



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **270 723 A5**

4(51) C 12 N 9/50

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 316 284 6

(22) 01.06.88

(44) 09.08.89

(71) siehe (73)

(72) Polgár, László, Dr.; Gaál, József, Dr.; Virág, Sándor, Dr.; Józsa, László, Dr.; Vizkeleti, Tibor, Dr; Asbóth, Bence; Fejér, Erzsébet, HU

(73) CHINOIN Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára RT., 1045 Budapest, Tű u. 1-5, HU

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von hochreinem Chymopapain**

(55) Verfahren, Herstellung, hochreines Chymopapain, rohes Chymopapain, Reduktionsmittel, Gelchromatographie, Enzym

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von hochreinem Chymopapain aus rohem Chymopapain. Erfindungsgemäß wird das rohe Chymopapain in Gegenwart eines Reduktionsmittels in Wasser oder einem Puffer gelöst. Der klare Überstand der Lösung wird einer Gelchromatographie unterzogen, und die das aktive Enzym enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und gefriergetrocknet.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Chymopapain aus rohem Chymopapain, dadurch gekennzeichnet, daß das rohe Chymopapain in Gegenwart eines Reduktionsmittels in Wasser oder einem Puffer aufgelöst, der klare Überstand der Lösung einer Gelchromatographie unterzogen wird und die das aktive Enzym enthaltenden Fraktionen gesammelt und gefriergetrocknet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Reduktionsmittel Cystein, Mercaptoäthanol oder Natriumsulfit verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Puffer ein Phosphat- oder Acetatpuffer eines zwischen 5 und 7 liegenden pH-Wertes verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, daß als chromatographische Säule Sephadex G-50 oder Sephadex G-25 verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis zwischen Länge und Durchmesser der verwendeten Säule zwischen 5:1 und 50:1, vorzugsweise bei 20:1, liegt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß die Gefrierdrying in an sich bekannter Weise, vorzugsweise bei 40°C und einem Druck von 6,665 Pa, durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von hochreinem Chymopapain mit hoher spezifischer Aktivität aus rohem Chymopapain mittels Gelchromatographie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Chymopapain ist eine Thiolprotease, die zusammen mit dem Papain und der Papalypapeptidase die proteolytische (eiweißabbauende) Komponente des Papaya-Latex bildet. Papaya-Latex wird aus der noch unreifen Frucht des in den Tropen vorkommenden Baumes *Carica papaya* gewonnen, indem die Frucht an mehreren Stellen angekratzt und der herausfließende milchartige Saft aufgefangen und dann getrocknet wird.

Das bekannteste und am besten untersuchte Enzym des Latex ist das Papain. Es wurde zuerst von Balls et al. (Balls, A. K., Lineweaver, H. und Thompson, R. R., *Science* 86, 3794 [1937]) kristallisiert. Jansen und Balls wiesen nach (Jansen, E. P. und Balls, A. K., *J. Biol. Chem.* 137, 459–460 [1941]), daß — wenn aus dem Extrakt des Papaya-Latex das Papain durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat entfernt wird — eine andere Thiolprotease in Lösung zurückbleibt. Dieses verhältnismäßig gut lösliche und bei pH 2 stabile Enzym erhielt die Bezeichnung Chymopapain. Durch Erhöhen der Ammoniumsulfatkonzentration kann auch dieses Enzym ausgefällt werden. Das auf diese Weise gewonnene „rohe Chymopapain“ ist keine homogene Substanz, wie durch Gelelektrophorese und Ionenaustauscherchromatographie nachgewiesen werden konnte (Kahn, I. U. und Polgár, L., *Biochem. Biophys. Acta* 760, 350–356 [1983]; europäische Patentschrift Nr. 0065395).

Das Chymopapain wird in der klinischen Praxis verbreitet zur Behandlung des Bandscheibenbruchs verwendet, da es in entsprechender Menge eingesetzt den Nucleus pulposus der Zwischenwirbelbandscheiben selektiv auflöst (US-PS 3320131). Außer den bei etwa 50% der behandelten Personen auftretenden leichteren Nebenwirkungen sind jedoch in etwa 1% der Fälle schwere anaphylaktische Störungen zu beobachten (US-PS 4039682; Robinson, C. P., *Drugs of Today*, Vol. 19, No. 8 [1983], 454–460). Diese sind gemäß der bereits erwähnten europäischen Patentschrift Nr. 0065395 auf eine der Eiweißkomponenten des heterogenen Chymopapains zurückzuführen. Diese Komponente gibt mit Bariumchlorid einen Niederschlag und kann durch Ionenaustauschchromatographie entfernt werden. Nach der erwähnten Patentschrift ist die proteolytisch inaktive Substanz gefärbt und weist einen unangenehmen Geruch auf.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung war die Ausarbeitung eines Verfahrens, das die Nachteile der bisher bekannten Verfahren nicht aufweist und in einfacher, billiger Weise die Herstellung von Chymopapain mit höherer spezifischer Aktivität ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die schädliche Komponente, die mit Bariumchlorid einen Niederschlag ergibt, mittels Gelchromatographie aus dem Chymopapain entfernt werden kann. Das ist technologisch einfacher, billiger und wenigstens zehnmal schneller als die herkömmliche Ionenaustauschchromatographie. Die Erfindung beruht weiterhin auf der Erkenntnis, daß die partielle Inaktivierung des Chymopapains während der Gelchromatographie durch den Zusatz von Reduktionsmitteln vermieden werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung von hochreinem Chymopapain aus rohem Chymopapain. Für das Verfahren ist charakteristisch, daß das rohe Chymopapain in Gegenwart eines Reduktionsmittels in Wasser oder einem Puffer gelöst, der klare Überstand der Lösung einer Gelchromatographie unterzogen wird und die das aktive Enzym enthaltenden

Fractionen gesammelt und gefriergetrocknet werden. Das rohe Chymopapain wird zweckmäßig in Phosphat- oder Acetatpuffer des pH-Wertes von 5–7 gelöst, der als Reduktionsmittel Cystein, Mercaptoäthanol oder Natriumsulfit enthält. Als chromatographische Säule findet zweckmäßig eine Säule aus Sephadex G-50 oder Sephadex G-25 Verwendung, die vorher mit einem Puffer oder einer Salzlösung, vorzugsweise mit cysteinhaltigem Phosphatpuffer, äquilibriert wird. Im Interesse einer effektiven Chromatographie wird die Säule so gewählt, daß sich Länge zu Durchmesser wie 5–50:1, vorzugsweise wie 20:1, verhalten.

Das Einfrieren erfolgt bei –20 bis –70°C, vorzugsweise bei –40°C; das Eis wird im Vakuum bei einem Druck zwischen 1,333 Pa und 13,33 Pa, vorzugsweise 6,665 Pa, in an sich bekannter Weise entfernt.

Die mit Bariumchlorid einen Niederschlag ergebende, unangenehm riechende Substanz befindet sich in dem chromatographischen Peak, das auf das aktive Enzym folgt.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat folgende Vorteile.

Die Entfernung der für die schädlichen Nebenwirkungen verantwortlichen, mit Bariumchlorid einen Niederschlag ergebenden Eiweißkomponente auf gelchromatographischem Wege ist billiger, schonender und um das Zehnfache schneller als die bekannten Verfahren. Deshalb ist das Verfahren auch für die großbetriebliche Durchführung wesentlich geeigneter als die Ionenaustauschchromatographie, die etwa 40 Stunden dauert. In dieser langen Zeit wird das Enzym unvermeidlich geschädigt. Die Gelchromatographie hingegen kann innerhalb von weniger als 4 Stunden durchgeführt werden und bietet die Möglichkeit, das Enzym auf chemischem Wege — durch physiologisch unschädliche, ionische Reduktionsmittel — zu schützen. Da die Gelchromatographie einen höheren Abtrennungswirkungsgrad aufweist, ist das erhaltene Produkt viel reiner, was — wie zu erwarten ist — zu einer wesentlichen Abschwächung der Nebenwirkungen führt.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

2,5 g rohes Chymopapain werden in 135 ml 10 mMol Cystein enthaltendem Phosphatpuffer (3 mMol, pH 6,5) gelöst. Wenn die Lösung trübe ist, so wird sie filtriert. Nach 15–30 Minuten werden die 135 ml Lösung an einer mit Sephadex G-25 (4 × 100 cm) mit einem Puffer chromatographiert, der 3 mMol Phosphat und 1 mMol Cystein enthält und einen pH-Wert von 6,5 aufweist. Das erste Peak (in Fig. 1 mit A bezeichnet) enthält das Chymopapain, etwa 1,3 g.

