Verfahren zur Reinigung von thrombinähnlichen Proteasen aus Schlangengiften

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von thrombinähnlichen Proteasen aus Schlangengiften.

Beispiele für solche Proteasen sind Batroxobin, Crotalase und insbesondere Ancrod. Letztere ist ein Antikoagulanz, welches aus dem Gift der Schlange Agkistrodon rhodostoma isoliert wird (Merck-Index 1989, Nr. 664). Zu seiner Herstellung aus Schlangengift sind bereits eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden (GB-PS 1.094.301, GB-PS 1.177.506, GB-PS 1.293.793, US-PS 3.743.722, US-PS 3.879.369, DE-OS 2.428.955, DE-OS 2.734.427). Diese Verfahren basieren im wesentlichen auf chromatographischen Schritten und liefern das Ancrod in unterschiedlicher Ausbeute und Reinheit.

Die Herstellung von hochreinem Ancrod aus Schlangengift ist bisher nicht gelungen. Es wurde immer ein Gemisch von Enzymen mit Ancrod als Hauptkomponente isoliert, das je nach Herstellung mit mehr oder weniger Fremdproteinen verunreinigt war.

Es wurde nun ein Weg gefunden, um thrombinähnliche Proteasen aus Schlangengiften in hochreiner Form herzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reinigung von thrombinähnlichen Proteasen aus Schlangengiften, welches darin besteht, daß man

a. ein Protease-Rohprodukt einer Vorreinigung durch Affinitätschromatographie oder Chromatographie an einem basischen Ionenaustauscher unterwirft,

b. die so erhaltene Fraktion mit den thrombinähnlichen Enzymen einer Chromatographie an einem schwachen Kationenaustauscher unterwirft oder durch Adsorption an Glas im basischen Bereich trennt und

c. die Hauptkomponente aus Schritt 2 einer Gelchromatograhie unterwirft oder diese durch Chromatographie an Glas im sauren Bereich reinigt,

wobei jedoch mindestens einer der Schritte 2 und 3 eine Trennung durch Adsorption bzw. Chromatographie an Glas beinhaltet.

Gegenstand der Erfindung sind weiter thrombinähnliche Proteasen aus Schlangengiften in einer Reinheit von zwischen 95 und 100 %.

Es empfiehlt sich, für die Stufe b die Reinigung durch Adsorption an Glas und die Stufe c mit Hilfe der Gelchromatograpie durchzuführen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird sowohl in Stufe b als auch in Stufe c durch Adsorption bzw. Chromatographie an Glas gereinigt.

Zur Vorreinigung durch Affinitätschromatographie eignet sich besonders Agmatin-, Arginin- oder Heparin-Sepharose.

Als basische Ionenaustauscher eignen sich für die Vorreinigung besonders DEAE-Cellulose und DEAE-Sepharose.

Als Puffer seien für die Ionenaustauschchromatographie insbesondere Tris-phosphat- und Natriumphosphat-Puffer genannt.

Die Ionenaustauschchromatographie wird bei einem pH-Wert von 5-9, vorzugsweise von 6-8,5 durchgeführt.

Bei der Vorreinigung werden etwa 70-80% an Fremdproteinen und anderen Bestandteilen aus dem Rohenzym entfernt.

Wird der zweite Schritt der Reinigung mit einem Kationenaustauscher durchgeführt, so kommen folgende schwach saure Austauscher in Frage: CM-SEPHAROSE, pH-Wert 5-9, und AMBERLITE CG50, pH 5-9.

Chromatographie an Glas bedeutet, daß Ancrod und verwandte thrombinähnliche Enzyme sowie stark basische Proteasen bei pH-Werten von 7,5-9,0, vorzugsweise 8,0-8,5 an die Glas-Matrix gebunden werden. Ca. 60 % an vor allem sauren Fremdproteinen werden ungebunden mit dem Equilibrierungspuffer (vorzugsweise Tris-Phosphat- bzw. Natrium-Phosphat-Puffer) von der Säule gewaschen. Ancrod wird in über 90%iger Reinheit fraktioniert vom Glas eluiert, indem die Ionenstärke des Puffers durch Zugabe von Kochsalz auf 0,3-1,0 M erhöht wird.

Im zweiten Reinigungsschritt wird das Enzym bis auf etwa 90 % angereichert.

Für die Gelchromatographie als Reinigungsschritt c kommen insbesondere in Frage: SEPHACRYL S-100HR, SUPERDEX, SEPHADEX, ULTROGEL und SUPEROSE.

Wählt man für diesen Reinigungsschritt c die Chromatographie an Glas, so werden im sauren pH-Bereich von 4-6 basische Fremdproteine aus der Ancrodlösung an der Glasoberfläche adsorbiert, während sich Ancrod in weit über 95%iger Reinheit direkt im Equilibrierungspuffer von der Säule eluieren läßt. Die gewünschte Ionenstärke des Puffers kann durch Zugabe eines Salzes wie Kochsalz reguliert werden.

Das neue Verfahren eignet sich ganz besonders zur Reindarstellung von Ancrod, welches nach diesem Reinigungsverfahren in einer Reinheit von deutlich über 95% anfällt.

Beispiel 1

a. Vorreinigung

3 g getrocknetes Gift der malaiischen Grubenotter wurden in 50 ml Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Phosphat-Puffer pH 8,5 gelöst, unlösliche Zellbestandteile des Giftes abzentrifugiert und die klare, gelbe Lösung auf eine Chromatographie-Säule aufgetragen, welche einen Durchmesser von 1,6 cm aufwies und bis zu einer Höhe von 30 cm mit DEAE-SEPHAROSE-FF (Firma Pharmacia) gefüllt war. Die thrombinähnlichen Enzyme des Giftes sowie die Proteine mit saurem Charakter wurden an die Matrix gebunden. Die Chromatographie wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 150 - 200 ml/h durchgeführt. Durch Waschen der Säule bei Raumtemperatur mit ca. 300 ml Equilibrierungspuffer (10 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 8,5) bis der A_{280nm}-Wert des Eluats unter 0,5 abgesunken war und weiteres Waschen mit 400 ml 35 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 6,0 bis der A_{280nm}-Wert des Eluats < 0,4 war, wurden ca. 70 - 80 % der Fremdproteine (bezogen auf die optische Dichte der Ausgangslösung bei 280 nm) eluiert. Die Hauptfraktion mit Ancrod wurde mit 85 % Ausbeute in 150 - 200 ml 150 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 6,0 eluiert.

b. Hauptreinigung

Das Eluat, das das Ancrod enthielt, wurde mittels Ultrafiltration an einer Membran mit einer nominellen Trenngrenze von 10000 Dalton auf 20 ml aufkonzentriert und mit einem 100 mM TRIS-

Phosphat-Puffer pH 8,0 umgepuffert. Diese Lösung wurde auf eine Säule aufgetragen, die einen Durchmesser von 1,6 cm hatte und bis zu einer Höhe von 15 cm mit BIORAN-CPG Glas (Firma Schott, Porendurchmesser: 25 - 35 nm, Korngröße: 30 - 60 µm) gefüllt war. Durch Waschen der Säule bei Raumtemperatur mit 300 ml des 100 mM TRIS-Phosphat-Puffers pH 8,0 und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 250 ml pro Stunde wurden ca. 60 % Fremdproteine (bezogen auf die optische Dichte des Auftrags bei 280 nm) von der Säule eluiert.

Zur Elution wurde eine 0,5 M Natriumchlorid-Lösung, die mit 100 mM TRIS-Phosphat auf einen pH-Wert von 8,0 abgepuffert war, eingesetzt. Das Eluat wurde automatisch in ca. 10 ml Praktionen aufgefangen. Die thrombinähnlichen Enzyme wurden in einem Peak mit anschließendem Tailing-Bereich eluiert. Um die Hauptkomponente (entspricht Ancrod) in einer Form zu erhalten, die höchstens 5 % an thrombinähnlichen Nebenkomponenten enthielt, wurden beim Übergang vom Hauptpeak zum Tailing-Bereich einzelne Fraktionen sowohl auf ihre spezifische Fibrinogenase-Aktivität als auch auf ihre Zusammensetzung mittels Umkehrphasen-HPLC untersucht. Es wurden nur Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von größer 1700 U/OD_{280nm} besaßen und die in HPLC weniger als 10 % an Nebenkomponenten aufwiesen, mit dem Hauptpeak vereinigt (ca. 80 ml). Die Hauptkomponente wurde mit einer Reinheit von 96 % und einer Ausbeute von 72 % von der BIORAN-Säule erhalten.

c. Feinreinigung

Das Eluat mit der Hauptkomponente Ancrod wurde durch Ultrafiltration an einer YM 10 Membran (Firma Amicon) auf 2 ml aufkonzentriert und das erhaltene Konzentrat auf eine Säule aufgetragen, die einen Durchmesser von 1,6 cm hatte und bis zu einer Höhe von 85 cm mit SEPHARYL S-100 HR gefüllt war. Die Säule war zuvor mit einem Puffer von 100 mM Natriumchlorid und 100 mM Natriumphosphat, der einen pH-Wert von 6,9 aufwies, equilibriert worden. Mit dieser Gelchromatographie wurden restliche Proteasen sowie TRIS von Ancrod abgetrennt. Die Ausbeute betrug bei diesem Schritt ca. 90 %.

Beispiel 2

a. Vorreinigung

2,1 g getrocknetes Gift der malaiischen Grubenotter wurden in 50 ml 35 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 8,5 gelöst, unlösliche Zellbestandteile des Giftes abzentrifugiert und die klare, gelbe Lösung auf eine Chromatographie-Säule aufgetragen, welche einen

Durchmesser von 1,6 cm aufwies, bis zu einer Höhe von 30 cm mit DEAE-SEPHAROSE-FF (Firma Pharmacia) gefüllt war und mit dem oben genannten Puffer equilibriert war. Durch Waschen der Säule bei Raumtemperatur mit 600 ml Equilibrierungspuffer bis der A_{280}-Wert des Eluats < 0,2 war, wurden etwa 70 % der Fremdproteine (bezogen auf die optische Dichte der Ausgangslösung bei 280 nm) eluiert. Die Hauptfraktion wurde mit 90 - 100%iger Ausbeute mit 200 - 250 ml 150 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 6,0 eluiert.

b. Hauptreinigung

Das Eluat wurde wie in Beispiel 1 auf 20 ml aufkonzentriert und mit einem 50 mM Na-Phosphat Puffer pH 8,5 umgepuffert. Diese Lösung wurde auf die BIORAN-CPG-Glas-Säule (Durchmesser: 1,6 cm, Höhe: 15 cm, Porendurchmesser: 25 - 35 nm, Korngröße: 30 - 60 µm) aufgetragen. Durch Waschen der Säule bei Raumtemperatur mit 300 ml des 50 mM Na-Phosphat-Puffers pH 8,5 und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 250 ml pro Stunde wurden ca. 60 % Fremdproteine (bezogen auf die optische Dichte des Auftrags bei 280 nm) von der Säule eluiert.

Zur Elution der thrombinähnlichen Enzyme wurde eine 1 M Natriumchlorid-Lösung, die mit 50 mM Na-Phosphat auf einen pH-Wert von 8,0 abgepuffert worden war, eingesetzt. Mit 150 ml Puffer wurden ca. 80 % der aufgetragenen Einheiten an Enzym eluiert.

c. Feinreinigung

Das Eluat wurde wie oben auf 20 ml aufkonzentriert und mit einem 50 mM Na-Phosphat-Puffer, der einen pH-Wert von 5,0 aufwies, umgepuffert. Diese Lösung wurde auf eine Säule aufgetragen, die ebenfalls einen Durchmesser von 1,6 cm hatte und bis zu einer Höhe von 15 cm mit BIORAN-CPG-Glas gefüllt war, das jedoch einen Porendurchmesser von 90 - 110 nm und eine Korngröße von 30 - 60 µm besaß. Bei pH 5,0 wurden nur basische Proteine sowie die Nebenkomponenten an das BIORAN-Glas gebunden, während die Hauptkomponente Ancrod mit dem Äquilibrierungspuffer in einer Reinheit von annähernd 100 % und mit ca. 80 - 90%iger Ausbeute (bezogen auf die aufgetragenen Einheiten) von der Säule eluiert wurde.

