



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

204 944

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 9/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2397 132

(22) 10.05.82

(44) 14.12.83

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR; DD;

(72) BUETTNER, WERNER, DR. RER. NAT. CHEM.; KRAEFT, URSULA;
ETZOLD, GERHARD, PROF. DR. HABIL. DIPL.-CHEM.; DD;

(73) siehe (72)

(74) FZ F. MOLEKULARBIOL. U. MEDIZIN AG PATENT- U. NEUERERW. 1115 BERLIN-BUCH
LINDENBERGER WEG 70/1

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PROTEASEFREIER GLUCOSEOXIDASE

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Herstellung proteasefreier Glucoseoxidase (GOD) aus GOD-Rohprodukten. Das Ziel der Erfindung besteht in einer einfachen Abtrennung von Proteasen aus GOD-Rohpräparaten durch spezifische Adsorption der Proteasen aus der wässrigen Enzymlösung. Erfindungsgemäß werden für die Adsorption der Proteasen trägerfixierte Proteaseinhibitoren verwendet. Beispielsweise sind für die Abtrennung der proteolytischen Beimengungen aus GOD, die von *Penicillium notatum* gebildet wird, Proteaseinhibitoren mit Polypeptidstruktur wie Ovomucoid, Aprotinin und Proteaseinhibitoren aus Sojabohnen oder Kartoffeln geeignet. Diese Substanzen führen in Roh-GOD-Lösungen zur Inhibierung der Proteasen und sind nach Kopplung an Polysaccharidträger, wie Dextran, Cellulose, Agarose oder Polymethacrylatträger (Spheron), zur affinitätschromatographischen GOD-Reinigung einsetzbar. Die Kopplung der Proteaseinhibitoren und die Konzentrierung und Trocknung der proteasefreien GOD erfolgt nach bekannten Methoden. Die affinitätschromatographischen Adsorbentien sind nach Elution der gebundenen Proteasen mit sauren Pufferlösungen wiederverwendbar.

Dr. W. Büttner

U. Kräft

Prof. Dr. G. Etzold

239713 2

"Verfahren zur Herstellung proteasefreier Glucoseoxidase"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die affinitätschromatographische Reinigung von Glucoseoxidaserohprodukten unter Einsatz immobilisierter Proteaseinhibitoren.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Glucoseoxidase (GOD) wird auf mikrobiellem Wege vorwiegend aus den Species *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* und *Penicillium vitale* gewonnen. Das Enzym GOD findet vielfältige praktische Anwendung, z. B. zur Entfernung von Glukose und Sauerstoff, zur Darstellung von Glukonsäure und zum analytischen Nachweis ihrer Substrate über das entstehende Wasserstoffperoxid. Auch die Immobilisierung von GOD hat zu neuen Einsatzmöglichkeiten in der Biotechnologie und Analytik, z. B. zur routinemäßigen elektrochemischen Blutzuckerbestimmung mit GOD-Membranelektroden, geführt. Die meisten handelsüblichen GOD-Präparate werden unter Anwendung herkömmlicher Fraktionierungsmethoden, wie Salz- und Acetonfällung, aus den Kulturfiltraten oder Zellextrakten hergestellt. Je nach dem Reinigungsaufwand werden Präparate recht unterschiedlicher Qualität bezüglich Salzgehalt und spezifischer Aktivität erhalten. In der Regel lassen sich in solchen GOD-Chargen noch andere enzymatisch aktive Komponenten, insbesondere Proteasen, nachweisen. Diese Proteasebeimengungen können beim Einsatz der GOD Störungen verursachen und den Anwendungsbereich derartiger Präparate stark einschränken. Ferner können sie durch ihre proteinspaltende Wirkung während des Reinigungsprozesses die Ausbeute an GOD verringern und später die Lagerstabilität des Präparates herabsetzen.

GOD hoher Reinheit kann durch Anwendung chromatographischer Verfahren gewonnen werden, wobei meist mehrere Säulentrennungen mit unterschiedlichen Trägern notwendig sind. Beispielsweise ist durch Chromatographie an schwach sauren und/oder schwach basischen Ionenaustauschern sowie Gelchromatographie ein elektrophoretisch einheitliches Produkt erhältlich (B. E. P. Swoboda und V. Massey, J. Biol. Chem. 240 (1965) 2209; J. Kucera und J. Hanus, J. Appl. Chem. Biotechnol. 21 (1971) 347; M. K. Weibel und H. J. Bright, J. Biol. Chem. 246 (1971) 2734; V. P. Bogdanov et al., Biochimija 39 (1974) 771).

Diese chromatographischen Reinigungsverfahren sind jedoch sehr aufwendig. Für viele Anwendungszwecke wie auch zur Stabilitätserhöhung des Präparats ist es in der Regel aber ausreichend und wesentlich ökonomischer, durch spezifische und billige Trennmethode nur die jeweils störende enzymatische Komponente abzutrennen oder sie zu inaktivieren.

Die Beseitigung proteolytischer Aktivitäten ist prinzipiell durch Zusatz von Inhibitoren oder eine differenzierte thermische Denaturierung möglich. Im Falle des Inhibitorzusatzes kann die Anwesenheit einer weiteren Fremdschubstanz im Präparat jedoch zu unerwarteten und unerwünschten Nebenwirkungen führen. Der Nachteil der thermischen Proteaseinaktivierung besteht darin, daß dieser Prozeß unspezifisch ist und die Bedingungen für eine hinreichende Proteaseschädigung ohne Beeinträchtigung der GOD in Abhängigkeit von der Chargenzusammensetzung schwanken können und damit schwer zu beherrschen sind.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines einfach durchführbaren und ökonomischen Verfahrens zur Entfernung von proteolytisch wirkenden Enzymen aus GOD-Rohpräparaten unter Verwendung leicht zugänglicher Adsorbentien.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß die proteolytische Aktivität in GOD-Chargen durch Inhibitoren, die eine Polypeptidstruktur besitzen, stark gehemmt wird und daß die in der GOD enthaltenen Proteasen auch mit entsprechenden immobilisierten Inhibitoren einen festen Komplex bilden. Diese Fähigkeit wurde an einer ganzen Reihe von Proteasehemmstoffen, wie Ovomucoid aus Hühnereisweiß, Aprotinin aus Rinderlunge, Sojabohnentrypsininhibitor und Proteaseinhibitor aus Kartoffeln nachgewiesen.

Die vorliegende Erfindung zur Abtrennung von proteolytischen Enzymen aus GOD-Rohprodukten ist dadurch gekennzeichnet, daß wäßrige Lösungen des Präparats mit immobilisierten Proteaseinhibitoren in Kontakt gebracht werden. Die GOD-Lösung wird nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie über eine Säule mit immobilisiertem Proteaseinhibitor gegeben und das nahezu proteasefreie Eluat anschließend lyophilisiert oder die Bindung erfolgt im Batch-Verfahren, wobei die Proteaseabtrennung mit geringem Zeitaufwand zu erzielen ist. Die Umsetzung wird in einem Temperaturbereich von 0 - 30°C und bei pH-Werten von 4,0 bis 7,0 durchgeführt.

Vor dem Lyophilisieren können auch geeignete Methoden zur Konzentrierung der Enzymlösung, wie Fällung mit Salzen oder Ultrafiltration angewendet werden. Als Trägermaterial für die Kopplung der Proteaseinhibitoren werden sowohl natürliche als auch synthetische Polymere, vorzugsweise Polysaccharide und Polymethacrylate (Agarose, Dextran, Cellulose oder Spheron) eingesetzt. Zur Aktivierung der Matrix und der Kopplung der Proteaseinhibitoren werden die hinlänglich bekannten Methoden wie Aktivierung mit Bromcyan oder Carbonyldiimidazol, das Epoxidverfahren oder die Proteinbindung durch N-hydroxysuccinimidester (C. R. Lowe, An introduction to affinity chromatography, Amsterdam 1979) und andere angewendet.

Ein besonderer Vorzug des Verfahrens besteht darin, daß nach der Behandlung der GOD-Lösung mit dem trägerfixierten Inhibitor der abgetrennte Protease-Hemmstoff-Komplex beispielsweise

mit Formiatpuffer, 1 M NaCl, pH 3.1, ohne Schädigung des Inhibitors wieder zerlegt und der ligandierte Träger erneut verwendet werden kann.

Handelsübliche GOD-Präparate mit einem Proteingehalt von 20 bis 55 % sind in Wasser oder neutralen Pufferlösungen geringer Ionenstärke (0.01 - 0.05 M) bis zu einer Konzentration von maximal 250 mg/ml löslich. Eine Dialyse zur Abtrennung von Salzen, die aus dem Herstellungsprozeß der GOD stammen, ist vor der Behandlung mit den Proteaseinhibitoren nicht erforderlich. Die GOD-Konzentration der Lösung hat bei ausreichender Kapazität des Affinitätssträgers keinen Einfluß auf das Trennergebnis, jedoch empfiehlt sich bei der säulenchromatographischen Proteaseentfernung aus praktischen Gründen die Verwendung möglichst hoch konzentrierter Lösungen, da dann die Elution der GOD aufgrund ihrer Eigenfarbe mit bloßem Auge verfolgt werden kann.

