

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4266817号
(P4266817)

(45) 発行日 平成21年5月20日(2009.5.20)

(24) 登録日 平成21年2月27日(2009.2.27)

(51) Int.Cl.

C 12 N 9/52 (2006.01)

F 1

C 12 N 9/52

請求項の数 29 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-510787 (P2003-510787)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月1日 (2002.6.1)
 (65) 公表番号 特表2004-535197 (P2004-535197A)
 (43) 公表日 平成16年11月25日 (2004.11.25)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2002/006021
 (87) 國際公開番号 WO2003/004628
 (87) 國際公開日 平成15年1月16日 (2003.1.16)
 審査請求日 平成16年10月28日 (2004.10.28)
 (31) 優先権主張番号 101 31 994.0
 (32) 優先日 平成13年7月2日 (2001.7.2)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)
 (31) 優先権主張番号 101 34 347.7
 (32) 優先日 平成13年7月14日 (2001.7.14)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 501335003
 ノルドマルク・アルツナイミッテル・ゲゼルシヤフト・ミト・ペシュレンクテル・ハフツィング・ウント・コンパニー・コマンデイトゲゼルシヤフト
 ドイツ連邦共和国, 25436 ウエーター
 ゼン, ピンナウアレー, 4
 (74) 代理人 100069556
 弁理士 江崎 光史
 (74) 代理人 100092244
 弁理士 三原 恒男
 (74) 代理人 100093919
 弁理士 奥村 義道
 (74) 代理人 100111486
 弁理士 鍛治澤 實

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素の精製方法およびその方法で製造された精製済み酵素並びに該酵素の用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Clostridium histolyticumの過剰発酵物中に含まれる少なくとも1種類の酵素を部分的にまたは完全に精製する方法において、過剰発酵物の酵素をセラミックのヒドロキシリアルパタイトをベースとする第一のクロマトグラフィー材料およびスチレン/ジビニルベンゼンをベースとする第二のクロマトグラフィー材料を専ら使用してクロマトグラフィー法によって分離し、その際に

- a) 該クロマトグラフィー法が、焼結したヒドロキシリアルパタイト材料での第一のクロマトグラフィー処理段階、スチレン/ジビニルベンゼンをベースとするアニオン交換材料での第二のクロマトグラフィー処理段階およびスチレン/ジビニルベンゼンをベースとするカチオン交換体材料での第三のクロマトグラフィー処理段階を含み、それによって焼結ヒドロキシリアルパタイト材料での溶離を少なくとも 200 cm / 時の流速で、スチレン/ジビニルベンゼン材料での溶離を少なくとも 500 cm / 時の流速で実施し、
- b) 第一のクロマトグラフィー処理段階を少なくとも 2 つの溶離段階で実施し、それによってタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼおよびクロストリパインからカゼイナーゼを分離し、

c) 第一のクロマトグラフィー段階からの実質的にカゼイナーゼを含まないフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第二のクロマトグラフィー処理段階に付し、それによってタイプIのコラゲナーゼおよびタイプIIのコラゲナーゼを互いに分離し、

d) 第二のクロマトグラフィー段階からの、タイプIのコラゲナーゼを含むフラクション

10

20

を少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第三のクロマトグラフィー段階に付し、それによってタイプ I のコラゲナーゼをクロストリパインから分離し、

e) 第二のクロマトグラフィー処理段階からの、タイプ II のコラゲナーゼを含むフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第三のクロマトグラフィー処理段階に付し、それによってタイプ II のコラゲナーゼをクロストリパインから分離し、

f) これらのクロマトグラフィー段階を 4 ~ 25 の温度で実施することを特徴とする、上記の方法。

【請求項 2】

クロマトグラフィー法を一段階または多段階で実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

酵素がタイプ I のコラゲナーゼおよび / またはタイプ II のコラゲナーゼおよび / またはクロストリパインおよび / またはカゼイナーゼである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

焼結されたヒドロキシルアバタイトを使用する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 5】

クロマトグラフィー法を、専ら静電気的相互作用および / またはイオン結合および / またはイオン性錯塩結合をベースとする段階を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 6】

クロマトグラフィー法を、少なくとも 1 つのアニオン交換クロマトグラフィー段階および / または少なくとも 1 つのカチオン交換クロマトグラフィー段階および / または少なくとも 1 つのヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー段階を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つのクロマトグラフィー段階が段階的溶離の形で実施される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 8】

クロマトグラフィー法が二または三段階法である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 9】

クロマトグラフィー法が焼結ヒドロキシルアバタイト材料での第一クロマトグラフィー段階、スチレン / ジビニルベンゼンをベースとするアニオン交換材料での第二クロマトグラフィー段階およびスチレン / ジビニルベンゼンをベースとするカチオン交換材料での第三クロマトグラフィー段階を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

第一クロマトグラフィー段階を少なくとも 2 つの溶離段階で実施し、それによってタイプ I のカゼイナーゼおよびタイプ II のコラゲナーゼおよびクロストリパインを分離する、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

第一クロマトグラフィー段階から実質的に遊離されるフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を含む第二クロマトグラフィー段階に付し、それによってタイプ I のコラゲナーゼおよびタイプ II のコラゲナーゼを互いに分離する、請求項 8 ~ 10 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 12】

第二クロマトグラフィー段階からの、タイプ I のコラゲナーゼを含むフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を含む第三クロマトグラフィー段階に付し、それによってタイプ I のコラゲナーゼをクロストリパインから分離する、請求項 8 ~ 11 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

第二クロマトグラフィー段階からの、タイプIIのコラゲナーゼを含むフラクションを少なくとも2つの溶離段階を含む第三クロマトグラフィー段階に付し、それによってタイプIIのコラゲナーゼをクロストリパインから分離する、請求項9～12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】

焼結ヒドロキシリアルアパタイト材料での溶離を少なくとも $200\text{ cm}/\text{時の流速}$ で実施する、請求項1～13のいずれか一つに記載の方法。

【請求項15】

焼結ヒドロキシリアルアパタイト材料での溶離を少なくとも $300\text{ cm}/\text{時の流速}$ で実施する、請求項1～14のいずれか一つに記載の方法。 10

【請求項16】

スチレン/ジビニルベンゼン材料での溶離を少なくとも $500\text{ cm}/\text{時の流速}$ で実施する、請求項1～15のいずれか一つに記載の方法。

【請求項17】

方法がいかなるゲル濾過段階を含まない、請求項1～16のいずれか一つに記載の方法。

【請求項18】

方法がタンパク質沈降段階を含まない、請求項1～17のいずれか一つに記載の方法。

【請求項19】

方法が低分子物質、ホストセルプロテイン、エンドトキシンおよび/または核酸のための低減段階を含む、請求項1～18のいずれか一つに記載の方法。 20

【請求項20】

クロマトグラフィー段階を4～25の間の温度で実施する請求項1～19のいずれか一つに記載の方法。

【請求項21】

遠心分離されたクロマトグラフィー媒体を使用する、請求項1～20のいずれか一つに記載の方法。

【請求項22】

圧安定性クロマトグラフィー材料を使用する、請求項1～21のいずれか一つに記載の方法。

【請求項23】

クロマトグラフィー材料の浄化を濃厚なアルカリ溶液で実施する、請求項1～22のいずれか一つに記載の方法。 30

【請求項24】

クロマトグラフィー段階をカラムクロマトグラフィーとして実施する、請求項1～23のいずれか一つに記載の方法。

【請求項25】

少なくとも 13000 U/g の比活性を有するタイプIIのコラゲナーゼを得る、請求項1～24のいずれか一つに記載の方法。

【請求項26】

少なくとも 3000 U/mg の比活性を有する、タイプIのコラゲナーゼを得る、請求項1～25のいずれか一つに記載の方法。 40

【請求項27】

少なくとも 200 U/mg の比活性を有するクロストリパオインを得る、請求項1～26のいずれか一つに記載の方法。

【請求項28】

少なくとも 1200 U/mg の比活性を有するカゼイナーゼを得る、請求項1～27のいずれか一つに記載の方法。

【請求項29】

それぞれ少なくとも 70% の純度を有するタイプIのコラゲナーゼおよび/またはタイプIIのコラゲナーゼおよび/またはクロストリパインを得る、請求項1～28のいずれか一 50

つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Clostridium histolyticum*の過剰発酵物中に含まれる少なくとも1種類の酵素を精製する方法およびそれに従って製造された精製された酵素並びにその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物の*Clostridium histolyticum*はペプトン含有栄養媒体中で培養した時に、コラゲナーゼ、種々のタンパク質性酵素並びに低分子量成分を含有する複雑な酵素混合物を細胞外で生成する。主成分としては65～125kDの範囲内の分子量および5～6.5の間の等電点を有するタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼ（クロストリジオペプチダーゼA、EC 3.4.24.3）が記載されている（Bond, van Wart; Biochemistry, 1984, 23, 3077-3085）。他の主要成分はほぼ59kDの分子量を有するヘテロダイマーとして存在するSH-プロテアーゼのクロストリパイン（クロストリジオペプチダーゼB、EC 3.4.22.8）およびMALDI-TOFによって測定された34.5kDの分子量を有する悪い性状のいわゆる中性プロテアーゼ（カゼイナーゼ）である。

【0003】

コラゲナーゼは纖維状プロテインのコラゲンのペプチド結合を分解する酵素である。このものは、例えば組織の細胞または細胞結合を分離するために生物化学的におよび医薬的に用いられる。タイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼは、高分子コラーゲンおよび小さい合成物質に関してはその活性において相違している。タイプIのコラゲナーゼは特に大きい分子量のコラーゲンを分解するが、タイプIIのコラゲナーゼは主として合成物質、例えばPZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Wuensch, Heidrich; Z.Physiol. Chem. 333, 1963, 149-151)、His-Pro (Nordwig, Wuensch, Z.Physiol.Chem. 316, 1959, 287)またはPhe-Ala-Leu-Gly-Pro-Ala (van Wart, Steinbrink; Anal.Giochem. 113, 1981, 356-365)と反応する。両方のタイプのコラゲナーゼは逆相クトマトグラフィー(RPC)によっても明らかに相違し得る。

【0004】

米国特許第5,332,503号明細書には、*Clostridium histolyticum*からのコラゲナーゼをクロマトグラフィー的に精製する方法が開示されている。このクロマトグラフィー法は中でもゲル濾過段階、並びに反応性赤色寒天ゲルの使用下の染料/リガンド-アフィニティークロマトグラフィーを包含する。この方法は、GMPに従う条件のもとで医薬的ためにコラゲナーゼを製造するために種々の欠点を有している。例えばこの方法で使用される反応性赤色寒天ゲルはクロマトグラフィー材料のいわゆるブリーディング(bleeding)の危険およびそれに伴う毒性問題を伴う。更にゲル濾過段階は基本的に時間を消費し費用が掛かりそしてあまり効果的な適所での精製を提供しない。このことはこの方法を大規模で使用することを困難にしている。更にこの方法は洗剤を使用する必要があるので、洗浄を有効にするために多大な費用を必要としそして最終生成物に不所望の変化を引き起し得る。最後にこの方法はタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼを分離することができない。

【0005】

文献の米国特許第5,830,741号明細書および米国特許第5,952,215号明細書からはタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼを分離する精製法が公知である。この方法は染料/リガンド-アフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィーおよびアニオン交換クロマトグラフィーを含む。ここでも、アフィニティークロマトグラフィーで使用される染料のブリーディングの危険がある。更に、使用されるクロマトグラフィー材料が比較的に小さい流速しか許容しない。更に全てのクロマトグラフィー段階が傾斜溶離によって行われ、それによってクロマトグラフィー材料に結合する酵素が直線的塩濃度-および/またはpH-傾斜によって溶離される。それ故に結果として公知の方法は極めて

10

20

30

40

50

時間を費やす。

米国特許第5,332,503号明細書からは、粗コラゲナーゼの精製法が公知である。このコラゲナーゼ精製法は、クロストリパイン、トリプシンおよびカゼイナーゼを含めたタンパク質分解酵素のためにコラゲナーゼ、顔料、毒素、細菌材料および不純物を含む安定化された粗コラゲナーゼ溶液の調製を含む。この場合、この安定化されたコラゲナーゼ溶液はヒドロキシルアパタイトカラムに利用され、顔料およびカゼイナーゼは約0.05M～約0.3Mのリン酸塩緩衝剤の最初の溶液で溶離され、そして最初に集めた溶液を得るために、約0.35M～約0.5Mのリン酸塩緩衝剤の第二の溶液でコラゲナーゼ、トリプシンおよびクロストリパインが溶離される。最初に集められた溶液を次いでゲル濾過材料に適用しそしてコラゲナーゼおよびクロストリパインを、第二の集められた溶液を得るためにpH中性の緩衝溶液で溶離する。この第二の集められた溶液を次いで反応性赤色-120-寒天カラム材料に適用しそしてコラゲナーゼを、精製されたコラゲナーゼを得るためにpH中性緩衝溶液で溶離する。この方法は溶離溶液の消費量を減らしかつ予測できない傾斜溶離技術を回避しながら高収率で極めて純粋なコラゲナーゼをもたらす。

従ってこの方法は以下の各段階を有する：

- 安定化されたコラゲナーゼ粗溶液をヒドロキシルアパタイトカラム材料を含むカラム中に導入し；
- ヒドロキシルアパタイトカラム材料から顔料およびカゼイナーゼを、約6～約8のpH値に緩衝された約0.05M～約0.3Mのリン酸塩の第一の溶液および非イオン性界面活性剤で溶離し；
- コラゲナーゼ、クロストリパインおよびトリプシンを、約6～約8のpH値に緩衝された約0.35M～約0.5Mのリン酸塩の第二溶液および非イオン性界面活性剤で溶離して、第一の集めた溶液を得；
- 上述の第一の集めた溶液をゲル濾過材料を含むカラム中に導入し；
- pH中性緩衝剤を含む第三の溶液でコラゲナーゼおよびクロストリパインを溶離して、第二の集めた溶液を得；
- 上述の第二の集めた溶液を、反応性赤色-120-寒天材料を含むカラム中に導入し；そして精製されたコラゲナーゼを含む溶液を得るために、pH中性緩衝剤を含む第四の溶液をコラゲナーゼを溶離する。

この方法では安定化された粗コラゲナーゼから出発しなければならない。

文献 KLOECK GERM ET AL、"Fractions from commercial collagenase preparations (市販のコラゲナーゼ調製物からのフラクション) : Use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas" CELL TRANSPLANTATION, 第5巻、No.5, 1996, 第543-551頁、XP001146029 ISSN: 0963-6897 には糖尿病治療のために単離されたランゲルハウス島の移植に関するものである。臍臓からの島の単離は組織を特別に分離することを必要とする。Clostridium histolyticumからの市販のコラゲナーゼはこの目的のために使用される。しかしながらこの市販の酵素の効力は断定できず、供給者毎に、それどころか供給毎に著しく相違する。これは主としてこれらの固有のコラゲナーゼ活性における相違および他の分解酵素の存在並びに他の不純物に基づいている。この場合、有効なプロテイン成分を不所望の成分から分離するためにおよび分解活性を制御した組成の消化性酵素混合物を製造するために、自由流動領域-電気泳動(FFZE)が使用される。この場合、FFZEによる粗コラゲナーゼの分別は、コラゲナーゼ活性およびトリプシン活性を強化することによって部分的に精製されたプロテインフラクションをもたらしそして痕跡量の中性プロテアーゼしか含有していない。この調製物は豚の臍臓から生きた島をさらけ出すために試験管内試験で非常に有効であると判っている。規定された酵素組成物を用いてこのコラゲナーゼの製造を大規模化するためには、Clostridium histolyticumからの市販のコラゲナーゼの二つの異なる供給物(一つは島の分離に有効である供給物でありそしてもう一つは無効なものである)をヒドロキシルアパタイトでのFPLC-クロマトグラフィーを使用して分別してきた。その場合、臍臓組織から島の露出部の高い効力は高いトリプシン-およびコラゲナーゼ固有活性および僅かな百分率の中性プロテアーゼに関係していた。この

10

20

30

40

50

分析で開発されたクロマトグラフィープロトコルは不活性コラゲナーゼを、島の分離を成功させることを可能とする調製物に変換する。

文献BOND M D ET AL: "PURIFICATION AND SEPARATION OF INDIVIDUAL COLLAGENASES E C-3.423.3 OF CLOSTRIDIUM HYSTOLYTICUM USING RED DYE LIGAND CHROMATOGRAPHY" BIOC HEMISTRY, 第23巻, No.13, 1984、第3077-3085 頁、XP002232416 ISSN: 0006-2960 では、*Clostridium histolyticum*の個々のコラゲナーゼの精製分離が赤色染料を用いてアフィニティーコロマトグラフィーを使用することが判る。この場合には操作が次の様に行われる。

*Clostridium histolyticum*の培養炉液中に存在する6種類のコラゲナーゼを均一になるまで精製した。褐色の顔料、およびカゼイン、ベンゾイル-L-アルギニン-エチルエステルおよびエラスチンに対して活性である汚染性プロテイナーゼの大部分はヒドロキシルアパタイト、Sephacryl S-200 およびL-アルギニン-Affi-ゲル202 を含むクロマトグラフィーによって除かれる。反応性赤色 - 120 - 染料アフィニティーコロマトグラフィーは、非常に類似した物理化学的性質を有するコラゲナーゼを4つの分別物に分離する。完全精製はD E A E - セルロースおよびSP-Sephadex を含むクロマトグラフィーによって実施される。6種の全てのコラゲナーゼ(その精製の順番で 、 、 、 、 および と称する) はコラゲンに対して高い活性を示しそして他のタンパク質分解活性は示さない。いずれもドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド-ゲルにシングルバンドを示す。同じ分子量および同じ活性を有するが、異なる等電点を有する - および - 酵素の2種類の異なる亜類が分離される。他のコラゲナーゼの場合には若干小さい明瞭な微小不均一がある。中性のコラーゲンに対するおよび合成ペプチドの2-フランアクリロイル-L-ロイシルグリシル-L-プロリル-L-アラニン(FALGPA)に対するその活性のために、これらの6種のコラゲナーゼは2つのクラスに分類される。第一のクラスのコラゲナーゼ(、 および)は高いコラゲナーゼ活性および中位のFALGPA-活性を有しており、他方第二のクラスのコラゲナーゼ(、 および)は中位のコラゲナーゼ活性および高いFALGPA-活性を有している。従ってこの精製および分離法は赤色染料を用いてアフィニティーコロマトグラフィーを使用して実施される。

文献ROUNDS M A ET AL: "Poly(styrene-divinylbenzene)-based strong anion-exchange packing material for high-performance liquid chromatography of proteins (プロテインを高性能液体クロマトグラフィーするためのポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)-ベースの強アニオン交換性充填材料)" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. NETHERLANDS 、第397巻、1987年6月26日、第25-38頁、XP002087598 ISSN; 0021-9673 に開示された方法は、以下の様にして得られるプロテインをHPLC-クロマトグラフィー処理するためのポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)-ベースのアニオン交換体カラム材料を取り扱っている。即ち、吸着されたポリエチレンイミン被覆物はスルホン化されたマクロ細孔のポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)粒子に担持されている。得られる強アニオン交換体カラム材料の物理的-共化学的な特性およびクロマトグラフィー特性が注意深く測定された。実験材料の動的結合能力は大きな孔径を持つ二酸化珪素のそれに匹敵する。プロテイン質量および酵素活性が良好に回復された。新規のカラムは異なる精製法および水性塩基との長期間の接触に対して耐久性がある。ポリスチレンをベースとするカラムでの滞留時間は二酸化珪素カラムおよび市販のポリマー性強アニオン交換体カラム中の滞留時間と同様である。カラム材料のクロマトグラフィー溶解性は他の両方のカラム材料のそれと同じであるかまたは強い。

文献のLEONARD M ET AL: "Polyvinyl alcohol-coated macroporous polystyrene particles as stationary phases for the chromatography of proteins (プロテインをクロマトグラフィー処理するための固定相としてのポリビニルアルコール被覆されたマクロ細孔ポリスチレン粒子)" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B BIOMEDICAL APPLICATIONS, 第664巻、第1号、1995、第39-46頁、XP004043704 は、ポリビニルアルコールで被覆されたマクロ細孔ポリスチレン粒子を、プロテインをクロマトグラフィー処理するための固定相として取り扱っておりそしてポリビニルアルコール(PVA)を吸着することによってマクロ細

10

20

30

40

50

孔ポリ(スチレンジビニルベンゼン)(PS-DVB)粒子を親水性化する方法を開示している。PVAはPS-DVB-表面に強く吸着されるが、プロテイン溶液に委ねた時に一部が再び脱着される。この問題を克服するために、吸着されたポリマー層は架橋によって安定化された。我々は吸着されたPVAの量、ポリマー層の安定化および牛血清アルブミンの強疎水性プロテインに関する親水性化の効果へのポリマー吸着および架橋条件影響について報告する。被覆された担体の性質はサイズ排除クロマトグラフィーによっても測定された。これは、PVA被覆が疎水性相互作用を著しく低減することを示している。変性されたPS-DVB粒子の孔の大きさは吸着されたPVAの量の増加と共に著しく減少することを突き止めた。

文献のNASH D C ET AL: "Modification of polystyrenic matrices for the purification of proteins effect of the adsorption of poly(vinylalcohol) on the characteristics of poly(styrene-divinylbenzene) beads for use in affinity chromatography (アフィニティークロマトグラフィーで使用するためのポリ(スチレンジビニルベンゼン)ビーズの性質への、ポリビニルアルコールが吸着したことのプロテイン効果の精製のポリスチレンマトリックスの変性)"、JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, 第758巻、No.1, 1997年1月10日、第53-64頁、XP004034014 ISSN: 0021-9673はプロテインを精製するためにポリスチレンマトリックスを変性することを開示しており、そしてアフィニティークロマトグラフィーで使用するためのポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)粒子の性質へのポリ(ビニルアルコール)の吸着の影響に関し、その際にこの方法は以下の通り進行する：ポリ(スチレンジビニルベンゼン)-(PSDVB)-クロマトグラフィーマトリックスのCG1000-sd(TosoHaas)は、プロテインを選択的に精製するために官能基を付加するのに適するマトリックスを生成するために、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)を使用して変性されている。変性されたマトリックスの性質はBET-窒素吸着/脱着技術を用いて検査されそしてPVAの吸着が粒子のマクロ細孔を充填させるが、他方、粒子のマクロ細孔が実質的に変化しないままであることが確認された。変性されたマトリックスの所でのプロテインの吸着は発生しなかった。染料リガンド(Procion Blue MX-R)はPVA-PSDVB-マトリックスに共有結合しそしてPVA-PSDVB-マトリックスのリゾチム(Iysozyme)能力を測定した。このマトリックスは市販のBlue Sepharose Fast Flow、即ち架橋した寒天をベースとするアフィニティーマトリックスに匹敵する。染料-PVA-PSDVB-マトリックスは水酸化ナトリウムでの浄化に対して安定していると言われている。

【0006】

このような技術背景に対して、本発明の課題は従来技術の上述の欠点を克服する、Clos tridium histolyticumの少なくとも1種類の細胞外の主要酵素を分離しそして精製する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

この課題は請求項1に記載の特徴を有する方法によって解決される。

従って本発明の方法は、過剰発酵物の酵素をセラミックのヒドロキシルアパタイトをベースとする第一のクロマトグラフィー材料およびスチレン/ジビニルベンゼンをベースとする第二のクロマトグラフィー材料を専ら使用してクロマトグラフィー法によって分離し、その際に

- a) 該クロマトグラフィー法が、焼結したヒドロキシルアパタイト材料での第一のクロマトグラフィー処理段階、スチレン/ジビニルベンゼンをベースとするアニオン交換材料での第二のクロマトグラフィー処理段階および場合によってスチレン/ジビニルベンゼンをベースとするカチオン交換体材料での第三のクロマトグラフィー処理段階を含み、それによって焼結されたヒドロキシルアパタイト材料での溶離を少なくとも200cm/h、好ましくは少なくとも300cm/hの流速で、スチレン/ジビニルベンゼン材料での溶離を少なくとも500cm/h、好ましくは少なくとも1000cm/hの流速で実施し、
- b) 第一のクロマトグラフィー処理段階を少なくとも2つの溶離段階で実施し、それによってタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼおよびクロストリパインから中性のプロテアーゼ(カゼイナーゼ)を分離し、

10

20

30

40

50

c) 第一のクロマトグラフィー段階からの実質的にカゼイナーゼを含まないフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第二のクロマトグラフィー処理段階に付し、それによってタイプ I のコラゲナーゼおよびタイプ II のコラゲナーゼを互いに分離し、

d) 第二のクロマトグラフィー段階からの、タイプ I のコラゲナーゼを含むフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第三のクロマトグラフィー段階に付し、それによってタイプ I のコラゲナーゼをクロストリパインから分離し、

e) 第二のクロマトグラフィー処理段階からの、タイプ II のコラゲナーゼを含むフラクションを少なくとも 2 つの溶離段階を持つ第三のクロマトグラフィー処理段階に付し、それによってタイプ II のコラゲナーゼをクロスチルパインから分離し、

f) これらのクロマトグラフィー段階を 4 ~ 25 の温度で実施することを本質とする。

10

Clostridium histolyticum の過剰発酵物の酵素をスチレン / ジビニルベンゼンをベースとするおよび / または特にセラミックのヒドロキシルアパタイトをベースとするクロマトグラフィー材料を専ら使用して一段階または好ましくは多段階クロマトグラフィー法によって分離することによって非常に迅速でかつ費用的に有利な酵素精製が実現できる。それによって、毒性的に危険な物質が存在しないために特に医薬および / または生化学において使用するのに適している高純度の酵素が得られる。この方法はいかなる生成物も接触する段階を必要としない。このことは薬剤の領域で使用するのに特に有利である。これは無菌のコラゲナーゼ酵素を製造するのに使用することができる。この場合、スチレン / ジビニルベンゼンは、ジビニルベンゼンで網状架橋したポリスチレンよりなるコポリマーを意味する。最も異なる官能基でこのベースマトリックスを置換するので、これら材料へのプロテインの結合およびそれ故のそれらの分離が可能である。官能基の選択次第で色々な結合メカニズムおよび分離メカニズム、例えばカチオン - またはアニオン交換メカニズムが利用できる。これに対して、ヒドロアパタイトは、イオン的静電気交換並びに強いイオン性錯塩結合のためにプロテイン結合を許容する総合式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表されるリン酸カルシウムである。しかしながら、ヒドロキシルアパタイトへのプロテインの結合メカニズムは詳細には未だ判っていない。