Beispiel 3

a, b. Vor- und Hauptreinigung

2,1 g getrocknetes Gift der malaiischen Grubenotter wurden analog Beispiel 2 an DEAE-SEPHAROSE vorfraktioniert, das Eluat analog Beispiel 1 auf 20 ml aufkonzentriert und mit einem 40 mM TRIS-

Phosphat-Puffer pH 6,2 umgepuffert. Diese Lösung wurde auf eine Chromatographie-Säule aufgetragen, welche einen Durchmesser von 1,6 cm aufwies, bis zu einer Höhe von 20 cm mit CM-SEPHAROSE-FF (Firma Pharmacia) gefüllt und mit dem oben genannten Puffer equilibriert war. Durch Waschen der Säule bei Raumtemperatur mit 300 ml des Equilibrierungspuffers und einer Durchflußgeschwindigkeit von 250 ml/h wurden ca. 60 % Fremdproteine (bezogen auf die optische Dichte des Auftrags bei 280 nm) von der Säule eluiert.

Zur Elution der thrombinähnlichen Enzyme wurde analog Beispiel 2 eine 1 M Natriumchlorid-Lösung, die mit 50 mM Na-Phosphat auf einen pH-Wert von 8,0 abgepuffert war, eingesetzt. Mit 150 ml Puffer wurden ca. 80 % der aufgetragenen Einheiten an thrombinähnlichen Enzymen eluiert.

c. Feinreinigung

Die Feinreinigung von Ancrod wurde analog Beispiel 2 an BIORAN-CPG-Glas (Porendurchmesser ca. 100 nm; Korngröße 30 - 60 µm) mit einem 50 mM Phosphat-Puffer pH 5,0 durchgeführt. Ancrod wurde in über 95%iger Reinheit und mit ca. 85%iger Ausbeute (bezogen auf die aufgetragenen Einheiten) von der Säule eluiert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung von thrombinähnlichen Proteasen aus Schlangengiften, dadurch gekennzeichnet, daß man

   a. ein Protease-Rohprodukt einer Vorreinigung durch Affinitätschromatographie oder Chromatographie an einem basischen Ionenaustauscher unterwirft,

   b. die so erhaltene Fraktion mit den thrombinähnlichen Enzymen einer Chromatographie an einem schwachen Kationenaustauscher unterwirft oder durch Adsorption an Glas im basischen Bereich trennt und

   c. die Hauptkomponente aus Schritt 2 einer Gelchromatograhie unterwirft oder diese durch Chromatographie an Glas im sauren Bereich reinigt,

   wobei jedoch mindestens einer der Schritte 2 und 3 eine Trennung durch Chromatographie an Glas beinhaltet.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung durch Adsorption in Stufe b an Glas erfolgt und die Stufe c mittels Gelchromatographie durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung durch Chromatographie in den Stufen b und c an Glas erfolgt.

4. Natürlich vorkommendes Ancrod in einer Reinheit von über 95 %.

Purification of thrombin-like proteases from snake venoms

The present invention relates to a process for purifying thrombin-like proteases from snake venoms.

Examples of such proteases are batroxobin, crotalase and, in particular, ancrod. The latter is an anticoagulant which is isolated from the venom of the snake Agkistrodon rhodostoma (Merck Index 1989, No. 664). A multiplicity of methods for its preparation from snake venom have already been described (GB Patent 1,094,301, GB Patent 1,177,506, GB Patent 1,293,793, US Patent 3,743,722, US Patent 3,879,369, German Offenlegungsschrift 2,428,955, German Offenlegungsschrift 2,734,427). These processes are essentially based on chromatographic steps and yield the ancrod in varying yield and purity.

