinie erreicht war. Die Elution von Chymosin erfolgte mit einem Schrittgradienten bei 200 cm/h unter Verwendung von 50 mM Kaliumphosphat, pH 6,5, mit 5% 1,2-Propandiol. Chymosin wurde in einem einzigen Peak eluiert. Das Elutionsvolumen war im Vergleich zu Beispiel 1 um 22% verringert.

Beispiel 3

**[0067]** Dieses Beispiel beschreibt eine Kapazitätsstudie unter Verwendung von Variante-B-Medien von Butyl-Sepharose 4 Fast Flow für eine aus einem Fermentationsprozeß erhaltene Chymosinprobe. Die Beladungsbedingungen waren gemäß Beispiel 1. Die Durchflußfraktionen wurden auf Chymosinaktivität hin untersucht.

**[0068]** Aus einem Auftragungsprozentsatz von „Beladung im Durchfluß“ gegen „Beladung von Chymosin (geklärtes Prozeßfluid)/ml Separationsmedium“ wurde bestimmt, daß die Durchbruchkapazität dieses Trennmediums für Chymosin 8000 iMCU/ml Medium bei 10% Durchbruch im Durchfluß betrug.

**[0069]** Die spezifische Aktivität von Chymosin beträgt 230 iMCU/g, und daher beträgt die Bindungskapazität dieses Trennmediums 35 mg/ml. Die Bindungskapazität von 35 mg/ml ist im Vergleich zum Stand der Technik hoch. Die US 5,122,467 (Phenyl-Sepharose) zeigt eine Bindungskapazität von 7 bis 8 mg/ml.

Beispiel 4

**[0070]** Beispiel 1 wurde wiederholt, wobei jedoch Sepharose 6 Fast Flow verwendet wurde. Bei Verwendung von Sepharose 6 Fast Flow wurde während der chromatographischen Reinigung von Chymosin weniger Kompressibilität gefunden. Die Bindungskapazität erwies sich als ähnlich wie in Beispiel 3 beschrieben. Schließlich wurde gefunden, daß die Leerrohrgeschwindigkeiten nun (bis zu 3 m/Stunde) auf alle Stufen des Reinigungsprozesses (Beladung, Waschen, Elution) angewandt werden konnten, was für Pilotanlagenprozesse und Prozesse im technischen Maßstab von Vorteil ist.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung von Chymosin, bei dem man:
  - (i) eine wäßrige Flüssigkeitsprobe bereitstellt, die Chymosin und ein eine Basismatrix und mehrere fest gebundene Liganden, die zur Bindung von Chymosin befähigt sind, umfassendes Trennmedium enthält,
  - (ii) die Matrix unter Bedingungen mit der Probe in Berührung bringt, welche die Bindung von Chymosin an die Matrix erlauben, und
  - (iii) Chymosin von der Matrix desorbiert,**dadurch gekennzeichnet**, daß die Matrix hydrophil ist und es sich bei den Liganden in den mehreren Liganden um Kohlenwasserstoffgruppen mit vorzugsweise drei, vier oder fünf Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt vier Kohlenstoffatomen, wobei alle Kohlenstoffatome  $sp^3$ -hybridisiert sind, mit einem in einer oder mehreren Positionen in mindestens einer der Kohlenwasserstoffgruppen zwischen zwei Kohlenstoffatomen eingeschobenen Ether-Sauerstoff (-O-) oder Thioether-Schwefel (-S-), wobei das Verhältnis der Summe von Schwefel- und Sauerstoffatomen zur Zahl der Kohlenstoffatome in jeder Kohlenwasserstoffgruppe  $< 1$  ist, und gegebenenfalls ein Wasserstoffatom in einer oder mehreren Positionen in mindestens einer der Kohlenwasserstoffgruppen durch eine Hydroxygruppe ersetzt ist, handelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jede der Kohlenwasserstoffgruppen eine nur Wasserstoffatome und  $sp^3$ -hybridisierte Kohlenstoffatome enthaltende  $C_{1-12}$ -Alkylgruppe und vorzugsweise eine  $C_{3-10}$ -Alkylgruppe umfaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlenwasserstoffgruppen über ein unter Ether-Sauerstoff und Thioether-Schwefel ausgewähltes Heteroatom, das Teil der Basismatrix ist, direkt an die Basismatrix gebunden sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß jede der Kohlenwasserstoffgruppen über einen Spacer, der
  - (a) eine Länge von einem oder mehr Atomen und
  - (b) eine bivalente funktionelle Gruppe
 aufweist, an die Basismatrix gebunden ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Spacer eine oder mehrere unter (a) geraden, verzweigten oder cyclischen bivalenten Kohlenwasserstoffgruppen, in denen gegebenenfalls ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Hydroxy oder Niederalkoxy ersetzt sind, (b) bivalentes Amid, (c) Ether, (d) Thioether und (e) bivalenter Ester ausgewählte Strukturen umfaßt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert während Schritt (ii) etwa gleich dem pI-Wert von Chymosin ist oder darunter liegt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Chymosin rekombinant hergestellt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Chymosin aus dem Magen eines Säugetiers erhalten worden ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix in Form von porösen Perlen oder in Form eines porösen Monoliths vorliegt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–9, dadurch gekennzeichnet, daß die Basismatrix in Form von Perlen vorliegt, die in Schritt (ii) ein gepacktes Bett oder ein Wirbelbett bilden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um ein chromatographisches oder diskontinuierliches Adsorptionsverfahren handelt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10–11, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Poren der Basismatrix so hydrophil sind, daß die wäßrige Flüssigkeit in die Poren eindringen kann.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–12, dadurch gekennzeichnet, daß die Basismatrix auf einem gegebenenfalls vernetzten und vorzugsweise unter Polysacchariden, wie Agarose, Dextran, Stärke, Cellulose, Pullulan usw. ausgewählten Polyhydroxypolymer basiert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–13, dadurch gekennzeichnet, daß die Basismatrix, der Ligand und der Substitutionsgrad so aufeinander abgestimmt sind, daß eine Chymosin-Ausbeute in den Schritten (ii)–(iii) von mindestens 85%, bezogen auf die in Schritt (ii) eingesetzte Chymosin-Gesamtmenge, und eine Reinheit gemäß HPLC-SEC-Analyse von mindestens 90% möglich ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen