

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

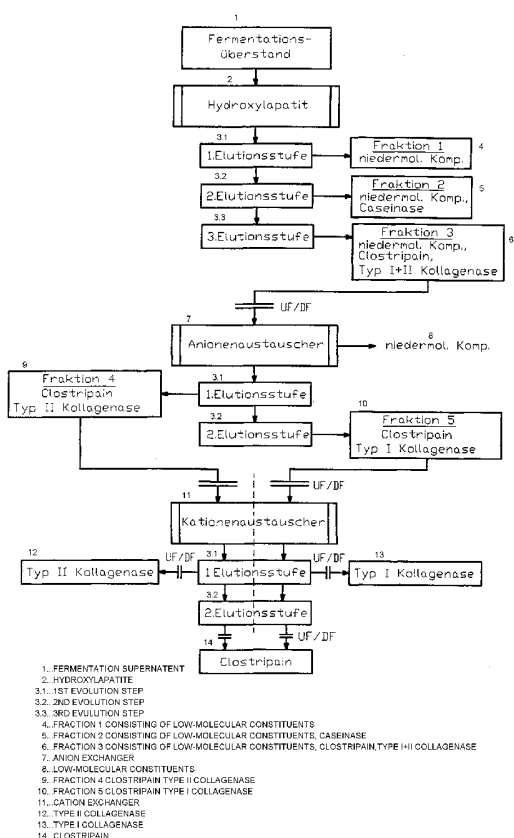
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/004628 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 9/00** (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **NORDMARK ARZNEIMITTEL GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Pinnuallee 4, 25436 Uetersen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06021
- (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Juni 2002 (01.06.2002) (72) **Erfinder; und**
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **KURFÜRST, Manfred** [DE/DE]; Kirchenstrasse 24, 25436 Moorrege (DE). **SCHMIDBAUER, Stefan** [DE/DE]; Am Hofacker 35, 35094 Lahntal (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (74) **Anwälte:** **RICHTER, Joachim** usw.; Neuer Wall 10, 20354 Hamburg (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:
101 31 994.0 2. Juli 2001 (02.07.2001) DE (81) **Bestimmungsstaaten** (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, 101 34 347.7 14. Juli 2001 (14.07.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR PURIFYING AN ENZYME, A PURIFIED ENZYME PRODUCED THEREBY, AND USE OF THIS ENZYME

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR AUFREINIGUNG EINES ENZYMS UND HIERNACH HERGESTELLTES, AUFGEREINIGTES ENZYM SOWIE VERWENDUNG DES ENZYMS



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for purifying at least one enzyme contained in a fermentation supernatant of *Clostridium histolyticum*. According to the invention, the enzymes of the fermentation supernatant are separated by a multi-step chromatographic method involving the exclusive use of chromatographic materials based of styrene/divinylbenzene and/or based on, in particular, ceramic hydroxylapatite.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung mindestens eines in einem Fermentationsüberstand von *Clostridium histolyticum* enthaltenen Enzyms. Es ist vorgesehen, dass die Enzyme des Fermentationsüberstandes durch ein mehrstufiges Chromatographieverfahren unter ausschließlicher Verwendung von Chromatographiematerialien auf Styrol/Divinylbenzolbasis und/oder auf Basis von, insbesondere keramischem, Hydroxylapatit aufgetrennt werden.

WO 03/004628 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Aufreinigung eines Enzyms und hiernach hergestelltes, aufgereinigtes Enzym sowie Verwendung des Enzyms

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung mindestens eines in einem Fermentationsüberstand von *Clostridium histolyticum* enthaltenen Enzyms und ein hiernach hergestelltes, aufgereinigtes Enzym sowie seine Verwendung.

Stand der Technik

Das Bakterium *Clostridium histolyticum* bildet bei Kultivierung in peptonhaltigem Nährmedium extrazellulär ein komplexes Enzymgemisch, das Kollagenasen, verschiedene proteolytische Enzyme sowie niedermolekulare Bestandteile enthält. Als Hauptbestandteile wurden Typ I und Typ II Kollagenasen (Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3) mit Molekulargewichten im Bereich von 65 bis 125 kD und isoelektrischen Punkten zwischen 5 und 6,5 beschrieben (Bond, van Wart; Biochemistry, 1984, 23, 3077-3085). Weitere Hauptbestandteile sind die als Heterodimer vorkommende SH-Protease Clostripain (Clostridiopeptidase B, EC 3.4.22.8) mit einem Molekulargewicht von zirka 59 kD und die schlecht charakterisierte so genannte neutrale Protease (Caseinase) mit einem mittels MALDI-TOF bestimmten Molekulargewicht von 34,5 kD.

Kollagenasen sind Enzyme, die Peptidbindungen des Faserproteins Kollagen spalten. Sie finden biochemische und medizinische Anwendung, beispielsweise um Zellen oder Zellverbände von Geweben zu isolieren. Typ I und Typ II Kollagenasen unterscheiden sich in ihrer Aktivität hinsichtlich hochmolekularem Kollagen und kleinen synthetischen Substra-

ten. Während Typ I Kollagenasen bevorzugt hochmolekulares Kollagen spalten, reagieren Typ II Kollagenasen vorwiegend mit synthetischen Substraten, wie zum Beispiel PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Wünsch, Heidrich; Z. Physiol. Chem. 333, 1963, 149-151), His-Pro (Nordwig, Wünsch; Z. Physiol. Chem. 316, 1959, 287) oder Phe-Ala-Leu-Gly-Pro-Ala (van Wart, Steinbrink; Anal. Biochem. 113, 1981, 356-365). Beide Kollagenasetypen lassen sich auch mittels reversed phase Chromatographie (RPC) eindeutig unterscheiden.

Die US 5,332,503 beschreibt ein Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Kollagenase aus *Clostridium histolyticum*. Dieses Chromatographieverfahren umfasst unter anderem einen Gelfiltrationsschritt sowie eine Farbstoff-Liganden-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Reaktivrot-Agarosegel. Das Verfahren weist entscheidende Nachteile auf, um Kollagenase für pharmazeutische Zwecke unter GMP-konformen Bedingungen herzustellen. So birgt das im Prozess verwendete Reaktivrot-Agarosegel die Gefahr eines so genannten Ausblutens des Chromatographiematerials und einer damit verbundenen toxikologischen Problematik. Des Weiteren sind Gelfiltrationsschritte grundsätzlich zeitaufwendig und kostspielig und bieten wenig effektive cleaning-in-place (CIP) Möglichkeiten. Dies erschwert den Einsatz dieses Verfahrens im großtechnischen Maßstab. Ferner erfordert das Verfahren die Verwendung von Detergentien, wodurch ein hoher Aufwand zur Reinigungsvalidierung notwendig wird und unerwünschte Veränderungen des Endproduktes hervorgerufen werden können. Schließlich erlaubt das Verfahren keine Trennung der Typ I und Typ II Kollagenasen.

Aus den Dokumenten US 5,830,741 und US 5,952,215 ist ein Aufreinigungsverfahren zur Trennung von Typ I und Typ II Kollagenase bekannt, das eine Farbstoff-Liganden-Affinitätschromatographie, eine Kationenaustauschchromatographie und eine Anionenaustauschchromato-

graphie umfasst. Auch hier ist die Gefahr des Ausblutens des in der Affinitätschromatographie eingesetzten Farbstoffes gegeben. Ferner erlauben die verwendeten Chromatographiematerialien nur verhältnismäßig geringe Flussraten. Zudem erfolgen alle chromatographischen Schritte mittels Gradientenelution, wobei die an den Chromatographiematerialien gebundenen Enzyme durch lineare Salzkonzentrations- und/oder pH-Gradienten eluiert werden. Im Resultat ist das bekannte Verfahren daher äußerst zeitaufwendig.

Aufgabe, Lösung, Vorteil

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Trennung und Aufreinigung mindestens eines extrazellulären Hauptzyms von *Clostridium histolyticum* bereitzustellen, das die beschriebenen Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den im Anspruch 1 genannten Merkmalen gelöst. Dadurch, dass die Enzyme des Fermentationsüberstandes von *Clostridium histolyticum* durch ein einstufiges oder bevorzugterweise mehrstufiges Chromatographieverfahren unter ausschließlicher Verwendung von Chromatographiematerialien auf Styrol/Divinylbenzolbasis und/oder auf Basis von keramischem Hydroxylapatit aufgetrennt werden, lässt sich eine sehr schnelle und kostengünstige Enzymaufreinigung realisieren, wobei Enzyme mit hoher Reinheit erhalten werden, die aufgrund einer Abwesenheit toxikologisch bedenklicher Substanzen insbesondere für den Einsatz in der Pharmazie und/oder Biochemie geeignet sind. Dieses Verfahren kommt ohne produktberührende Schritte aus, was den Einsatz im Pharmaziebereich besonders vorteilhaft macht. Es kann zur Herstellung von sterilen Kollagenaseenzymen genutzt werden. Dabei wird unter Styrol/Divinylbenzol ein Copolymerisat verstanden, das aus mit Divinylbenzol quervernetztem Polystyrol besteht. Durch

Substitution dieser Basismatrix mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen wird eine Bindung von Proteinen an das Material und somit ihre Trennung ermöglicht. Abhängig von der Wahl der funktionellen Gruppe können unterschiedliche Bindungs- und Trennungsmechanismen, beispielsweise Kationen- oder Anionenaustauschmechanismen, genutzt werden. Hingegen handelt es sich bei Hydroxyapatit um ein Kalziumphosphat der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, das eine Proteinbindung aufgrund ionischer elektrostatischer Wechselwirkungen sowie einer stärkeren ionischen Komplexbindung gestattet. Im Detail ist der Bindungsmechanismus von Proteinen an Hydroxylapatit bislang jedoch noch nicht verstanden.

Die verwendeten Chromatographiematerialien gestatten die Einstellung von hohen Flussraten bei guten Trenneigenschaften, so dass sich sehr kurze Aufreinigungszeiten ergeben. Dies gilt insbesondere, wenn gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung gesintertes, also keramisches Hydroxylapatit verwendet wird. Die Verwendung von keramischem Hydroxylapatit besitzt gegenüber nichtgesintertem (kristallinem) Hydroxylapatit den Vorteil, dass das Material reproduzierbar hergestellt werden kann und aufgrund seiner porösen Struktur nur sehr geringe Rückdrücke erzeugt, wodurch die Gefahr von Säulenbeschädigungen minimiert wird und hohe lineare Flussraten ermöglicht werden. Die Elution an gesintertem Hydroxylapatitmaterial wird vorzugsweise bei Flussraten von mindestens 200 cm/h, insbesondere von mindestens 300 cm/h, durchgeführt. Im Falle des polymeren Styrol/Divinylbenzolmaterials werden bevorzugt sogar Flussraten von mindestens 500 cm/h, insbesondere von mindestens 1000 cm/h, eingestellt. Die Prozesszeiten können auf diese Weise gegenüber bekannten Verfahren erheblich verkürzt werden.

Eine weitere Prozesszeitverkürzung sowie eine Vereinfachung des Prozessaufwandes wird erreicht, indem mindestens eine Chromatographiestufe, vorzugsweise alle Chromatographiestufen, in Form einer Stufenelu-

tion durchgeführt wird. Gegenüber einer Gradientenelution kann hierdurch ferner eine Einsparung des Elutionsmittels und damit teurer Puffersubstanzen erzielt werden. Die Generierung eines Gradienten ist im Prozessmaßstab außerdem problematisch.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden die Chromatographiematerialien derart ausgewählt, dass die einzelnen chromatographischen Schritte ausschließlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen und/oder auf Ionenbindung und/oder ionischer Komplexbindung beruhen. Besonders vorteilhaft umfasst das Verfahren mindestens eine anionenaustauschchromatische Stufe, und/oder mindestens eine kationenaustauschchromatische Stufe, und/oder mindestens eine hydroxylapatitchromatische Stufe. Besonders gute Ergebnisse wurden in einem dreistufigen Chromatographieverfahren erzielt, wobei eine erste Stufe an gesinterter Hydroxylapatitmaterial, eine zweite Stufe an einem Anionenaustauschermaterial auf Styrol/Divinylbenzolbasis und eine dritte chromatographische Stufe an einem Kationenaustauschermaterial auf Styrol/Divinylbenzolbasis durchgeführt wird, vorzugsweise in der genannten Reihenfolge, jedoch auch andere Reihenfolgen sind möglich; auch die Stufenanzahl kann variieren.

Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Verfahren somit keine zeitaufwendigen und kostenintensiven Gelfiltrationsschritte, wodurch die Gefahr eines Selbstverdaus der zu trennenden Enzyme minimiert wird. Der Verzicht auf Gelfiltrationen ermöglicht ferner die Durchführung der chromatographischen Stufen in einem weiten Temperaturbereich zwischen 4 und 25 °C, also auch bei Raumtemperatur. Ferner umfasst das Verfahren auch keine affinitätschromatographischen Stufen, so dass die Gefahr des Ausblutens, also des Auswaschens der Affinitätsliganden des Chromatographiematerials nicht besteht. Schließlich sieht das erfindungsgemäße Verfahren auch keine Proteinfällungsschritte vor, die unerwünschte

Strukturveränderungen der Proteine bewirken können. Hierdurch ergibt sich ferner der Vorteil, dass keine Detergenzien oder chaotrope Substanzen (Ammoniumsulfat, Polyethylenglycol, etc.) eingesetzt werden, deren nachträgliche Entfernung stets mit einem hohen Prozessaufwand verbunden ist.

Die verwendeten Chromatographiematerialien haben ferner den Vorteil, chemisch weitgehend inert zu sein und mit verhältnismäßig hoch konzentrierten Alkalilaugen, beispielsweise mit 3 molarer Natronlauge, gereinigt werden zu können. Dies gewährleistet eine sehr effektive Reinigung und somit einen Funktionserhalt der Materialien sowie eine gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Die hohe Druckstabilität der Chromatographiematerialien gestattet zudem den Einsatz in Hochdruck-Flüssigchromatographie-Verfahren (HPLC). Aufgrund der Abwesenheit von toxikologisch bedenklichen, verfahrensbedingten Substanzen, wie zum Beispiel Affinitätsliganden oder Detergenzien, können die erfindungsgemäß aufgereinigten Proteine, insbesondere Typ I und/oder Typ II Kollagenase und/oder Clostripain und/oder neutrale Protease (Caseinase) besonders vorteilhaft für pharmazeutische oder biochemische Zwecke eingesetzt werden.

Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den übrigen, in den Unteransprüchen genannten Merkmalen.

Die Erfindung betrifft ferner ein nach dem Verfahren aufgereinigtes Enzym gemäß der Ansprüche 30 und 31 sowie die Verwendung eines nach dem Verfahren hergestellten Enzyms gemäß Anspruch 32.

Kurzbeschreibung der Zeichnung

Im Folgenden wird die Erfindung mit Hilfe der Fig. 1 beispielhaft erläutert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung und bester Weg zur Ausführung der Erfindung

Nach erfolgter Kultivierung von *Clostridium histolyticum* in einem Fermentationsmedium tierischen oder pflanzlichen Ursprungs werden die Zellen und sonstige nichtlösliche Bestandteile beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration vom Fermentationsüberstand abgetrennt. Der Fermentationsüberstand, der als Hauptbestandteile Typ I und Typ II Kollagenasen, Clostripain und Caseinase enthält, kann vor der chromatographischen Trennung dieser Proteine in üblicher Weise aufkonzentriert werden.

Der Fermentationsüberstand wird in einem ersten Schritt des Verfahrens auf eine mit keramischem Hydroxylapatitmaterial Typ I oder Typ II (CHT) gefüllte Chromatographiesäule gepumpt, wobei die genannten Enzyme neben verschiedenen anderen Komponenten an dem Hydroxylapatit binden. Bei Temperaturen von 4 bis 25 °C und einem pH-Wert von 6 bis 9 wird mittels Stufenelution bei linearen Flussraten > 300 cm/h eluiert. Dabei eignet sich ein Phosphatpuffer, der 0 bis 1000 mM eines Alkalihalogenides enthält, wobei die Phosphatkonzentration stufenweise von 10 bis 350 mM Phosphat erhöht wird. Alternativ oder zusätzlich kann der pH-Wert des Puffers schrittweise von 6 bis 9 erhöht werden. Es werden vorzugsweise drei Elutionsstufen durchgeführt. Die in der ersten Elutionsstufe erhaltene Fraktion 1 enthält ausschließlich niedermolekulare Bestandteile. Fraktion 2 der zweiten Elutionsstufe enthält neben niedermolekularen Komponenten neutrale Protease (Caseinase). Fraktion 3 der dritten Elutionsstufe enthält ebenfalls niedermolekulare Komponenten, das gesamte Clostripain sowie sämtliche Typ I und Typ II Kollagenasen.

