(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7704417号
(P7704417)

(45)発行日　令和7年7月8日(2025.7.8)

(24)登録日　令和7年6月30日(2025.6.30)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 9/64 (2006.01)		C12N	9/64	Z
C12N 5/00 (2006.01)		C12N	5/00	
C12Q 1/37 (2006.01)		C12Q	1/37	
A61K 38/48 (2006.01)		A61K	38/48	
A23L 5/00 (2016.01)		A23L	5/00	J

請求項の数　11　（全15頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-567995(P2021-567995)
(86)(22)出願日　令和2年4月27日(2020.4.27)
(65)公表番号　特表2022-532617(P2022-532617A)
(43)公表日　令和4年7月15日(2022.7.15)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/061588
(87)国際公開番号　WO2020/229145
(87)国際公開日　令和2年11月19日(2020.11.19)
審査請求日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(31)優先権主張番号　62/847,013
(32)優先日　令和1年5月13日(2019.5.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　521495585
バイオセウティカ・ベー・フェー
ＢＩＯＳＥＵＴＩＣＡ Ｂ．Ｖ．
オランダ国、３８９９ ゼーウォルデ・ベーデー、ランドバウヴェーク ８３
(74)代理人　110001508
弁理士法人 津国
(72)発明者　ユーシフ，アレックス・ノバー
カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア ブイ３イー３エイ５、コキットラム、アルパイン・レーン １５４２
(72)発明者　ダッタ・パッセッカー，プリヤンカ
オーストリア国、ヴァイトホーフェン・アン・デア・イプス ３３４０、テュルケンヴェーク １２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　高い比活性を有する精製された魚類プロテアーゼ及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

タラの内臓からタラプロテアーゼを精製する方法であって、

前記プロテアーゼは、２４０U/mg±４０U/mg トリプシンの平均比酵素活性、４±２U/mg キモトリプシン活性、０．０４±０．０２U/mg コラゲナーゼ活性及び６５±１０U/mg プロテアーゼ活性を有し、前記トリプシンの平均比酵素活性、前記キモトリプシン活性、および前記プロテアーゼ活性は、米国薬局方４１条に記載されている方法によるものであり、前記コラゲナーゼ活性は、Mandl, I.J. Clin. Invest. 32, 1323. 1953、又はMoore, S. et al., J. Biol. Chem. 176, 367. 1948に記載されている方法によるものであり、

ａ）２０mMの濃度での塩化カルシウムバッファー（ｐＨ７）を使用して、タラの内臓から粗酵素を抽出し、ろ過し、限外ろ過することと、

ｂ）限外ろ液を７．８～８．２のｐＨ範囲で５２～６２mSの導電率を有する$CaCl_2$水溶液で抽出し、続けて、深層ろ過することと、

ｃ）直鎖アルキルリガンド又はアリールリガンドを有するアガロースベースマトリックスを固定相として使用し、１．５M 酢酸ナトリウム水溶液を使用して溶出し、ついで、イソプロパノールとグリセロールとの水性混合物で溶出する疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、ろ液を精製することと、

ｄ）透析することと、を含む、

方法。

【請求項２】
工程ａ）を４～２５℃の温度で行う、請求項１記載の方法。
【請求項３】
工程ａ）の限外ろ過を、１kダルトンのカットオフを有する膜を使用して行う、請求項１記載の方法。
【請求項４】
工程ｃ）で使用される固定相のアガロースベースマトリックスが、アリールリガンド及び５０～１００ミクロンの粒径分布を示す、請求項１記載の方法。
【請求項５】
工程ｃ）を４～２５℃の温度で行う、請求項１記載の方法。
【請求項６】
ｅ）凍結乾燥させることをさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項７】
タラプロテアーゼを、所望の最終濃度で工程ｄ）から直接水溶液中に単離する、請求項１記載の方法。
【請求項８】
推定分子量が２５，０００であり、２４０U/mg±４０U/mg トリプシンの平均比酵素活性、４±２U/mg キモトリプシン活性、０．０４±０．０２U/mg コラゲナーゼ活性及び６５±１０U/mg プロテアーゼ活性を有し、前記トリプシンの平均比酵素活性、前記キモトリプシン活性、および前記プロテアーゼ活性は、米国薬局方４１条に記載されている方法によるものであり、前記コラゲナーゼ活性は、Mandl, I.J. Clin. Invest. 32, 1323. 1953、又はMoore, S. et al., J. Biol. Chem. 176, 367. 1948に記載されている方法によるものである、
タラプロテアーゼ。
【請求項９】
請求項８記載のタラプロテアーゼ、０．１～０．３g/L 塩化カリウム及びリン酸二水素カリウム、７～９g/L ＮａＣｌ、１．０～１．３g/Lのリン酸一水素二ナトリウム、２．４mg/L フェノールレッド及び０．３～０．６mMの範囲の最終濃度でのエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む、配合物。
【請求項１０】
食品、生物医学用途（ヒトの治療方法を除く）、組織学及び組織培養のための、請求項８記載のタラプロテアーゼの使用。
【請求項１１】
組織学並びにＰＣ１２及びＮＰＣ細胞系統の組織培養における、請求項８記載のタラプロテアーゼの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、魚類の内臓、好ましくはタラ（Gadus属）の内臓から魚類プロテアーゼを製造するための方法に関する。本発明に従って製造された魚類プロテアーゼは、高い比酵素活性を有し、食品用途、生物医学用途、組織学及び組織培養に有用である。
【０００２】
背景
トリプシン（ＥＣ　３．４．２１．４）のタンパク質分解活性は、１８７６年にW. Kuhneにより、膵臓分泌物において最初に記載された（「Ueber das Trypsin (Enzym des Pankreas)」, Verhandlungen des naturhistorisch-medicinischen Vereins zu Heidelberg, vol. 1, no. 3, pages 194-198）。
【０００３】
この酵素は、塩基性加水分解より約１００倍速く、リシン及びアルギニンのアミノ酸残

基に対するＣ末端側ペプチド結合を特異的に加水分解する。トリプシンは、最初の発見以来、昆虫、魚類、ほ乳類を含むすべての動物において特定されてきた。各ソースからのトリプシンは、活性がわずかに異なるが、酵素についての天然基質は、リシン又はアルギニンを含有する任意のペプチドである。

【０００４】

ヒトトリプシンは、アルギニン又はリシン残基の後のペプチド結合を加水分解し、その活性は、ｐＨ７．５～８．５かつカルシウムイオンの存在下で最適であり、さらに、ヒトトリプシンは、約３７℃の最適動作温度を有する。

【０００５】

魚類トリプシン、例えば、タイセイヨウダラ（Atlantic cod）から単離されたトリプシンは、異なる最適温度範囲を有する（魚類等の変温動物は、低体温で生存するため）。例えば、タラトリプシンは、４～６５℃の最大温度活性範囲及び５５℃での最大活性を有するトリプシンＩと、２～３０℃に含まれる活性範囲及び２１℃での最大活性を有するトリプシンＹとを含む（Gudmundsdottir A et al., 2005 Mar-Apr;7(2):77-88); Hindawi Publishing Corporation; BioMed Research International, Volume 2013, Article ID 749078）。ほ乳類トリプシンと魚類トリプシンとの間の別の関連する相違は、それらの熱安定性であり、例えば、魚類トリプシンは、低温殺菌プロセスにより完全に不活性化されるが、ほ乳類トリプシンは不活性化されない。タンパク質として、トリプシンは、ソースに依存して、種々の分子量を示す。例えば、２３．３kDaの分子量が、ウシ及びブタソース由来のトリプシンについて報告されている。一方、タイセイヨウダラから単離された魚類トリプシンＩ、トリプシンＸ及びトリプシンＹはそれぞれ、２３．９kDa、２３．９kDa及び２５．１kDaの分子量を有する（Bjarki Stefansson et al., Characterization of cold-adapted Atlantic cod (Gadus morhua) trypsin I - Kinetic parameters, autolysis and thermal stability; Comparative Biochemistry and Physiology, Part B; (2010) 186-194）。トリプシンの商業的用途は、とりわけ、細胞及び組織培養プロトコールの開発（Soleimani M.; Nadri S. A, Nature protocols (2009), 4(1), 102-6）、ペプチド配列決定技術によるタンパク質特定（Schuchert-Shi et al., Analytical Biochemistry (2009), 387(2), 202-207）及び変形性関節症における関節軟骨の分解をモデル化するための医学分野（Wang S. et al., Connective tissue research (2010), 51(1), 36-47）におけるそれらの使用を含むことができる。特に、魚類トリプシン（タイセイヨウダラトリプシンＩ）は、ロブスター、エビ、カニ及び他のシーフードからの全て天然のシーフード風味の製造を含む、各種の工業的用途においてその有用性が既に証明されている（Bjarnason, J.B. et al., Psychrophilic proteinases from Atlantic cod ACS Symposium Series (1993), 516 (Biocatalyst Design for Stability and Specificity), 68-82）。さらに最近では、タラトリプシンは、天然タンパク質の分解に高い有効性を示し、ＨＳＶ－１及びＲＳＶに対するｉｎ　ｖｉｔｒｏでの抗病原性有効性を示し、魚類プロテアーゼの新たな治療用途に新たな展望を開いた（BioMed Research International Volume 2013, Article ID 749078, http://dx.doi.org/10.1155/2013/749078）。プロテアーゼ及び海洋生物トリプシンの使用の重要な態様は、それらが自己分解を受けるため、それらの安定性である。この理由で、それらは、分解を防止するために、非常に低温度（－２０～－８０℃）で保存されるべきである。自己分解は、これらのプロテアーゼをｐＨ３に保つことにより又は還元的メチル化により修飾されたプロテアーゼを使用することにより制御することができる。セリンプロテアーゼ（トリプシンも含まれるプロテアーゼのクラス）は、ｐＨをｐ　８に戻すように調整した場合に活性の回復を示す（F.M. Pohl European J. Biochem. 7 (1968), 146-152；Aizawa, N.; Yokohama Medical Bulletin (1960), 11, 101-10）が、非常にアルカリ性の条件（ｐＨ１０）下で作業した場合の活性の重大な損失が記載されている（B. K. Khangembam et al., International Aquatic Research, December 2012, 4:9）。甲殻類の腸から抽出され、ＣＡＳ登録番号５３４５８３－２２－７により特定される市販の海洋生物プロテアーゼ（商品名Accutase）も、温度感受性である：それらは、４℃で６０日間安定であるが、

３７℃で保存されると、それらの酵素活性の７５％がすぐに（９０分で）失われる。
【０００６】
これらの精製されたトリプシン及びプロテアーゼの特性の、安定性及び酵素活性に関する標準化は、それらの商業的使用の観点から重要である。それらを生産試薬としての（例えば、食品化学における）使用ならびに組織学及び組織培養における使用のために検証することができるためである。消化器官として機能するタイセイヨウダラの盲腸幽門部は、漁業の副産物であり、トリプシンを含む魚類プロテアーゼの単離のための安価な出発材料として利用することができる。この盲腸幽門部は、消化酵素、例えば、セリンプロテアーゼを大量に含んでいる（Asgeirsson B. et al., Eur J Biochem 180(1), 85-94）。
【０００７】
タイセイヨウダラ由来のこれらのセリンプロテアーゼファミリーの最も公知のメンバーは、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、セリンコラゲナーゼ及びブラキウリンである（Halfon S, Craik CS (1998)「Family S1 of trypsin (clan SA)」 In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, eds. (San Diego, Calif.: Academic Press) pp 5-12）。より詳細には、トリプシンＩ、ＩＩ及びＩＩＩと呼ばれる３つのネイティブなトリプシンアイソザイムが、タイセイヨウダラの盲腸幽門部から単離された。トリプシンＩは、最も豊富に存在し、最良に特徴付けられた形態であり、最も高い触媒効率も示す。この効率は、その中温性ウシ類似体の触媒効率より約２０倍高い。しかしながら、魚類の内臓からプロテアーゼを精製する公知の方法（Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology (1995), 110(4), 707-17；Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39 (10), Pages 1738-42 (1991)）は、非常に複雑であり、特に、$(NH_4)_2SO_4$分画及び疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを含む複数のクロマトグラフィー精製を含む場合がある複数の精製工程を必要とする。文献に報告されているデータに基づいて、粗抽出物からのトリプシンの精製の全体的な収率は低く、得られる比酵素活性は、数単位/mgであることに留意されたい。
【０００８】
さらに、Ca^{2+}の存在下かつ低温で作業する、長い精製工程の間、自己溶解からトリプシンを安定化させる必要性は、工業的規模へのスケールアップのための高コストを意味する。したがって、より単純で効果的な精製方法が必要とされる。
【０００９】
発明の説明
本発明は、魚類の内臓から魚類プロテアーゼを精製するための方法であって、
ａ）塩化カルシウムバッファー（ｐＨ７）を使用して、魚類の内臓から粗酵素を抽出し、ろ過し、限外ろ過することと、
ｂ）限外ろ液を７．８～８．２のｐＨ範囲で５２～６２mSの導電率を有する$CaCl_2$水溶液で抽出し、続けて、深層ろ過することと、
ｃ）直鎖アルキルリガンド又はアリールリガンドを有するアガロースベースマトリックスを固定相として使用し、低塩含量のバッファーで溶出し、ついで、水混和性有機溶媒とポリオールとの水性混合物で溶出する疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、ろ液を精製することと、
ｄ）透析することと、
ｅ）場合により、凍結乾燥させることとを含む、方法を提供する。
【００１０】
本発明の方法により得られたプロテアーゼは、２４０U/mg±４０U/mg トリプシンの平均比酵素活性、４±２U/mg キモトリプシン活性、０．０４±０．０２U/mg コラゲナーゼ活性及び６５±１０U/mg プロテアーゼ活性を有する。
【００１１】
該方法は、出発材料として使用されるタラの内臓の０．０６～０．１１重量%の固形分魚類プロテアーゼの総収率を提供する。

【００１２】
魚類の内臓は、好ましくは、タラの内臓である。
【００１３】
工程ａ）の抽出プロセスを４～２５℃の温度で行う。
【００１４】
ｐＨ塩化カルシウムバッファーは、好ましくは、２０ｍＭの最終濃度を有する。
【００１５】
限外ろ過を好ましくは、１ｋダルトンのカットオフを有する膜を使用して行う。一方、工程ｃ）で使用される固定相のアガロースベースマトリックスは、アリールリガンド及び５０～１００ミクロンの粒径分布を示す。
【００１６】
工程ｃ）における低塩含量のバッファーによるクロマトグラフィー溶出を、好ましくは、１．５Ｍ 酢酸ナトリウム水溶液を使用して行い、水混和性有機溶媒は、イソプロパノールであり、ポリオールは、グリセロールである。
【００１７】
工程ｃ）を好ましくは、４～２５℃の温度で行う。
【００１８】
詳細な説明：定義
表面からの足場依存性細胞の剥離及び解離について試験された細胞系統
ＰＣ１２細胞（ラット副腎髄質の褐色細胞腫に由来する細胞系統）は、特異的なレセプターを有し、上皮成長因子（ＥＧＦ）に応答すると考えられる（Huff and Guroff, 1979）。このようなレセプターの存在は、神経細胞の発達中のＥＧＦのこれまで特定されていなかった役割を反映している場合があり、代替的には、ＰＣ１２細胞の腫瘍性の性質と相関している場合がある。ＰＣ１２細胞は、ニューロンの分化、神経伝達物質の合成、貯蔵及び放出、イオンチャネルの機能及びレギュレーション並びに化合物と膜結合レセプターとの相互作用に関連するプロセスの化学的破壊を研究するためのモデルを提供する。
【００１９】
人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、成体細胞から直接発生させることができる多能性幹細胞の一種である。これらの細胞は、肝系統に分化することができ、肝疾患、薬剤スクリーニング及び薬物毒性試験の正確なモデルを提供する（Curr Stem Cell Res Ther. 2015;10(3):208-15）。
【００２０】
ニューロン始原細胞（ＮＰＣ）は、ニューロン及びグリア細胞（オリゴデンドロサイト及びアストロサイト）に分化する能力を有する多能性幹細胞である。したがって、ｉｎ ｖｉｔｒｏでのニューロン始原細胞増殖の成功は、細胞療法用途のための顕著な治療可能性を提供する。
【００２１】
ヒト骨肉腫上皮細胞（Ｕ２ＯＳ）は、骨肉腫についてのｉｎ ｖｉｖｏ転移モデルの必要性を満たす場合がある。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】単離された酵素は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上に複数のバンドを示した。主要なものを図１に矢印で示した。推定分子量は２５，０００であった。
【図２】酵素活性に最適な温度範囲である。
【図３】酵素活性に最適なｐＨ範囲である。
【図４】種々のｐＨ値における酵素活性についての経時的安定性データである。
【図５】特許請求された方法に従って調製された魚類プロテアーゼ、Accutase（登録商標）及びほ乳類トリプシンでの処理の前後でのＰＣ１２細胞の光学顕微鏡観察である。
【図６】細胞を、培地を含有する１２ウェル上に再度播種し、１週間後に光学顕微鏡により観察した。

