

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4139215号  
(P4139215)

(45) 発行日 平成20年8月27日 (2008. 8. 27)

(24) 登録日 平成20年6月13日 (2008. 6. 13)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 35/68 (2006. 01)** A 6 1 K 35/68  
**A 6 1 K 38/46 (2006. 01)** A 6 1 K 37/54  
**A 6 1 K 9/02 (2006. 01)** A 6 1 K 9/02  
**A 6 1 K 9/08 (2006. 01)** A 6 1 K 9/08  
**A 6 1 K 9/10 (2006. 01)** A 6 1 K 9/10

請求項の数 6 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-538965 (P2002-538965)  
(86) (22) 出願日 平成13年11月2日 (2001. 11. 2)  
(65) 公表番号 特表2004-512375 (P2004-512375A)  
(43) 公表日 平成16年4月22日 (2004. 4. 22)  
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/012740  
(87) 国際公開番号 W02002/036156  
(87) 国際公開日 平成14年5月10日 (2002. 5. 10)  
審査請求日 平成16年11月1日 (2004. 11. 1)  
(31) 優先権主張番号 100 54 239.5  
(32) 優先日 平成12年11月2日 (2000. 11. 2)  
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 502210459  
シリアン アクチエンゲゼルシャフト  
ドイツ連邦共和国 デー4 8 1 4 9 ミュ  
ンスター ヨハン・クラネーヴェグ 4  
2  
(74) 代理人 110000109  
特許業務法人特許事務所サイクス  
(72) 発明者 ハートマン マルクス  
ドイツ連邦共和国 4 8 1 5 9 ミュン  
スター ガッセルシュティエゲ 3 8

審査官 菊池 美香

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消化を促進するための薬剤としての織毛虫から得られた酵素の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リパーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、グリコシダーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホス  
ファターゼからなる群から選ばれる、織毛虫からの酵素を含む消化系疾患治療用薬剤。

【請求項 2】

前記酵素が、pH 4 - 6 で最適 pH 値を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の薬  
剤。

【請求項 3】

前記酵素が、テトラヒメナ属、コルピジウム属、およびゾウリムシ属から得られるこ  
とを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の薬剤。

【請求項 4】

薬学的補助剤およびキャリアーを更に含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか  
に記載の薬剤。

【請求項 5】

タブレット、マイクロベレット、油、ジュース、ゲル、座薬、カプセル、被覆されたタ  
ブレットの状態であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の薬剤。

【請求項 6】

前記消化系疾患が、薬剤によって引き起こされる消化不良、慢性萎縮性胃炎、慢性膵炎  
、急性膵炎、手術によって引き起こされる消化系疾患（消化不良）によるか、または囊胞  
性線維症によって引き起こされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、消化系疾患の治療のための、織毛虫からの酵素を含む薬剤に関する。

## 【0002】

消化系疾患は、一般医療および内科医療において果たす役割がますます大きくなっている。多くの場合、そのような消化系疾患は、いわゆる膵酵素の多少顕著な不足の結果である。健康な状態では、これらの酵素は、高度に特殊化された細胞、いわゆる小葉(acinic cell)によって膵臓で合成され、そして、体液腺(juice glands)および膵管を通じてエキソサイトーシスによって十二指腸内へ分泌される。膵臓の分泌物の一日の量は、約2リットルである。脂肪を消化するリパーゼの他に、膵臓の分泌物は、蛋白質(トリプシン、キモトリプシン、およびカルボキシペプチダーゼ)、ならびに、炭水化物(α-アミラーゼ)の消化のための酵素も含む。膵酵素の分泌は、ガストリン、セクレチン、およびパンクレオチミンのようなホルモンによる内因性制御メカニズムによって正確に制御される。この制御システムは、膵酵素の分泌の減少または外分泌性膵臓機能の完全な消滅(subsiding)を引き起こす、多数の原因によって妨害され得る。これもまた、小腸において糜汁が消化されず、消化系疾患が起こることの原因となる。外分泌性膵臓機能不全とも呼ばれる、消化管の疾患は、異なる原因を有し得る。薬剤によって引き起こされる消化不良の他に、アルコール消費によってしばしば引き起こされる慢性萎縮性胃炎および慢性膵炎、手術(例えば、ビルロート(Billroth) IおよびII、迷走神経切断、膵臓切除)によって引き起こされる疾患、ならびに、嚢胞性線維症は、膵臓機能不全の病因(etiological factors)である。いずれにせよ、それら症状は、しばしば患者を目立たなくし(nondescript)、そして平均寿命(expectation of life)を短くするため、慢性消化系疾患は、社会医学的に非常に重要であり、そのため、経済的に重要である。