Fraktion 3 wird beispielsweise mittels Ultrafiltration/Diafiltration oder Nanofiltration oder Dialyse entsalzt und gegebenenfalls aufkonzentriert. Anschließend wird die entsalzte Lösung in einem zweiten chromatographischen Schritt einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Hierfür wird ein Chromatographiematerial auf Styrol/Divinylbenzolbasis verwendet, das beispielsweise mit einer quartären Ammoniumgruppe funktionalisiert ist. Dabei kann auf kommerziell erhältliche Materialien zurückgegriffen werden (zum Beispiel Source der Firma Pharmacia, POROS der Firma PerSeptive, Makroprep der Firma Biorad). Bereits bei der Beladung des Anionenaustauschers mit Fraktion 3 erfolgt eine Abtrennung kationischer oder nichtionischer, niedermolekularer Bestandteile. Die Elution der gebundenen Bestandteile erfolgt bei 4 bis 25 °C in einem gepufferten System im pH-Bereich von 7 bis 9,5 mittels Stufenelution bei einer linearen Flussrate oberhalb von 500 cm/h, wobei eine Alkali- oder Erdalkalihalogenidkonzentration von 1 bis 1000 mM und/oder der pH-Wert von 9,5 bis 6 schrittweise variiert wird. Vorzugsweise werden zwei Fraktionen getrennt, wobei Fraktion 4 der ersten Elutionsstufe Clostripain und Typ II Kollagenase und Fraktion 5 der zweiten Elutionsstufe ebenfalls Clostripain sowie Typ I Kollagenase enthält.

Fraktion 4 und Fraktion 5 werden getrennt voneinander in einer dritten chromatographischen Stufe einer Kationenaustauschchromatographie unterzogen. Dabei wird ebenfalls eine auf Styrol/Divinylbenzolmaterial basierende Säulenfüllung verwendet, welche hier jedoch mit einer Kationen bindenden Gruppe, beispielsweise SO_3H , funktionalisiert ist. Auch hier können die vorstehend genannten, kommerziellen Materialien verwendet werden. Die Elution des Kationenaustauschers wird bei 4 bis 25 °C in einem gepufferten System im pH-Bereich von 5,7 bis 7 bei linearen Flussraten von mindestens 500 cm/h mittels Stufenelution durchgeführt. Dabei wird im Elutionspuffer eine Alkali- beziehungsweise Erdalkalihalogenidkonzentration zwischen 0 und 300 mM und/oder der pH-Wert zwischen 5

und 7 schrittweise eingestellt. Die Elution wird vorzugsweise in zwei Stufen durchgeführt, wobei in der ersten Elutionsstufe die jeweilige Kollagenase und in der zweiten Elutionsstufe Clostripain erhalten wird.

Ausführungsbeispiel

Eine Kultur von *Clostridium histolyticum* wird unter Verwendung eines tierischen oder pflanzlichen Nährmediums in Flüssigkultur nach Standardmethoden bis zu einer gewünschten Zelldichte fermentiert. Nach Abtrennung der Zellen mit üblichen Methoden, beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration, werden 2000 ml des konzentrierten Fermentationsüberstandes mit einer linearen Flussrate von 300 cm/h auf eine mit 1700 ml keramischem Hydroxylapatit Typ I gefüllte Chromatographiesäule gepumpt. Die an die Hydroxylapatitsäule gebundenen Komponenten werden bei 20 bis 25 °C mit einer linearen Flussrate von 300 cm/h in drei Stufen mit Phosphatpuffer eluiert, wobei die Phosphatkonzentration schrittweise erhöht wird. In der ersten Elutionsstufe wird mit zirka 10 CV (Säulenvolumina) mit 10 mM Phosphatpuffer/100 mM NaCl eluiert, wobei die hauptsächlich niedermolekulare Bestandteile enthaltende Fraktion 1 erhalten wird. Anschließend wird mit etwa 3 CV 60 mM Phosphatpuffer/100 mM NaCl eluiert und Fraktion 2 erhalten, die Caseinase und ebenfalls niedermolekulare Komponenten enthält. Für die dritte Elutionsstufe wird mit zirka 5 CV 200 mM Phosphatpuffer/100 mM NaCl eluiert. Die hierbei gesammelte Fraktion 3 enthält die Enzyme Clostripain und sämtliche Typ I und Typ II Kollagenasen. Fraktion 2 wird entsalzt und lyophilisiert. Eine Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile von Caseinase kann gegebenenfalls mit Standardmethoden erreicht werden.