【００２３】
使用される酵素試験
トリプシン活性。酵素活性を米国薬局方４１条に記載されている方法に従って分析した。
【００２４】
キモトリプシン活性。酵素活性を米国薬局方４１条に記載されている方法に従って分析した。
【００２５】
Ｉ型コラゲナーゼ活性。酵素活性を文献（Mandl, I.J. Clin. Invest. 32, 1323. 1953、Moore, S. et al., J. Biol. Chem. 176, 367. 1948）に記載されているプロトコールに従って分析した。
【００２６】
プロテアーゼ活性。酵素活性を米国薬局方４１条に記載されている方法に従って分析した。
【００２７】
特許請求される方法の一貫性を、出発材料として（１年のうちの異なる時点に捕獲された）異なるバッチのタラの内臓を使用して確認した。得られた魚類プロテアーゼは、バッチ間で限定された変動性を有することが証明された。この変動性は、得られた比酵素活性に関して±１５％の範囲を超えない。
【００２８】
本発明の方法に従って調製された精製魚類プロテアーゼは、特異的な酵素プロファイルを示す。一方、実際に、市販の海洋生物トリプシン（例えば、ＣＡＳ登録番号９３４５８３－２２－７により特定された海洋生物プロテアーゼ）は、総酵素活性の約２６～４９％がトリプシン活性を示し、約４７～６７％がＩ型コラゲナーゼ活性を示すが、本発明の方法に従って調製された魚類プロテアーゼは、総酵素活性の約８９～６６％がトリプシン活性を示し、わずか０．０１１～０．０１５％がコラゲナーゼ活性を示す。
【００２９】
驚くべきことに、本発明の方法に従って調製された魚類プロテアーゼは、細胞剥離のための組織学において利用される場合、他の海洋生物プロテアーゼより細胞に対して有害ではなく、生存率の向上をもたらす。詳細には、ＮＰＣ及びＰＣ１２細胞系統を本発明に従って得られた魚類プロテアーゼで処理した場合、生存率及び回収された細胞の数は、ほ乳類及び海洋生物起源の他のトリプシン／プロテアーゼより約５～１０％高い。
【００３０】
詳細な説明：方法
凍結（－２０℃）させたタラの内臓を２０～２５℃で解凍し、ついで、塩化カルシウムバッファー ２Lに対して１kg 魚類の内臓の相対比で、２０mM 塩化カルシウム二水和物抽出バッファーと合わせた。得られた混合物を、５０％w/v 水酸化ナトリウム溶液を加え、４℃で８～１２時間撹拌することにより、最終ｐＨ７に調整した。
【００３１】
大きな内臓塊を、ネット（１mmカットオフ）でろ過することにより分離した。
【００３２】
ろ過助剤を得られた混合物に、２０～２５℃で撹拌しながら加え、ついで、加圧ろ過した。
【００３３】
適切なろ過助剤は、混合物の体積に対して３～７重量％を含む量で加えられた珪藻土、パーライト、セルロースである。好ましくは、珪藻土が、混合物に対して５％w/vの量で使用される。
【００３４】
ろ過された抽出物を限外ろ過（１kDaカットオフ）により、初期容量の４２％まで濃縮し、次の精製プロセスで直ちに使用しない場合には、４℃で保存した。濃縮魚類抽出物を２０～２５℃に温め、塩化カルシウム二水和物を加えて、１．０～１．８w/v、好ましく

は、１．４％w/vに含まれる最終濃度に達した。酢酸ナトリウムを加えて、１．０～２．０M、好ましくは、１．５Mの最終濃度に達し、ｐＨを、５M 水酸化ナトリウム水溶液を使用して、７．８～８．２、好ましくは、８．０の範囲に調整した。