## 【0003】

膵臓由来の消化系疾患は、下痢、大量の排泄物(mass stools)、満腹感(sensations of repletion)、上腹部の病気、体重の減少等のような多くの病気を患者に引き起こす。

## 【0004】

膵臓由来の消化系疾患または膵臓機能不全の原因および徴候にかかわらず、酵素による補充療法(substitution therapy)は、消化系疾患を和らげるために常に必要である。このことは、酵素、主に、リパーゼ、プロテアーゼおよびアミラーゼ、更にそれだけでなく他の酵素、の欠乏は、外部から補わなければならないことを意味する。治療中、酵素は、主に食事の最中に、患者に経口で摂取され、胃を通過し、小腸へ到達し、そこで、それらは、糜汁の消化を行い、そのため、不足している内因性膵酵素の機能を身につける。また、それら酵素は、溶腸性製剤へ供給されなければならない、小さな粒径を有さなければならない、そして、消化管中で完全に生物学的に利用可能でなければならない。

## 【0005】

膵酵素、特に、主要な酵素であるリパーゼおよびプロテアーゼ、の欠乏に基づく消化系疾患の治療のために、幅広い種類の酵素調製物が、常に市場に出ている。これらは、調製物コンビジム(Combizym)(登録商標)、フェスタル(Festal)(登録商標)、パンクレオン(Pankreon)(登録商標)、クレオン(Kreon)(登録商標)、パンジトラット(Panzytrat)(登録商標)、メテオジム(Meteozym)(登録商標)、もしくはエンザイム-レファックス(Enzym-Lefax) N(登録商標)のような豚からの膵酵素、または、シトラペプシン(Citrapepsin)(登録商標)のような胃の酵素に基づいている。ある程度、それら調製物は、コンビジム(Combizym)(登録商標)およびフェスタル(Festal)(登録商標)のような、カビ抽出物からの酵素も含み得る。

## 【0006】

更に、魚または他の海洋動物からの酵素の使用(FR No. 1015566)、ならびに、オキアミ(オキアミ類(class Euphausiacea)からの甲殻類動物)およびカラフトシシャモ(US 4,695,457)の胃腸管からの酵素の組成物が、一般的に記載されている。膵酵素を含む調製物は、屠殺場の廃棄物、例えば、豚の膵臓、から主に得られる。調製工程の最終生成物は

10

20

30

40

50

、パンクレアチンである。パンクレアチンは、(通常、豚からの)膵臓組織の細胞からの均質化物(homogenizate)である。多数の小葉の破壊により、それは、膵酵素のほかに、広範な種類の他の酵素および蛋白質、ならびに、更なる高分子量および低分子量化合物を含む。パンクレアチンの合成(composition)は、その工業的調製工程によるものである。パンクレアチンを得るために、豚の膵臓を、屠殺後できるだけ迅速に冷凍し(deep-frozen)、回収し、そして機械的に破壊する。酵素の安定化および活性化のために、様々な添加物を、均質化物に添加する。この後、アセトンのような有機溶媒によって脱脂し、繊維性物質を除去し、そして凍結乾燥によって脱水乾燥する。特定の投与形態の調製物に対して、更なる本草薬的(galenic)処理を行い、マイクロペレット、タブレット、カプセル、ペースト、クリーム、ゲル、油および他の調製物にすることもできる。しばしば、パンクレアチンは、様々な支持材および緩衝物質と混合される。更に、粒状パンクレアチンは、ヒトの胃液の低pHに対する保護のために、酸に安定なフィルムまたはラッカーによって被覆される。後者の2つの処理段階は、酸に不安定な膵酵素が、ターゲット部位、十二指腸(小腸)において、それらの消化機能を果たすことを保証すべきである。

10

## 【0007】

パンクレアチンの通常の調製物の他に、最終生成物中のリパーゼ含有量は、クロロホルム、ブタノールおよびアセトンによる連続抽出によって増加され得る。パンクレアチンと同様に、酵素組成物は、オキアミ種のオーファウシア・スベルバ(*Euphausia suberba*)およびカラフトシヤモ(US-A-4,695,457参照)から得られる。この場合も、均質化物は、組織から最初に調製され、次いで、遠心分離、クロロホルムによる抽出、凍結乾燥、およびクロマトグラフィー段階によって更に精製される。それぞれの場合に、処理の目的は、リパーゼ、プロテアーゼ、および - アミラーゼのような膵酵素の、できるだけ高い含有量である。更に、酵素組成物は、消化系疾患の治療のために、胃液に対してできるだけ耐性を有すべきである。また、酵素は、消化管中で、特に、十二指腸において、できるだけ迅速に放出され、それらの生理学的活性を示すべきである。アレルギーを回避するために、酵素組成物は、可能であれば、効果のない蛋白質を含まないべきであり、または、高い純度を有すべきである。また、調製工程は、製薬経済の(pharmaceutical)局面において、安価であるべきである。

