



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1572 43

Int.Cl.³ 3(51) A 61 K 39/09
C 12 N 1/20

MT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

1) WP A 61 K/ 2283 806 (22) 18.03.81 (44) 27.10.82

- 1) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN;DD;
 2) GERLACH, DIETER, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.;
 KOEHLER, WERNER, OMV PROF. DR. DR. MED. RER. NAT.; DD;
 3) siehe (72)
 4) ADW DER DDR, PATENTBUERO, 6900 JENA, BEUTENBERGSTR. 11

4) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON ERYTHROGENEN TOXINEN (SCHARLACHTOXINEN)

7) Das Verfahren zur Gewinnung erythrogener Toxine verfolgt die Aufgabe, aus Kulturfiltraten β -haemolisierender Streptokokken die gebildeten erythrogeneren Toxine (Scharlachtoxine) zu gewinnen. Die Aufgabe wird folgendermaßen gelöst. Die Toxine werden durch Einruehren von saureaktiviertem Magnesiumsilikat bei hoher Ionenstärke oder niedrigen pH-Werten an das Silikat gebunden und mechanisch vom Kulturfiltrat abgetrennt. Nach einer Waschung mit Wasser werden die Toxine durch Elution mit Natriumkarbonatlösung bei hohen pH-Werten vom Silikat eluiert. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat wird das Roh toxin gewonnen. Nach dessen Auflösen in Wasser erfolgt die Feinreinigung in drei Schritten: Fällung mit frisch hergestelltem Calciumphosphatgel, Konzentrierung mittels Ammoniumsulfatfällung und stufenweiser Chromatographie an Carboxymethylionenaustauscher (CM-Sepharose). Die Absorption erfolgt bei pH = 5,0 (0,02 M Acetat). Eluiert wird das gereinigte Toxin mit 0,05 M Acetatpuffer (pH = 5,2) als scharfer Gipfel.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Gewinnung von erythrogeneren Toxinen (Scharlachtoxinen)

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung erythrogener Toxine in großer Reinheit. Erythrogene Toxine werden von Streptokokken der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*) gebildet und sind Ursache der typischen Hautrötung bei Scharlacherkrankungen. Die Symptomatologie des Scharlachs ist darüberhinaus durch die Toxinwirkung und die Bildung von Antitoxin charakterisiert. Frühere Versuche zur Scharlachtherapie waren demzufolge auch durch aktive Immunisierungsversuche oder passive Serumtherapie (vgl. H. Schmidt, Grundlagen der spezifischen Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionskrankheiten, Berlin 1940, S. 1027-1038) gekennzeichnet, wobei allerdings nur teilgereinigte Präparate zur Verfügung standen und somit Nebenwirkungen nicht ausblieben (vgl. Topley und Wilsons, Principles of Bacteriology and Immunology, Hrsg. G. S. Wilson und A. A. Miles, Edward Arnold Ltd. London 1955, Bd. 2, S. 1669-1672).

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher bekannte Reinigungsvorschriften beruhen auf der Fällung von Kulturfiltraten mit vier Volumina Äthanol und dem Ausnutzen der Löslichkeit bei pH = 4 (vgl. Y. B. Kim und D. W. Watson, A purified group A streptococcal pyrogenic exotoxin, physicochemical and biological properties including the enhancement of susceptibility to endotoxin lethal shock, J. Exp. Med. 131 (1970) 611-628). Abgesehen davon, daß mit dieser Methode keine Abtrennung der großen Hyaluronsäuremengen möglich ist und auch

kein Reintoxin gewonnen wird, ist durch die großen Alkoholmengen für die Fällungsschritte die Menge an aufarbeitbaren Kulturfiltrates beschränkt. Eine technische Anwendung wäre nur unter großen Schwierigkeiten denkbar.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet als Ziel die Gewinnung von erythrogeneren Toxinen (Scharlachtoxinen).

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem hochgereinigte erythrogeneren Toxine gewonnen werden können.

Es wurde gefunden, daß die unter normalen Bedingungen nicht mögliche Adsorption von erythrogeneren Toxinen an säureaktiviertes Magnesiumsilikat gelingt, wenn zum neutralen Kulturfiltrat 60 g/Liter Kochsalz zugesetzt werden oder wenn ohne Kochsalzzusatz die Adsorption im sauren pH-Bereich (pH 3 bis 6, vorzugsweise 3,5) ausgeführt wird. Aus dem mechanisch abgetrennten Adsorbat kann das Toxin nach Wäsche mit Wasser mit Pufferlösung bei pH von 9,5 bis 10 leicht eluiert werden. Auf diese Weise gelingt die sonst sehr schwierige Abtrennung der Hyaluronsäure. Damit wird eine Weiterreinigung erst möglich. Nach Konzentrierung des Eluats durch Fällen mit Ammoniumsulfat (500 g/l) und Lösen in Wasser wird durch Einrühren von Calciumchlorid und Dinatriumhydrogenphosphatlösung (pH über 7) durch das entstehende Calciumphosphat ein Großteil Fremdstoffen entfernt. Die Calciumphosphatabsorption wird einmal wiederholt. Nach Konzentrierung durch Ammonsulfatfällung erfolgt eine Feinreinigung durch stufenweise Fraktionierung an Carboxymethylionenaustauschern, bevorzugt Carboxymethylsepharose. Damit läßt sich in wenigen einfachen und reproduzierbaren Schritten ein hochgereinigtes Toxin gewinnen.