Fraktion 3 wird mittels Ultrafiltration/Diafiltration oder Nanofiltration oder Dialyse entsalzt und gegebenenfalls aufkonzentriert. Anschließend wird Fraktion 3 mit einem geeigneten Puffer, beispielsweise 500 mM Tris pH

9,0 – 9,3, auf pH 9,0 – 9,3 eingestellt. Die gepufferte Lösung wird bei 20 – 25 °C mit einer linearen Flussrate von zirka 1000 cm/h über eine als Anionenaustauscher funktionalisierte Styrol/Divinylbenzolsäule (POROS 50 PI der Firma PerSeptive) gepumpt. Anschließend wird die Säule mit zirka 5 CV Tris-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgt bei 20 – 25 °C und einer linearen Flussrate von zirka 1000 cm/h in zwei Elutionsstufen mit steigender Salzkonzentration. Fraktion 4 wird durch Elution mit 40 mM Tris Puffer/6 mM CaCl_2 /30 mM NaCl pH 9,0 – 9,3 erhalten und enthält die Enzyme Clostripain und Typ II Kollagenase. Fraktion 5, die ebenfalls Clostripain sowie Typ I Kollagenase enthält, wird in der zweiten Elutionsstufe durch Elution mit 40 mM Tris/6 mM CaCl_2 /70 mM NaCl pH 9,0 – 9,3 erhalten.

Fraktion 4 und Fraktion 5 werden beispielsweise durch Dialyse für 24 Stunden gegen 50 l H_2O entsalzt und mit 50 mM MES-Puffer auf pH 5,9 – 6,1 eingestellt. Beide Fraktionen werden getrennt voneinander an einer Kationenaustauschersäule auf Styrol/Divinylbenzolmaterial (zum Beispiel POROS 50 HS der Firma PerSeptive) chromatographiert. Dafür werden die Fraktionen mit einer linearen Flussrate von zirka 700 cm/h bei 20 – 25 °C auf die Säule geladen und unter gleichen Bedingungen eluiert. Die Elution von Typ II Kollagenase aus Fraktion 4 bzw. Typ I Kollagenase aus Fraktion 5 erfolgt jeweils in einer ersten Elutionsstufe mit 10 mM MES-Puffer/20 – 40 mM NaCl pH 5,9 – 6,1 bei 20 – 25 °C. Clostripain aus beiden Fraktionen wird jeweils anschließend mit 10 mM MES-Puffer/90 – 110 mM NaCl pH 5,9 – 6,1 eluiert. Die Clostripain enthaltenden Lösungen werden vereinigt. Alle Lösungen werden entsalzt, gegen 2 mM CaAc_2 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Eine Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivitäten der so erhaltenen Enzyme erfolgte nach bekannten Methoden (s. Tabelle). Ferner wurde die Reinheit der Enzyme Typ I Kollagenase, Typ II Kollagenase und Clostri-

pain mittels reversed phase Chromatographie bestimmt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in der Tabelle zusammengefasst:

Tabelle:

	Aktivität	Reinheit ^e
Typ II Kollagenase	18100 U/g ^a	ca. 82 %
Typ I Kollagenase	5180 U/mg ^b	ca. 85 %
Clostripain	322 U/mg ^c	ca. 90 %
Neutrale Protease	1560 U/mg ^d	

^a bestimmt nach Wunsch E., Heidrich H.-G.; Z. Physiol. Chem. 333, 149 – 151, 1963; ^b bestimmt nach Doi, Shibata, Matoba; Anal. Biochem. 118, 173 – 184, 1981; ^c bestimmt nach Mitchel, Harrington; Methods Enzymol., 19, 635 – 642, 1970; ^d bestimmt nach Moore, Stein; Biol. Chem. 176, 367, 1948; ^e bestimmt mit RPC.