【００３５】

混合物の導電率が、５４～６２mS、好ましくは、５６～６０mSの範囲に含まれる場合、塩の正確な濃度が得られる。

【００３６】

この混合物を２０～２５℃で１時間攪拌した後、ろ過助剤を加え、得られた懸濁液をろ過した。適切なろ過助剤は、混合物の体積に対して１～４重量%に含まれる量で加えられた珪藻土、パーライト、セルロースである。好ましくは、珪藻土が、混合物に対して２％w/vの量で使用される。

【００３７】

ついで、得られた懸濁液を、適切なデプスフィルターを備えたフィルタープレスによりろ過する。このろ過に使用される操作圧力は、５０～７０psi、好ましくは、６０psiを含み、利用される適切なデプスフィルターは、６～９ミクロンに含まれるカットオフを有するべきである。好ましいデプスフィルターは、セルロースフィルターシート又は多孔質金属、セラミックスもしくはプラスチック媒体を含有する硬質媒体フィルターである。好ましくは、XE-400フィルターシート（Carlson filtration）が使用される。

【００３８】

ついで、得られたろ液を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）により精製した。使用される固定相の体積に対する供給材料の体積の比は、４～８体積／体積、好ましくは６．７に含まれる。固定相の好ましい粒径は、５０～１００ミクロン、好ましくは、７５ミクロンに含まれる。固定相は、種々の固定化リガンド、例えば、直鎖アルキルリガンド又はアリールリガンドを有するアガロースベースマトリックスを提供する。好ましいリガンドは、アリールリガンドである。使用前に、固定相を少なくとも３ベッド体積の０．１M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、ついで、３ベッド体積の蒸留水で洗浄する。ついで、カラムを、酢酸ナトリウム水溶液を１．０～２．０M、好ましくは、１．５Mに含まれる濃度で使用して、５M 水酸化ナトリウム溶液の添加により得られた７．８～８．２、好ましくは、８．０に含まれるｐＨ値で調製された溶液を４BVで調整した。この溶液及び溶出液を、固定相の総容積に対する１／１０ml/分の流速及び１０～２０psi、好ましくは、１５psiに含まれる圧力で供給する。吸収後、結合した溶質を、低い塩含量を有するバッファー、ついで、水混和性有機溶媒とポリオールとの水性混合物で段階的又は勾配溶出により溶出する。適切な水混和性有機溶媒は、－０．３１～＋０．２５に含まれるｌｏｇＰ（疎水性）を有し、例えば、ｎ－プロパノール、イソプロパノール及びエタノール、好ましくは、イソプロパノールである。適切なポリオールは、グリセロール、エチレングリコール、エチレングリコール及びソルビトール、好ましくは、グリセロールである。

【００３９】

溶出を、好ましくは、下記条件：２ベッド体積の１．５M 酢酸ナトリウム（ｐＨ８）、ついで、３ベッド体積の１０%v/v セロール溶液及び５%v/v イソプロパノール溶液（蒸留水で希釈）下で行う。溶出液を、それぞれ約１ベッド体積の４つの画分に収集した。トリプシン活性を有する溶出画分を一緒にプールし、限外ろ過（１kDaのカットオフを有する限外ろ過膜を使用）により出発体積の１／１０に濃縮した。ついで、濃縮溶液を２０mM $CaCl_2$水溶液（ｐＨ８）で攪拌しながら１／２．２に希釈し、透析して、元の体積に戻し、ついで、凍結乾燥させて、精製された魚類プロテアーゼを得た。２４０U/mg 平均トリプシン酵素活性、５U/mg キモトリプシン活性及び０．０４U/mg コラゲナーゼ活性を有する３３～６０ｇ 精製された魚類プロテアーゼをタラの内臓 ５２Kgから回収した。場合により、本発明の方法は、定義された酵素活性を有する酵素液体配合物の調製に有用な水溶液中に魚類プロテアーゼを得るために、透析工程後に停止することができる（すなわち、最後の凍結乾燥工程を回避する）。

【００４０】

該方法の一貫性を、出発材料として１年のうちの異なる時点に捕獲された異なるバッチのタラの内臓を使用してチェックした。得られた魚類プロテアーゼは、バッチ間で限定された変動性を有することが確認された。この変動性は、得られた酵素活性に関して±１５％の範囲を超えない。

【００４１】

本発明を下記実施例においてより詳細に説明する。

【００４２】

実施例１

粗酵素の抽出

５２kg 魚類の内臓を室温で一晩解凍し、ついで、１kg 魚類の内臓：塩化カルシウムバッファー ２Ｌの相対比で、２０mM 塩化カルシウム二水和物抽出バッファー １０３Ｌと合わせた。得られた混合物（約１５０Ｌ）を５０％w/v 水酸化ナトリウム水溶液の添加により、最終ｐＨ７の値に調整し、４℃で一晩撹拌した。

【００４３】

大きな内臓塊をネットでのろ過により分離し、タンクに１３０Ｌを残した。得られた混合物に、室温で撹拌しながら、６．５kg 珪藻土（５％w/v）を加え、ついで、１４枚のXE-400フィルターシート（７つのカセット）を通して加圧ろ過した。ろ過された抽出物（１００Ｌ）を、１×１限外ろ過スパイラル膜（１kDaカットオフ）を使用して、４２Ｌに濃縮した。膜を洗浄し、その後、０．１M 水酸化ナトリウム水溶液 １００Ｌで濃縮し、続けて、水に対して逆浸透させた。