20

【 0008 】

使用されるクロマトグラフィー材料は良好な分離特性を有し、早い流速に調節することを可能とし、その結果非常に短い精製時間をもたらす。これは特に、本発明の特に有利な実施態様によれば、焼結されたセラミックのヒドロキシルアパタイトを利用する場合に有利である。セラミックのヒドロキシルアパタイトを利用することは不焼結の（結晶質の）ヒドロキシルアパタイトに比べて、材料を再現性をもって製造することができそしてその多孔質の構造のために非常に低い背圧しか生じないという長所を有している。その結果、カラムが損傷する危険が減少そして高い線流速が可能となる。焼結したヒドロキシルアパタイト材料からの溶離は好ましくは少なくとも 200 cm/時、特に好ましくは少なくとも 300 cm/時の流速で実施される。ポリマーのスチレン / ジビニルベンゼン材料の場合にはそれどころか少なくとも 500 cm/時、特に好ましくは少なくとも 1000 cm/時の流速が有利である。処理時間はこの様に公知の方法に比べて著しく短くすることができる。

30

【 0009 】

更なる処理時間の短縮並びに処理経費の合理化は、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー段階、殊に全てのクロマトグラフィー段階を段階的溶離として実施することによって達成される。傾斜溶離に比べてこれによって更に溶離剤の節約およびそれに伴う高価な緩衝物質の節約を達成することができる。傾斜の発生は方法の規模において問題がある。

40

【 0010 】

本発明の有利な一つの実施態様によれば、クロマトグラフィー材料は、個々のクロマトグラフィー段階が静電気的相互作用および / またはイオン結合 - および / またはイオン性錯塩結合を専らベースとする様に選択される。この方法は特に有利には少なくとも 1 つのアニオン交換クロマトグラフィー段階および / または少なくとも 1 つのカチオン交換クロマトグラフィー段階および / または少なくとも 1 つのヒドロキシルアパタイト - クロマト

50

グラフィー段階を含む。特に有利な結果は、第一クロマトグラフィー段階が焼結ヒドロキシルアパタイト材料で、第二クロマトグラフィー段階がスチレン／ジビニルベンゼンをベースとするアニオン交換材料でそして第三クロマトグラフィー段階がスチレン／ジビニルベンゼンでベースとするカチオン交換材料で実施される3段階クロマトグラフィー法で得られる。その際に上記の順序が有利であるが、別の順序も可能であり、即ち段階数も変更し得る。

【0011】

本発明の方法は従って有利にも、時間消費および多大な経費を必要とするゲル濾過段階を含まず、それによって分離すべき酵素の自己消化の危険が減少する。ゲル濾過の省略は更に4～25の広い温度範囲、要するに室温でも各クロマトグラフィー段階を実施することを可能とする。更にこの方法はいかなるアフィニティーコロマトグラフィー段階を包含しておらず、その結果ブリーディングの危険、クロマトグラフィー材料のアフィニティーリガンドの洗去の危険も存在しない。更に本発明の方法には、プロテインの不所望の構造変化を引き起し得るいかなるプロテイン沈殿段階もない。これによって、多大なプロセス経費を必要とする後での除去を必ず伴う洗剤またはカオトロピック物質（硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール等）を使用しないでよいという長所がもたらされる。

【0012】

使用されるクロマトグラフィー材料は更に、化学的に十分に不活性でありそして比較的高濃度のアルカリ溶液、例えば3モル濃度の苛性ソーダで精製することができるという長所も有する。このことは非常に効果的な精製を保証しそしてそれ故に材料の機能保持並びに方法の良好な再現性を保証する。更にクロマトグラフィー材料の高い圧安定性は高圧液体クロマトグラフィー法（HPLC）で使用することを許容する。毒生物学的に危険な方法起因物質、例えばアフィニティーリガンドまたは洗剤が存在しないので本発明に従って精製されたプロテイン、特にタイプIおよび/またはタイプIIのコラゲナーゼおよび/またはクロストリパインおよび/または中性プロテアーゼ（カゼイナーゼ）は薬剤的または生化学的目的に特に有利に使用できる。

【0013】

本発明の別の特に有利な実施態様は、従属形式の残りの請求項の特徴部分にある。

【0014】

更に本発明は、この方法に従って精製された請求項30および31の酵素並びにこの方法に従って製造される請求項32に従う酵素の用途に関する。

【0015】

図面の簡単な説明：

以下に本発明を、図1を用いて例示的に説明する。

【0016】

本発明および本発明を実施するための特に有利な実施態様の詳細な説明：

動物または植物起源の発酵媒体中で*Clostridium histolyticum*の培養を行った後に、細胞およびその他の不溶成分を例えば遠心分離または濾過によって過剰発酵物から分離する。主成分としてタイプIおよびタイプIIのコラゲナーゼ、クリストリパインおよびカセイナーゼを含有する過剰発酵物はこれらプロテインのクロマトグラフィー分離の前に通例の様に濃縮することができる。