Da das beschriebene Verfahren auch auf verdünnte Lösungen anwendbar ist und durch andere Beimengungen nicht gestört wird, kann die weitgehende oder vollständige Entfernung der proteolytisch wirkenden Komponenten schon zu Beginn der Aufarbeitung des Kulturfiltrats erfolgen und dadurch sowohl eine zusätzliche Verunreinigung des Ansatzes mit Proteinabbauprodukten eingeschränkt als auch die GOD-Ausbeute erhöht werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

100 ml feuchte, auf der Fritte abgesaugte CNBr-aktivierte Sepharose 4 B werden mit einem eiskalten Gemisch von 0.1 M NaHCO_3 und 0.5 M NaCl, pH 8.3, gewaschen und in 100 ml dieser Lösung, die 1 g Ovomucoid enthält, 24 Stunden bei Kühlraumtemperatur umgesetzt. Zur Blockierung nicht umgesetzter aktiver Gruppen wird die Sepharose mit 0.1 M Äthanolamin in Pufferlösung, pH 8.3, 12 h in der Kälte geschüttelt. Nach dem Waschen mit einer Mischung von 0.1 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl und 0.05 M Natriumacetatpuffer, pH 4.5 sowie 0.1 M Essigsäure

wird die Ovomucoid-Sepharose in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.0, übergeführt. Ca. 75 % des eingesetzten Ovomucoids werden am Träger gebunden (7.5 mg Ovomucoid/ml Sepharose). 25 ml Ovomucoid-Sepharose werden in einer Säule mit reichlich 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.0, gewaschen. 100 mg GOD-Rohpräparat (Proteingehalt 55 %, spezifische GOD-Aktivität 75 U/mg Protein, bestimmt nach H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse 2. Aufl., Bd. 1, S. 416, Berlin 1970), gelöst in 1 ml dieses Phosphatpuffers werden auf die Säule aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Die GOD-haltigen Fraktionen umfassen ein Volumen von 7.5 ml. Mit Hämoglobin als Substrat ist nur noch etwa 1/6 der ursprünglich vorhandenen proteolytischen Aktivität nachweisbar. Nach Dialysieren und Lyophilisieren werden 82 mg gereinigte GOD mit einer spezifischen Aktivität von 78 U/mg erhalten.

Beispiel 2

20 ml feuchte, auf der Fritte abgesaugte CNBr-aktivierte Sepharose 4 B wird mit 200 ml eines eiskalten Gemischs von 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.1, und 0.5 M NaCl gewaschen und in 40 ml der gleichen Pufferlösung, die 100 mg Aprotinin enthält, suspendiert. Nach 36-stündigem Schütteln bei 5°C wird mit dem zur Kopplung verwendeten Puffer gewaschen und das Gel in eine Säule gefüllt.

Nach Auftragen von 0.1 ml GOD-Lösung, die 10 mg Rohpräparat enthält, wird mit 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.0, eluiert. Die im Ausschlußvolumen der Säule erscheinenden GOD-Fraktionen werden gesammelt und auf proteolytische Aktivität geprüft. Mit Hämoglobin als Substrat wird noch etwa 1/10 der im Ausgangsprodukt vorhandenen Proteaseaktivität gefunden. Die weitere GOD-Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 3

10 g Ovomucoid-Sepharose, hergestellt wie unter Beispiel 1, werden mit 0.05 M Phosphatpuffer, pH 5.5, äquilibriert, mit

einer Lösung von 2 g GOD-Präparat in 20 ml Puffer vermischt und 60 min. bei 4°C geschüttelt. Nach vorsichtigem Zentrifugieren im Siebbecher wird der Affinitätsträger in 20 ml 0.01 M Phosphatpuffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Dialyse der vereinigten Zentrifugate gegen 0.001 M Phosphatpuffer, pH 7.0, und Lyophilisieren wird Glucose-oxidase erhalten, in der ca. 1/10 der ursprünglichen proteolytischen Aktivität nachweisbar ist. Zur Regenerierung wird der proteasebeladene Affinitätsträger in eine Chromatographiesäule gefüllt und mit 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.5, gewaschen, bis die Extinktion des Eluates bei 280 nm 0.01 ist. Durch anschließende Elution mit einer Mischung von 0.1 M Na-Formiatpuffer, pH 3.1, und 1 M KCl lassen sich die Proteasen vom Träger ablösen und in den neutralisierten Fraktionen des Proteinpeaks nachweisen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Abtrennung von Proteasen aus Glucoseoxidasepräparaten, dadurch gekennzeichnet, daß wäßrige Lösungen der zu reinigenden Glucoseoxidase mit immobilisierten Proteaseinhibitoren bei Temperaturen von 0 - 30°C und pH-Werten von 4.0 - 7.0 über eine Säule oder im Batch-Verfahren in Kontakt gebracht, die entstandenen immobilisierten Protease-Inhibitoren-Komplexe in der Trennsäule verbleiben oder durch Filtration abgetrennt werden und die Glucoseoxidase durch übliche Fällungsmethoden oder Lyophilisation isoliert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß Proteaseinhibitoren mit Proteincharakter, wie Ovomuroid, Aprotinin bzw. Proteaseinhibitoren aus Sojabohnen und Kartoffeln, verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Umsetzung die immobilisierten Proteaseinhibitoren durch Behandlung mit sauren Puffern, wiederverwendbar gemacht werden.