【００４４】

濃縮された魚類エキス ２Ｌを凍結乾燥用に取り出し、残りの抽出物を精製まで４℃で保存した。

【００４５】

実施例２

疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）精製

全ての精製工程を２０～２５℃で行った。濃縮された魚類抽出物を２０～２５℃に温め、５８．８２g 塩化カルシウム二水和物を加えた。４．９３kg 酢酸ナトリウムを加えて、１．５M濃度を得た。ｐＨを、５M 水酸化ナトリウム水溶液を使用して、８に調整した。

【００４６】

導電率をチェックして、正しい濃度に到達したことを確認した（５６～６０mSに調整され、５７．４mSであった）。１時間撹拌した後、０．８kg 珪藻土（２％w/v）を加え、得られた懸濁液を４枚のXE-400フィルターシート（１つのカセット）を通して加圧ろ過することにより清澄化した。供給材料 ４０Ｌを得た。

【００４７】

Capto-phenl high subカラム樹脂 ６Ｌを０．１M 水酸化ナトリウム水溶液 ２０Ｌ、続けて、逆浸透水 ２０Ｌで調整した。

【００４８】

カラム圧を１５psiで維持し、流速を４１７mL/分に維持した。１．５M 酢酸ナトリウム（ｐＨ８） ４０Ｌを使用して、カラムを平衡化した。溶出液を導電率（予想値６２mS）についてもチェックした。

【００４９】

主な供給物をカラムに加え、平衡化バッファー １５Ｌで洗浄し、ついで、１０％v/v グリセロールと５％v/v イソプロパノール（逆浸透水で希釈）との溶液 ２０Ｌで溶出した。溶出液をそれぞれ５Ｌの４つの画分に収集し、トリプシン活性を有する画分をプールした（１５Ｌを収集した）。

【００５０】

実施例３

溶出液濃縮、透析、凍結乾燥

濃縮及びダイアフィルトレーションを、１kDa膜を有する交差接線限外ろ過ユニット（Pall Filtron, USA）を使用して行った。選択された溶出液を最終容量１．７Ｌに濃縮した。この溶液に、２０mM ＣａＣｌ$_2$水溶液（ｐＨ８） １Ｌを撹拌しながら加えた。

【００５１】

実施例３

溶出液濃縮、透析、凍結乾燥

濃縮及びダイアフィルトレーションを、１kDa膜を有するクロスタンジェンシャル限外ろ過ユニット（Pall Filtron, USA）を使用して行った。選択された溶出液を最終容量１．７Ｌに濃縮した。この溶液に、２０mM ＣａＣｌ$_2$水溶液（ｐＨ８） １Ｌを撹拌しながら加えた。

【００５２】

得られた溶液は、４．３% 固形分を有した。さらに、ＣａＣｌ$_2$溶液 １Ｌを加え、得られた溶液は、４．５% 固形分を示した。体積を透析により、１．７５Ｌに減少させ、ついで、濃縮され、ダイアフィルトレーションされた溶出液を凍結乾燥させて、３３ｇ 粉末を与えた。この粉末の比酵素活性は、２４０U/mg トリプシン、５U/mg キモトリプシン及び０．０４U/mg コラゲナーゼであった。単離された酵素は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上に複数のバンドを示した。主要なものを図１に矢印で示した。推定分子量は２５，０００であった。

【００５３】

場合により、魚類プロテアーゼの製造プロセスを、所望の濃度の水溶液中の魚類プロテアーゼを得るために、透析工程後に停止する（すなわち、最終凍結乾燥工程を回避する）ことができる。

【００５４】

これらの溶液を、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム及びフェノールレッドをｐＨ値７．２～７．６で含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液（ＰＢＳ溶液）中の最終酵素配合物の調製に使用することができる。

【００５５】

これらの酵素配合物は、０．１～０．３g/L 塩化カリウム及びリン酸二水素カリウム、７～９g/L ＮａＣｌ、１．０～１．３g/L リン酸一水素二ナトリウム、２．４mg/L フェノールレッド及び０．３～０．６mMの範囲の最終濃度でのエチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含有することができ、Dulbecco’sリン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco, R et al. J. Exp. Med., 99, 167-182 (1954)）を含む。

【００５６】

実施例４

本発明に従って精製された魚類トリプシンの分析特性

本発明に従って単離された魚類トリプシンの特徴を下記表及び図に報告する。

【００５７】

酵素活性に最適な温度範囲：表１及び図２に、５～７０℃の間に含まれる温度範囲における、調製された魚類プロテアーゼの酵素活性を示す。主なトリプシン活性を試験した。

【００５８】

【表１】

表1

温度(℃)	トリプシン活性(U/mg)
5	40
10	56
15	81
20	115
30	225
40	390
50	559
60	73
70	33

【００５９】

酵素活性に最適なｐＨ範囲：表２及び図３に、３～１２に含まれるｐＨ範囲における、調製された魚類トリプシンの酵素活性を示す。主なトリプシン活性を試験した。

【００６０】

【表２】

表2

pH	トリプシン活性 (U/mg)
3	0
4	3
5	15
6	83
7	147
8	173
9	160
10	0
11	1
12	2

【００６１】

種々のｐＨ値における酵素活性についての経時的安定性データ：表３及び図４に、５℃の温度で３時間における３～１０のｐＨ範囲での、調製された魚類トリプシンの酵素活性を示す。表３の同じデータを、相対酵素活性（時間ゼロでの酵素活性を１００％とする；図４）としてグラフ形式で示す。主なトリプシン活性を試験した。