【0017】

過剰発酵物を方法の第一段階で、タイプIまたはタイプII（CHT）のセラミックのヒドロキシルアパタイト材料を充填したクロマトグラフィーカラムにポンプ供給し、それによつて上記の酵素が種々の他の成分の他にヒドロキシルアパタイトに結合する。4～25

の温度および6～9のpH値において段階的溶離によって>300cm/時の線流速で溶離される。この場合、0～1000mMのアルカリハロゲン化物を含有するリン酸塩緩衝液が適しており、その際にリン酸塩濃度はリン酸塩10mMから350mMまで徐々に増加する。選択的にまたは追加的に緩衝液のpH値は6から9まで徐々に上昇され得る。3つの溶離段階を実施するのが有利である。第一溶離段階で得られるフラクション1は専ら

10

20

30

40

50

低分子量成分を含有している。第二溶離段階のフラクション2は低分子量成分の他に中性プロテアーゼ(カゼイナーゼ)も含んでいる。第三溶離段階のフラクション3は低分子量成分も含み、全てのクロストリパイン並びにタイプIおよびタイプIIの全てのコラゲナーゼを含んでいる。

【0018】

フラクション3は例えば限外濾過/ダイアフィルタレーション(diafiltration)によつてまたはナノ濾過または透析によって脱塩されそして場合によっては濃縮される。次いでこの脱塩溶液をアニオン交換クロマトグラフィーの第二のクロマトグラフィー段階に付す。この目的のために、例えば第四アンモニウム基で官能化されているスチレン/ジビニルベンゼンをベースとするクロマトグラフィー材料を使用する。この場合、市販の材料を使用することができる(例えばPharmacia社のSource、PerSeptive社のPOROS、Biorad社のMakroprep)。フラクション3をアニオン交換体に負荷する場合には、カチオン性または非イオン性の、低分子量成分の分離を行う。結合した成分の溶離は7~9.5のpH域で緩衝された系において4~25で500cm/時以上の線流速で段階溶離で行い、それによつて1~1000mMのアルカリ-またはアルカリ土類金属ハロゲン化物濃度が徐々に変化しある/またはpH値が9.5~6で徐々に変化する。好ましくは2つのフラクションが分離され、それによって第一溶離段階のフラクション4はクロストリパインおよびタイプIIのコラゲナーゼを含有しておりそして第二溶離段階のフラクション5も同様にクロストリパイン並びにタイプIのコラゲナーゼを含有している。

【0019】

フラクション4および5は第三クロマトグラフィー段階でカチオン交換クロマトグラフィーに互いに別々に委ねる。この場合、同様にスチレン/ジビニルベンゼン材料をベースとするカラム充填物を使用する。しかしながらこのものはカチオン結合性基、例えばSO₃Hで官能化されている。ここでも上述の市販材料を使用することができる。カチオン交換体の溶離は緩衝系において4~25で5.7~7のpH域で少なくとも500cm/時の線流速で段階的に実施する。この場合、溶離緩衝液を0~300mMのアルカリ金属-あるいはアルカリ土類金属ハロゲン化物濃度ある/または5~7pH値に段階的に調整する。溶離は好ましくは二段階で実施し、それによって第一溶離段階ではそれぞれコラゲナーゼがそして第二溶離段階でクロストリパインが得られる。

【0020】

実施例:

Clostridium histolyticumの培養は動物-または植物栄養培地の使用下に標準的方法に従い液体培養で所望の細胞濃度まで培養する。通例の方法、例えば遠心分離または濾過によって細胞を分離した後に、2000mLの濃厚な過剰発酵物を300cm/時の線流速で、1700mLのタイプIのセラミックのヒドロキシルアパタイト-が充填されたクロマトグラフィーカラムにポンプ搬送する。ヒドロキシルアパタイト-カラムに結合した成分を20~25で300cm/時の線流速で三段階でリン酸塩緩衝液で溶離し、その際にリン酸塩濃度が段階的に高められる。第一溶離段階で10mMのリン酸塩緩衝液/100mM(NaCl)で約10CV(カラム容積)で溶離し、その際に主として低分子量成分を含有するフラクション1が得られる。次いで60mMのリン酸塩緩衝液/100mM(NaCl)で約3CVで溶離し、フラクション2を得る。このフラクション2はカゼイナーゼおよび同様に低分子量成分を含有している。第三の溶離段階のために200mMのリン酸塩緩衝液/100mM(NaCl)を用いて約5CVで溶離する。この様にして集められたフラクション3は酵素のクロストリパイン、およびタイプIおよびタイプIIの全部のコラゲナーゼを含有している。フラクション2は脱塩され、冷凍乾燥する。カゼイナーゼからの低分子量成分の分離は場合によっては標準法を用いて達成できる。

【0021】

フラクション3は限外濾過/ダイアフィルタレーションまたはナノ濾過または透析によって脱塩処理しそして場合によっては濃縮する。次いでフラクション3を適当な緩衝液でpH9.0~9.3に調整する、例えば500mMのトリス(Tris)でpH9.0~9.3