The preparation of highly pure ancrod from snake venom has been unsuccessful until now. A mixture of enzymes with ancrod as the main component was always isolated which, depending on the preparation, was contaminated with more or less foreign proteins.

A way has now been found to prepare thrombin-like proteases from snake venoms in highly pure form.

The invention relates to a process for purifying thrombin-like proteases from snake venoms, which consists in

a. subjecting a protease crude product to a prepurification by affinity chromatography or chromatography on a basic ion exchanger,

b. subjecting the fraction containing the thrombin-like enzymes thus obtained to chromatography on a weak cation exchanger or separating it in the basic range by adsorption on glass and

c. subjecting the main component from step 2 to gel chromatography or purifying this component in the acidic range by chromatography on glass,

where, however, at least one of steps 2 and 3 comprises a separation by adsorption or chromatography on glass.

The invention furthermore relates to thrombin-like proteases from snake venoms in a purity of from 95 to 100 %.

It is recommended for stage b to carry out the purification by adsorption on glass and stage c with the aid of gel chromatography.

In a particularly preferred embodiment of the invention, purification both in stage b and in stage c is carried out by adsorption or chromatography on glass.

Agmatine-, arginine- or heparin-Sepharose is particularly suitable for the prepurification by affinity chromatography.

Basic ion exchangers suitable for the prepurification are particularly DEAE-cellulose and DEAE-Sepharose.

Buffers which may be mentioned for ion exchange chromatography are, in particular, tris-phosphate and sodium phosphate buffers.

Ion exchange chromatography is carried out at a pH of 5-9, preferably of 6-8.5.

During the prepurification, approximately 70-80% of foreign proteins and other constituents are removed from the crude enzyme.

If the second step of the purification is carried out using a cation exchanger, those suitable are the following weakly acidic exchangers: CM-SEPHAROSE, pH 5-9, and AMBERLITE CG50, pH 5-9.

Chromatography on glass means that ancrod and related thrombin-like enzymes as well as strongly basic proteases are bound to the glass matrix at pHs of 7.5-9.0, preferably 8.0-8.5. About 60 % of especially acidic foreign proteins are washed from the column in unbound form with the equilibration buffer (preferably tris-phosphate or sodium phosphate buffer). ancrod is eluted from the glass fractionally in over 90% purity by increasing the ionic strength of the buffer to 0.3-1.0 M by addition of sodium chloride.

In the second purification step, the enzyme is concentrated to approximately 90 %.

For gel chromatography as a purification step c, suitable gels, in particular, are: SEPHACRYL S-100HR, SUPERDEX, SEPHADEX, ULTROGEL and SUPEROSE.

If chromatography on glass is selected for this purification step c, in the acidic pH range from 4-6 basic foreign proteins are adsorbed on the glass surface from the ancrod solution, while ancrod can be eluted from the column directly in the equilibration buffer in far over 95% purity. The desired ionic strength of the buffer can be regulated by addition of a salt such as sodium chloride.

The novel process is very particularly suitable for the preparation of ancrod in pure form, which according to this purification process is obtained in a purity of clearly over 95%.

Example 1

a. Prepurification

3 g of dried venom of the Malayan pit viper were dissolved in 50 ml of tris(hydroxymethyl)aminomethane(TRIS)-phosphate buffer pH 8.5, insoluble cell constituents of the venom were centrifuged off and the clear, yellow solution was applied to a chromatography column which had a diameter of 1.6 cm and was packed up to a height of 30 cm with DEAE-SEPHAROSE-FF (Pharmacia). The thrombin-like enzymes of the venom and the proteins having acidic character were bound to the matrix. Chromatography was carried out at a flow rate of 150 - 200 ml/h. By washing the column at room temperature with about 300 ml of equilibration buffer (10 mM TRIS-phosphate buffer pH 8.5) until the A_{280mm} [sic] value of the eluate had fallen below 0.5 and further washing with 400 ml of 35 mM TRIS-phosphate buffer pH 6.0 until the A_{280mm} [sic] value of the eluate was < 0.4, about 70 - 80 % of the foreign proteins (based on the optical density of the starting solution at 280 nm) were eluted. The main fraction containing ancrod was eluted in 85 % yield in 150 - 200 ml of 150 mM TRIS-phosphate buffer pH 6.0.