Ausführungsbeispiele

An Ausführungsbeispielen soll das Verfahren näher erläutert werden.

Beispiel 1

50 Liter Streptokokkenkultur mit 5 mg/l Toxin werden nach beendeter Fermentation durch Zusatz von 250 ml 30%igem Wasserstoffperoxid unter Rührung (eine Stunde) abgetötet. Die Streptokokken werden abzentrifugiert und zum Kulturfiltrat werden 3 kg feuchtes, aktiviertes Silikat, vorzugsweise Florisil, und 3 kg Kochsalz eingerührt. Nach zwei Stunden läßt man absitzen und gießt den Überstand ab. Das Florisil wird mit etwa 5 Litern Wasser gewaschen und anschließend mit 5 Litern 1 % Natriumkarbonatlösung bei pH = 9,5 extrahiert. Man erhält 150 bis 200 mg Rohtoxin, welches weiter gereinigt wird, indem man zu 5 Liter Rohtoxinlösung 2,5 kg Ammonsulfat zufügt und nach dem Auflösen über Nacht bei 4 °C stehen läßt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgetrennt und in 250 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 2 g CaCl_2 (wasserfrei) zugesetzt und unter Rühren bei einem kontrollierten pH von 7 bis 8 wird durch Zusatz von 4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in Wasser gelöst, gefällt. Das ausgefallene Phosphatgel wird abgetrennt. Durch eine anschließende, in gleicher Weise ausgeführte Calciumphosphatfällung erhält man eine klare Toxinlösung (etwa 300 ml). Aus ihr wird mit Ammonsulfat (75%ige Sättigung) das Rohmaterial gefällt. Nach Lösen in 0,02 M Acetatpuffer (pH = 5,0) wird gegen den gleichen Puffer intensiv dialysiert. Der ausgefallene Niederschlag wird abgetrennt und die erhaltene Lösung auf eine Carboxymethyl-Ionenaustauschsäule, vorzugsweise CM-Sepharose CL6B, die mit gleichem Puffer äquilibriert war, aufgetragen. Durch Waschen mit 0,02 M Acetatpuffer bis zur Extinktion 0 (280 nm) wird der größte Teil der Verunreinigungen entfernt. Das Toxin kann nach Pufferwechsel mit 0,05 M Acetatpuffer (pH = 5,2) als scharfer Gipfel sauber eluiert werden. Von 150 mg Rohtoxin erhält man etwa 75 mg Reinprodukt.

Beispiel 2

50 Liter Streptokokkenkultur werden durch Zugabe konzentrierter Salzsäure auf pH = 3,5 gebracht und zur Abtötung der Streptokokken eine Stunde gerührt. Anschließend werden die Kokken ohne Änderung des pH-Wertes abzentrifugiert. Zum sauren Kulturfiltrat rührt man 3 kg säureaktiviertes feuchtes Florisil ein

und läßt nach 2 Stunden absitzen. Der Überstand wird abgossen, das Florisil mit Wasser gewaschen und mit 5 Litern 1%iger Natriumcarbonatlösung bei pH = 9,5 eluiert. Man erhält etwa 150 mg Toxin. Die Reinigung erfolgt wie im Beispiel 1 beschrieben.

Die Vorteile dieses Verfahrens sind:

Es wird in einfacher Weise eine Konzentrierung von Toxin möglich. Es kann im technischen Maßstab gearbeitet werden, ohne daß durch die Verwendung großer Mengen organischer Lösungsmittel besondere Sicherheitsmaßnahmen nötig werden. Die Konzentrierung bedingt gleichzeitig eine Vorreinigung und die fast vollständige Abtrennung der sonst praktisch kaum entfernbaren hochviskosen Hyaluronsäure, deren Anwesenheit eine Weiterreinigung äußerst erschwert. Die Feinreinigung wird in relativ kleinem Volumen möglich. Das angewandte Reinigungsverfahren erfordert keine aufwendigen Geräte, ist sehr schnell durchführbar und zudem auch billig. Die erhaltenen Toxine sind bei Prüfung durch Natriumdodecylsulfatelektrophorese in Polyacrylamidgel praktisch frei von Verunreinigungen.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Gewinnung von erythrogenen Toxinen aus Streptokokkenkulturfiltraten, gekennzeichnet dadurch, daß

in eine fermentierte Streptokokkenkultur mit oder ohne Abtötung der Keime und deren Abtrennung Magnesiumsilikat bei hoher Ionenstärke (vorzugsweise 60 g/l Kochsalz) oder niederem pH-Wert 3 bis 6, (vorzugsweise 3,5) eingerührt wird,

das an Silikat gebundene Toxin von Kulturfiltrat mechanisch abgetrennt wird und das Toxin durch Rühren mit Puffern bei hohem pH-Wert (vorzugsweise 9,5 bis 10) als Roh toxin eluiert und mit Ammoniumsulfat 500 g/l gefällt wird,

zur Reinigung das in Wasser gelöste Roh toxin zweimal mit frisch präpariertem Calciumphosphatgel absorbiert und mit Ammonsulfat konzentriert wird,

eine stufenweise Chromatographie an Kationenaustauschern (vorzugsweise Carboxymethylsepharose) als Feinreinigung durchgeführt wird, wobei die Absorption und Wäsche bei niederer Ionenstärke (vorzugsweise 0,02 M Acetat, pH = 5,0) und die Elution bei leicht erhöhter Ionenstärke (vorzugsweise 0,05 M, pH = 5,2) durchgeführt wird.