Das Peak B enthält die mit Bariumchlorid einen Niederschlag bildende, unangenehm riechende, inaktive Substanz. Das im Peak A befindliche Enzym wird sterilfiltriert und lyophilisiert.

Die Aktivität des Chymopapains wurde in jedem Falle durch Substratsättigung (Asbóth, B., Polgár, L., Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 12, 223–230 [1977]) an Benzyloxycarbonylglycin-p-nitrophenylester (ZGN) als Substrat in folgendem Reaktionsgemisch bestimmt:

100 µl einer mit Acetonitril bereiteten ZGN-Lösung von 1 mg/ml Konzentration.

2,8 ml 0,1 M Acetatpuffer des pH-Wertes 5,5, der 1 mMol EDTA enthält,

100 µl Chymopapain.

Zur Charakterisierung der Präparate wird im folgenden die bei 25°C innerhalb einer Minute an der Wellenlänge von 340 nm meßbare Änderung der optischen Dichte (Extinktion) angegeben, die 1 mg Chymopapain pro ml Reaktionsgemisch hervorruft. Das hergestellte Enzym hat die Aktivität 62.

Beispiel 2

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß die Säule einen größeren Durchmesser hat (5 × 100 cm). Spezifische Aktivität: 70.

Beispiel 3

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß eine kurze und schnelle Säule verwendet wird (10 × 16 cm). Hier tritt keine Trennung der mit Bariumchlorid einen Niederschlag ergebenden Substanz von dem Chymopapain ein. Spezifische Aktivität: 42.

Beispiel 4

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß der zum Gelchromatographieren verwendete Puffer kein Cystein enthält. Spezifische Aktivität: 51.

Beispiel 5

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß eine konzentriertere Lösung aus dem Chymopapain bereit wird (Eiweißgehalt 5% — Gew./Vol.-%). Spezifische Aktivität: 55

Beispiel 6

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß die Isolierung nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 2–10°C vorgenommen wird. Spezifische Aktivität: 65

Beispiel 7

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß statt Sephadex G-25 Sephadex G-50 verwendet wird. Spezifische Aktivität: 53.

Beispiel 8

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß die Konzentration des Phosphatpuffers nicht 3 mM, sondern 10 mM beträgt. Spezifische Aktivität: 63

Beispiel 9

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß statt des Phosphatpuffers mit pH 6,5 ein Acetatpuffer mit dem pH-Wert 5,5 verwendet wird. Spezifische Aktivität: 67

Beispiel 10

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß der Puffer nicht 1 mM Cystein, sondern 5 mM Cystein enthält. Spezifische Aktivität: 64

Beispiel 11

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man der die aktive Substanz enthaltenden Fraktion (Peak A) bezogen auf die vorhandenen Eiweiße 10 Ma.-% Cystein zusetzt. Spezifische Aktivität: 63

Beispiel 12

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß man als Reduktionsmittel statt des Cysteins Natriumsulfit verwendet. Spezifische Aktivität: 60.

Beispiel 13

Man arbeitet auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise mit dem Unterschied, daß von allen drei chromatographischen Peaks eine Probe von je 1 ml Volumen genommen wird und zu jeder Probe 0,2 ml n Salzsäure und 0,2 ml 12%ige Bariumchloridlösung gegeben werden. Ein Niederschlag entsteht nur in der Fraktion B.

Beispiel 14

Die Aktivität des als Referenz verwendeten Präparates Chimodiactin[®] (Smith Laboratories Inc., USA) wird auf die in Beispiel 1 angegebene Weise gemessen. Sie beträgt 28.