10

20

30

40

50

に調整する。緩衝された液を、アニオン交換体として官能化されたスチレン／ジビニルベンゼン - カラム（POROS 50 P I ; PerSeptive社）に通して約1000 cm / 時の線流速で20 ~ 25 でポンプ供給する。次いで約5 CVのトリス緩衝液でこのカラムを洗浄する。溶離を20 ~ 25 および約1000 cm / 時の線流速で2つの溶離段階において塩濃度を増加させながら行う。フラクション4は40 mMのトリス（緩衝液）/ 6 mMのCaCl₂ / 30 mMのNaClを用いてpH 9.0 ~ 9.3で溶離することによって得そしてこのものは酵素のクロストリパインおよびタイプIIのコラゲナーゼを含有している。同様にクロストリパイン並びにタイプIのコラゲナーゼを含有するフラクション5が2番目の溶離段階で40 mMのトリス / 6 mMのCaCl₂ / 70 mMのNaClでpH 9.0 ~ 9.3で溶離することによって得られる。

10

【0022】

フラクション4および5は例えば50 LのH₂Oに対しての24時間の透析によって脱塩処理しそして50 mMのMES - 緩衝液を用いてpH 5.9 ~ 6.1に調整する。両方のフラクションをスチレン／ジビニルベンゼン材料（例えばPerSeptive社のPOROS 50 HS）の入ったカチオン交換カラムでのクロマトグラフィー処理して互いに分離する。この目的のために各フラクションを約700 cm / 時の線流速で20 ~ 25 でカラムに導入しそして同じ条件で溶離する。フラクション4からのタイプIIのコラゲナーゼあるいはフラクション5からのタイプIのコラゲナーゼの溶離はそれぞれ第一溶離段階で10 mMのMES - 緩衝液 / 20 ~ 40 mMのNaClで、pH 5.9 ~ 6.1で20 ~ 25 で行う。両方のフラクションからのクロストリパインを次いでそれぞれ10 mMのMES - 緩衝液 / 90 ~ 110 mMのNaClでpH 5.9 ~ 6.1で溶離する。クロストリパインを含む溶液を一緒にする。全ての溶液を脱塩処理し、2 mMのCaAc₂で透析処理し、次いで凍結乾燥する。

20

【0023】

こうして得られる酵素のそれぞれの酵素活性の測定は公知の方法に従って行う（表参照）。更に酵素のタイプIのコラゲナーゼ、タイプIIのコラゲナーゼおよびクロストリパインの純度を逆相クロマトグラフィーによって測定する。結果を以下に表に総括掲載する。

【0024】

【表1】

	活性	純度 e
タイプIIのコラゲナーゼ	18100 U/g ^a	約 82 %
タイプI のコラゲナーゼ	5180 U/mg ^b	約 85 %
クロストリパイン	322 U/mg ^c	約 90 %
中性プロテアーゼ	1560 U/mg ^d	

30

【0025】

a : Wuensch E., Heidrich H.-G.: Z.Physiol. Chem. 333, 149-151, 1963に従って測定。
。

b : Doi, Shibata, Matoba; Anal. Biochem. 118, 173-184, 1981に従って測定。

c : Mitchel, Harrington; Methods Enzymol., 19, 635-642, 1970に従って測定。

d : Mooren, Stein; Biol.Chem. 176, 367, 1948に従って測定。

e : RPCに従って測定。

40

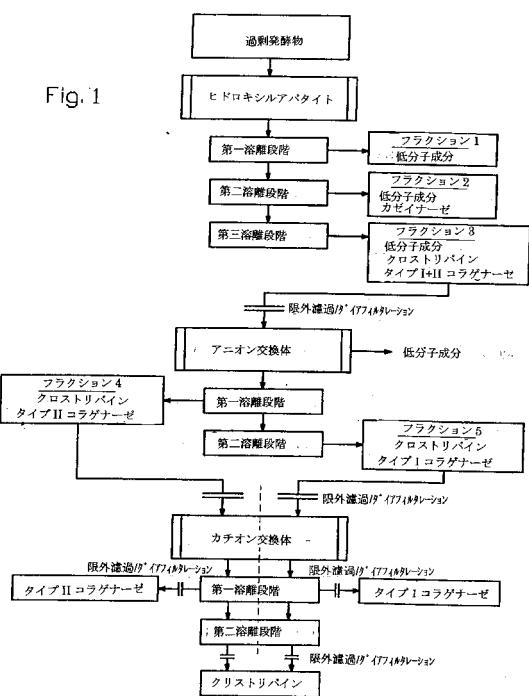
50

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は本発明の一つの実施態様を図示する工程図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 クアフルスト・マンフレート
　　ドイツ連邦共和国、モールレーゲ、キルヒエンストラーセ、24
(72)発明者 シュミッドバウアー・シュテファン
　　ドイツ連邦共和国、ラーンタール、アム・ホファッカー、35

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特表平11-504225(JP,A)
特表平08-509605(JP,A)
Biochemistry, 1984, Vol. 23, p. 3077-3085
Journal of Chromatography A, 1997, Vol. 758, p. 53-64
Journal of Chromatography, 1987, Vol. 397, p. 25-38
Journal of Chromatography B, 1995, Vol. 664, p. 39-46

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/00-9/99
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)