【００６２】

【表３】

表3

	トリプシン活性(U/mg)							
時間(分)	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	168	205	205	169	136	161	161	168
30	13	171	128	156	140	155	155	133
60	13	157	107	157	157	151	147	128
90	20	157	100	153	144	155	145	116
120	14	148	96	148	137	151	135	107
150	17	171	95	147	135	149	143	110
180	19	165	93	141	167	151	140	110

【００６３】

細胞培養：生物学的「ｉｎ　ｖｉｖｏ」試験

ＰＣ１２細胞、ヒト神経膠腫及びヒトアストロサイトにおける比較ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生物学的試験を、本発明の方法に従って調製された魚類プロテアーゼ、登録番号５３４５８３－２２－７の化合物及び０．２５w/v% トリプシン－１mM ＥＤＴＡ／４Ｎａ溶液（フェノールレッドを含む）（Wako, Japan 209-16941）中で約３０００U/ml トリプシン活性を有するほ乳類トリプシンを使用して行った。本発明に従って調製された魚類プロテアーゼは、トリプシン及び登録番号５３４５８３－２２－７の化合物より多くのＰＣ１２細胞を回収した（表４）。図５に、特許請求された方法に従って調製された魚類プロテアーゼ、Accutase（登録商標）及びほ乳類トリプシンでの処理の前後でのＰＣ１２細胞の光学顕微鏡観察を示す。

【００６４】

【表４】

表4. 特許請求された方法に従って調製された魚類プロテアーゼ、登録番号534583-22-7の化合物及びほ乳類トリプシンで処理された後のPC12細胞の生存率（%）。

PC12細胞			
酵素	回収された細胞数［×10^5個/ウェル］	トリプシンに対する比	生存率 [%]
魚類プロテアーゼ	1.325	1.1	98.8
登録番号534583-22-7の化合物	0.783	0.64	93.3
ほ乳類トリプシン	1.22	1	97.3

【００６５】

特許請求された方法に従って調製された魚類プロテアーゼで得られた生存率は、細胞種に応じて、ＣＡＳ登録番号５３４５８３－２２－７の化合物及びトリプシンで得ることができる生存率に匹敵する。これらの魚類プロテアーゼについての最良の結果は、ＰＣ１２細胞で得られた（表５）。

【００６６】

【表５】

表5

生存率 [%]			
	PC12細胞	ヒト神経膠腫	ヒトアストロサイト
魚類プロテアーゼ	98.8	78.0	90.0
Accutase（登録商標）	93.3	83.4	91.3
ほ乳類トリプシン	97.3	98.1	97.0

【００６７】

本発明の方法により得られた魚類プロテアーゼを、約５００～６００U/mlのトリプシン活性を有するほ乳類トリプシン（０．０５% トリプシン／０．５３mM ＥＤＴＡ 10X ＩＮ HBSS 1X、無菌（Wisent Bioproducts, Quebec, Canada）及びＣＡＳ登録番号５３４５８３－２２－７の化合物と比較するために、更なる比較研究を、下記細胞系統：ｉＰＳＣ（人工多能性幹細胞）、ＮＰＣ（ニューロン始原細胞）及びＵ２ＯＳ（ヒト骨肉腫上皮細胞）を使用して行った。特に、細胞付着及び生存能の特徴並びに最終的な細胞形態に注意を払った。

【００６８】
この目的で、１２ウェルプレート中の５，０００個/ウェルを５日間培養し、７０％コンフルエントに達した時点で、実験を開始し、ついで、培地を吸引し、ＰＢＳですすぎ、解離剤 ０．５mLを加え、解離まで３７℃で３分間インキュベーションした（解離を最適な時間が決定されるまで顕微鏡下でモニターした）。
【００６９】
【表６】

表6. 種々の細胞系統上での効率的な解離のための種々の酵素の最適化されたインキュベーション時間

細胞系統	魚類プロテアーゼとのインキュベーション時間	トリプシンとのインキュベーション時間	登録番号534583-22-7の化合物とのインキュベーション時間
iPSC	3分	3分	3分
NPC	3分	3分	3分
U2OS	14分	3分	3分

【００７０】
ＤＭＥＭ（Dulbecco’s改変イーグル培地）を加えて、酵素反応を停止させ、ついで、細胞を１２００rpmで３分間遠心分離することにより回収した。細胞を培養培地中に再懸濁させ、細胞数を、lunar自動細胞カウンターを使用することにより決定した（表７）。ｉＰＳＣ及びＮＰＣに対する本発明の魚類プロテアーゼによる処理は、トリプシンで観察されたような細胞付着及び生存率に影響を及ぼさなかった。
【００７１】
【表７】