Patentansprüche

1. Verfahren zur teilweisen oder vollständigen Aufreinigung mindestens eines in einem Fermentationsüberstand von *Clostridium histolyticum* enthaltenen Enzyms,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Enzyme des Fermentationsüberstandes durch ein Chromatographieverfahren unter ausschließlicher Verwendung von Chromatographiematerialien auf Styrol/Divinylbenzolbasis und/oder auf Basis von, insbesondere keramischem, Hydroxylapatit aufgetrennt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Chromatographieverfahren einstufig oder bevorzugterweise mehrstufig durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Enzym Typ I Kollagenase und/oder Typ II Kollagenase und/oder Clostripain und/oder neutrale Protease (Caseinase) ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass gesintertes Hydroxylapatit verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Chromatographieverfahren ausschließlich Schritte umfasst, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen und/oder auf Ionenbindung und/oder ionischer Komplexbindung beruhen.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Chromatographieverfahren mindestens eine anionenaustauschchromatographische Stufe und/oder mindestens eine kationenaustauschchromatographische Stufe und/oder mindestens eine hydroxylapatitchromatographische Stufe umfasst.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass mindestens eine Chromatographiestufe, insbesondere alle Chromatographiestufen, in Form einer Stufenelution durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Chromatographieverfahren zwei- oder dreistufig ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Chromatographieverfahren eine erste chromatographische Stufe an gesintertem Hydroxylapatitmaterial, eine zweite chromatographische Stufe an einem Anionenaustauschermaterial auf Styrol/Divinylbenzolbasis und ggf. eine dritte chromatographische Stufe an einem Kationenaustauschermaterial auf Styrol/Divinylbenzolbasis umfasst.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste chromatographische Stufe in mindestens zwei Elutionsstufen durchgeführt wird, wobei neutrale Protease (Caseinase) von Typ I und Typ II Kollagenase und Clostripain abgetrennt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine im Wesentlichen von Caseinase befreite Fraktion aus der ersten chromatographischen Stufe der zweiten chromatographischen Stufe mit mindestens zwei Elutionsstufen unterzogen wird, wobei Typ I Kollagenase und Typ II Kollagenase voneinander getrennt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Typ I Kollagenase enthaltende Fraktion aus der zweiten chromatographischen Stufe der dritten chromatographischen Stufe mit mindestens zwei Elutionsstufen unterworfen wird, wobei Typ I Kollagenase von Clostripain abgetrennt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Typ II Kollagenase enthaltende Fraktion aus der zweiten chromatographischen Stufe der dritten chromatographischen Stufe mit mindestens zwei Elutionsstufen unterworfen wird, wobei Typ II Kollagenase von Clostripain abgetrennt wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Elution bei linearen Flussraten durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Elution an dem gesinterten Hydroxylapatitmaterial bei Flussraten von mindestens 200 cm/h, insbesondere von mindestens 300 cm/h, durchgeführt wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Elution an dem Styrol/Divinylbenzolmaterial bei Flussraten von mindestens 500 cm/h, insbesondere von mindestens 1000 cm/h, durchgeführt wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren keine Gelfiltrationsschritte umfasst.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren keine Proteinfällungsschritte umfasst.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren abreichernde Schritte für niedermolekulare Substanzen, Wirtszellproteine, Endotoxine und/oder Nukleinsäuren, insbesondere DNA, umfasst.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die chromatographischen Stufen bei Temperaturen zwischen 4 und 25 °C durchgeführt werden.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zertifizierte Chromatographiemedien verwendet werden.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass druckstabile Chromatographiematerialien verwendet werden.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Reinigung der Chromatographiematerialien mit einer konzentrierten Alkalilauge, insbesondere mit 3 molarer Natronlauge, durchgeführt wird.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Chromatographiestufen als Säulenchromatographie durchgeführt werden.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Typ II Kollagenase mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 13000 U/g, insbesondere mindestens 18000 U/g, erhalten wird.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Typ I Kollagenase mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 3000 U/mg, insbesondere mindestens 5000 U/mg, erhalten wird.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Clostripain mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 200 U/mg, insbesondere mindestens 300 U/mg, erhalten wird.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass neutrale Protease (Caseinase) mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 1200 U/mg, insbesondere mindestens 1500 U/mg, erhalten wird.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Typ II Kollagenase und/oder Typ I Kollagenase und/oder Clostripain jeweils mit einer Reinheit von mindestens 70 %, insbesondere mindestens 80 %, erhalten werden.
30. In einem Fermentationsüberstand von *Chlostridium histolyticum* enthaltenen teilweise oder vollständig aufgereinigten Enzyms, wie Typ I Kollagenase und/oder Typ II Kollagenase und/oder Clostripain und/oder neutrale Protease (Caseinase), dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme des Fermentationsüberstandes durch ein Chromatographieverfahren unter ausschließlicher Verwendung von Chromatographiematerialien auf Styrol/Diviny/Divinylbenzolbasis und/oder auf Basis von, insbesondere keramischem, Hydroxylapatit aufgetrennt sind.
31. Enzym, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym nach einem Verfahren nach Anspruch 1 bis 30 hergestellt ist.
32. Verwendung eines nach einem Verfahren nach Anspruch 1 bis 29 aufgereinigten Enzyms für pharmazeutische und/oder biochemische Zwecke.

1/1

Fig. 1