b. Main purification

The eluate which contained the ancrod was concentrated to 20 ml by means of ultrafiltration on a membrane having a nominal separation limit of 10000 Daltons and rebuffered using a 100 mM TRIS-phosphate buffer pH 8.0. This solution was applied to a column which had a diameter of 1.6 cm and was packed up to a height of

15 cm with BIORAN-CPG glass (Schott, pore diameter: 25 - 35 nm, particle size: 30 - 60 µm). By washing the column at room temperature with 300 ml of the 100 mM TRIS-phosphate buffer pH 8.0 and at a flow rate of 250 ml per hour, about 60 % of foreign proteins (based on the optical density of the material applied at 280 nm) were eluted from the column.

For elution, a 0.5 M sodium chloride solution which was buffered to a pH of 8.0 using 100 mM TRIS-phosphate was employed. The eluate was automatically collected in about 10 ml fractions. The thrombin-like enzymes were eluted in one peak with a subsequent tailing range. In order to obtain the main component (corresponds to ancrod) in a form which contained at most 5 % of thrombin-like secondary components, in the transition from the main peak to the tailing range individual fractions were investigated by means of reverse-phase HPLC both for their specific fibrinogenase activity and for their composition. Only fractions which had a specific activity of greater than 1700 U/OD_{280nm} and which contained less than 10 % of secondary components in HPLC were combined with the main peak (about 80 ml). The main component was obtained from the BIORAN column in a purity of 96 % and a yield of 72 %.

c. Fine purification

The eluate containing the main component ancrod was concentrated to 2 ml by ultrafiltration on a YM 10 membrane (Amicon) and the concentrate obtained was applied to a column which had a diameter of 1.6 cm and was packed up to a height of 85 cm with SEPHARYL S-100 HR. The column had been equilibrated beforehand using a buffer of 100 mM sodium chloride and 100 mM sodium phosphate which had a pH of 6.9. Residual proteases and TRIS were separated from ancrod by means of this gel chromatography. The yield in this step was about 90 %.

Example 2

a. Prepurification

2.1 g of dried venom of the Malayan pit viper were dissolved in 50 ml of 35 mM TRIS-phosphate buffer pH 8.5, insoluble cell constituents of the venom were centrifuged off and the clear, yellow solution was applied to a chromatography column which had a diameter of 1.6 cm, was packed up to a height of 30 cm with DEAE-SEPHAROSE-FF (Pharmacia) and was equilibrated with the buffer mentioned above. By washing the column at room temperature with 600 ml of equilibration buffer until the A_{280} [sic] value of the

eluate was < 0.2, approximately 70 % of the foreign proteins (based on the optical density of the starting solution at 280 nm) were eluted. The main fraction was eluted in 90 - 100% yield using 200 - 250 ml of 150 mM TRIS-phosphate buffer pH 6.0.

b. Main purification

The eluate was concentrated to 20 ml as in Example 1 and rebuffered using a 50 mM Na phosphate buffer pH 8.5. This solution was applied to the BIORAN-CPG glass column (diameter: 1.6 cm, height: 15 cm, pore diameter: 25 - 35 nm, particle size: 30 - 60 µm). By washing the column at room temperature with 300 ml of the 50 mM Na phosphate buffer pH 8.5 and at a flow rate of 250 ml per hour, about 60 % of foreign proteins (based on the optical density of the material applied at 280 nm) were eluted from the column.