表7. 酵素処理後の種々の細胞系統の細胞数及び生存率

細胞系統	試験	魚類プロテアーゼ	ほ乳類トリプシン	登録番号534583-22-7の化合物
iPSC	細胞数	0.5×10^{-5}	1.1×10^{-5}	2.95×10^{-5}
	生存率	89.63%	81.4%	92.06%
NPC	細胞数	0.52×10^{-5}	0.49×10^{-5}	0.39×10^{-5}
	生存率	89.9%	86.9%	58.1%
U2OS	細胞数	3.52×10^{-5}	2.1×10^{-5}	4.55×10^{-5}
	生存率	95.1%	100%	96.8%

【００７２】
細胞を、培地を含有する１２ウェル上に再度播種し、１週間後に光学顕微鏡により観察した（図６）。この観察に基づいて、本発明の魚類プロテアーゼで処理された細胞が、形態を変化させなかったことが確認され、正常に見えた。
【００７３】
本発明の方法に従って調製された精製魚類プロテアーゼは、総酵素活性の約６０～８０％のトリプシン活性を特徴とする特異的な酵素プロファイルを表わす。コラゲナーゼ活性は実質的に無視することができる（表８）。
【００７４】

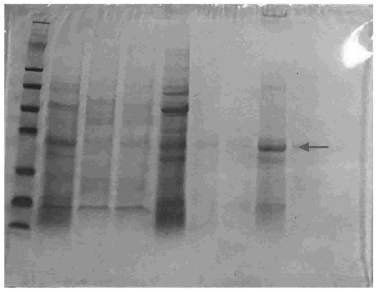
【表８】

表8. 本発明の方法に従って得られた魚類プロテアーゼ対他の市販のプロテアーゼの% 酵素活性

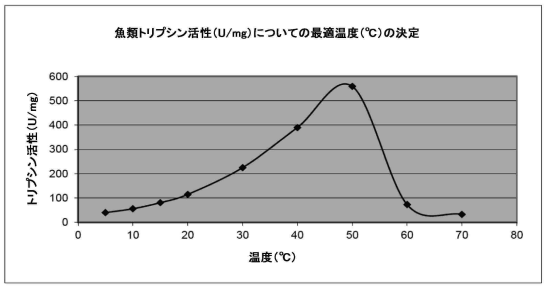
	登録番号534583-22-7の化合物（% 酵素活性）	AccuMax（商標）（% 酵素活性）	Accutase（商標）XL粉末（% 酵素活性）	ダイアフィルトレーション及び凍結乾燥後の魚類プロテアーゼ溶液（% 酵素活性）
トリプシン活性	29	49	26	78,0
キモトリプシン活性	0	0	0	1,6
I型コラゲナーゼ活性	59	47	67	0,01
プロテアーゼ活性	12	5	7	21,0

【図面】

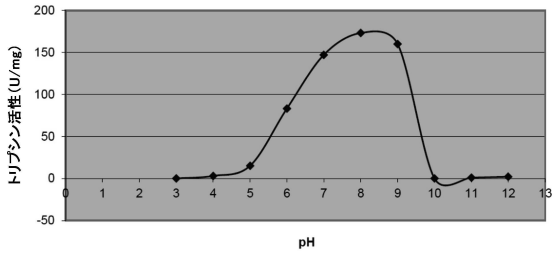
【図１】



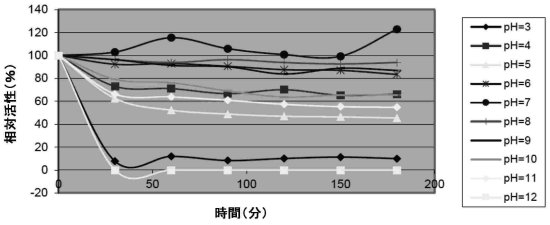
【図２】



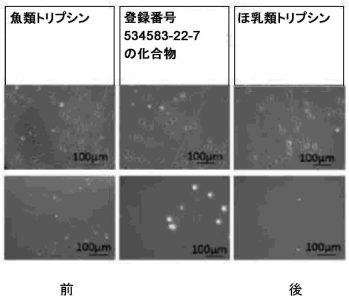
【図３】



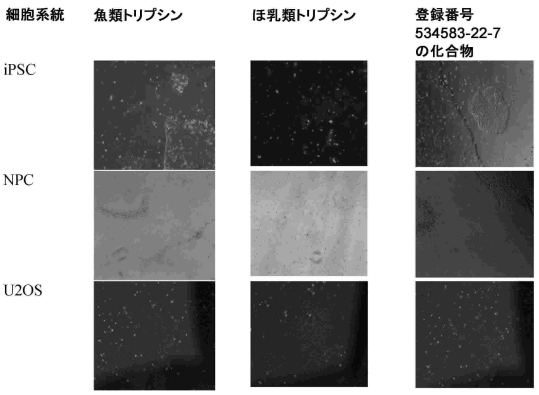
【図４】



【図５】



【図６】



フロントページの続き

(51)国際特許分類　　ＦＩ
Ｃ１２Ｎ　9/76 (2006.01)　　Ｃ１２Ｎ　9/76

(72)発明者　フェラーリ，ヴァレリオ・マリア
イタリア国、２０１２９ ミラノ、ビア・ニーノ・ヴィクシオ ３０
(72)発明者　シッダールタ，ジェイ
スイス国、６８１６ ビッソーネ、ヴィア・カンピョーネ ４８／６

審査官　松田 芳子

(56)参考文献　特表２０１８－５２０７０７（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　９／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）