For elution of the thrombin-like enzymes, a 1 M sodium chloride solution which had been buffered to a pH of 8.0 using 50 mM Na-phosphate was employed. Using 150 ml of buffer, about 80 % of the units of enzyme applied were eluted.

c. Fine purification

The eluate was concentrated to 20 ml as above and rebuffered using a 50 mM Na phosphate buffer which had a pH of 5.0. This solution was applied to a column which also had a diameter of 1.6 cm and was packed up to a height of 15 cm with BIORAN-CPG glass which, however, had a pore diameter of 90 - 110 nm and a particle size of 30 - 60 µm. At pH 5.0, only basic proteins and the secondary components were bound to the BIORAN glass, while the main component ancrod was eluted from the column using the equilibration buffer in a purity of approximately 100 % and in about 80 - 90% yield (based on the units applied).

Example 3

a, b. Pre- and main purification

2.1 g of dried venom of the Malayan pit viper were prefractionated on DEAE-SEPHAROSE analogously to Example 2, and the eluate was concentrated to 20 ml analogously to Example 1 and rebuffered using a 40 mM TRIS-phosphate buffer pH 6.2. This solution was applied to a chromatography column which had a diameter of 1.6 cm, [lacuna] packed up to a height of 20 cm with CM-SEPHAROSE-FF

(Pharmacia) and was equilibrated with the abovementioned buffer. By washing the column at room temperature with 300 ml of the equilibration buffer and at a flow rate of 250 ml/h, about 60 % of foreign proteins (based on the optical density of the material applied at 280 nm) were eluted from the column.

For elution of the thrombin-like enzymes, analogously to Example 2 a 1 M sodium chloride solution which was buffered to a pH of 8.0 using 50 mM Na phosphate was employed. Using 150 ml of buffer, about 80 % of the units of thrombin-like enzymes applied were eluted.

c. Fine purification

The fine purification of ancrod was carried out analogously to Example 2 on BIORAN-CPG glass (pore diameter about 100 nm; particle size 30 - 60 µm) using a 50 mM phosphate buffer pH 5.0. Ancrod was eluted from the column in over 95% purity and in about 85% yield (based on the units applied).



We claim:

1. A process for purifying thrombin-like proteases from snake venoms, which comprises

   a. subjecting a protease crude product to a prepurification by affinity chromatography or chromatography on a basic ion exchanger,

   b. subjecting the fraction containing the thrombin-like enzymes thus obtained to chromatography on a weak cation exchanger or separating it in the basic range by adsorption on glass and

   c. subjecting the main component from step 2 to gel chromatography or purifying this component in the acidic range by chromatography on glass,

   where, however, at least one of steps 2 and 3 comprises a separation by chromatography on glass.

2. A process as claimed in claim 1, wherein the purification by adsorption in stage b takes place on glass and stage c is carried out by means of gel chromatography.

3. A process as claimed in claim 1, wherein the purification by chromatography in stages b and c takes place on glass.

4. Naturally occurring ancrod in a purity of over 95 %.

Purification of thrombin-like proteases from snake venoms

Abstract

A process for purifying thrombin-like proteases from snake venoms is described, which consists in freeing the proteases from impurities in three chromatographic steps.

9803936-5
IPOS COPY

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 9/64, A61K 38/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32015

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. September 1997 (04.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00755

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 1997 (18.02.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 07 210.7 26. Februar 1996 (26.02.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: KNOLL AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Knollstrasse, D-67061 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: SCHWARZ, Margarete [DE/DE]; Leinhöhlweg 7, D-67146 Deidesheim (DE). ZAHN, Wolfgang [DE/DE]; Hardenburgstrasse 41, D-67122 Altrip (DE).

(74) Anwälte: KARAU, Wolfgang usw.; BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD OF PURIFYING THROMBIN-LIKE PROTEASE ENZYMES OBTAINED FROM SNAKE VENOM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON THROMBINÄHNLICHEN PROTEASEN AUS SCHLANGENGIFTEN

(57) Abstract

Described is a method of purifying thrombin-like protease enzymes from snake venom, the method consisting of freeing the enzymes of impurities in three chromatographic stages.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Reinigung von thrombinähnlichen Proteasen aus Schlangengiften beschrieben, welches darin besteht, daß man die Proteasen in drei chromatographischen Schritten von Verunreinigungen befreit.