20

## 【0008】

パンクレアチンについては、クロマトグラフィー法による更なる精製は通常行われないので、所望の酵素は、精製されても均質化されてもいない状態で得られる。細胞均質化物からの、このような蛋白質混合物の欠点は、それらが、豚の膵臓細胞の細胞内の細胞区画(サイトソル、核、細胞器官の膜)からの広範な種類の蛋白質を含むという点である。これらは、酵素活性を有さないか、または、所望の酵素活性を有さず、そのため、供給される投与形態当たりの活性物質の量を低減させる。同じことは、オキアミまたはカラフトシヤモの胃腸管からの濃縮された細胞均質化物が得られる場合に当てはまる。

30

## 【0009】

屠殺場の廃棄物(魚の膵臓、胃腸管)およびオキアミからの酵素および酵素組成物の調製の別の欠点は、連続しない回収工程の方式である。通常、器官(膵臓)は、異なる段階で粉碎され、そして均質化される。次いで、均質化物は、脱脂され、そして乾燥される。多量の固体内容物が常に使用され、それにより、抽出および遠心分離段階による、連続した更なる処理が妨げられるので、これらの酵素回収段階は、連続して行うことができない。しかし、このような方法では、空間時間収率(space time yields)が更に高くなり、そのため、費用が更に低くなるので、酵素の回収のために、連続的または半連続的製造方法が最適である。しかし、酵素の連続的な回収は、それらが、細胞外の溶解された状態であり、かつ、細胞の粉碎または均質化により、最初に放出される必要がないことを要する。従って、パンクレアチン製造工程は、酵素の連続的な回収には適していない。

40

## 【0010】

膵臓からの酵素の別の欠点は、それらの酸不安定性である。膵酵素は、中性またはアルカリ性加水分解酵素である。このことは、一方で、それらが、pH7~pH8の間でそれら

50

の活性の最大値を有し、かつ、酸性条件下で、大幅に減少した活性を有することを意味する。他方で、低pH値は、可逆的または不可逆的変性によって、それらの触媒機能を不活性化する。この理由のため、膵臓から得られる酵素(パンクレアチン)は、カプセル化または緩衝物質の添加の特別な方法によって、胃を通過して移動する間、低pH値の胃液から保護されなければならない。そのような方法も、パンクレアチンに基づく薬剤の費用を増大させる。

【0011】

また、特定のグループの患者に対して、膵酵素の使用の欠点は、パンクレアチンに由来する。通常、豚の膵臓が使用されるが、それは、宗教的な教えにより、ユダヤ教またはイスラム教の患者には許容され得ない。

10

【0012】

最後に、豚からの膵酵素は、豚蛋白質アレルギーを有する、消化系疾患を患っている患者には、使用することができない。また、豚は、ヒト病原性インフルエンザウイルスの天然のリザーバーと考えられるので、そのようなウイルスによるパンクレアチンの汚染は、排除しなければならない。

【0013】

従って、本発明の目的は、

- 1) 細胞外状態であり、かつ、組織または細胞の均質化(破壊)なしに、細胞を含まない上清から得て精製することができ;
  - 2) 遺伝子工学によって得られるのではない無害の微生物のバイオテクノロジー的方法において連続して得ることができ;
  - 3) 酸性加水分解酵素であり、即ち、酸性pH値でそれらの活性の最大値を有し、かつ、膵臓からの酵素より酸に安定であり;
  - 4) 豚の組織または器官に由来しない、
- 薬剤のための酵素または酵素組成物を提供することである。

20

【0014】

この目的は、加水分解酵素、リパーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、グリコシダーゼ、ホスホリパーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスファターゼからなる群から選択され、かつ、繊毛虫から得られる酵素を含む薬剤によって達成される。

【0015】

特に、本発明は、消化を促進するために、および、消化系疾患の治療のために使用される薬剤に関する。

30

【0016】

好ましくは、本発明による薬剤は、蛋白質、核酸、および炭水化物のような、食べ物に含まれる巨大分子、ならびに、脂肪またはリン脂質のような、食べ物の他の成分を、ヒトまたは動物の胃腸管において消化するために使用される酵素を含む。

【0017】

他の酵素も、食べ物の成分の触媒による開裂によって、胃腸管において消化を促進し得るので、当業者は、以前使用されていたリパーゼ、プロテアーゼ、またはアミラーゼに属さない繊毛虫からの酵素も、本発明により、消化の促進のために、または、消化系疾患の治療のために、使用され得ることを理解する。

40

【0018】

本発明の1つの態様では、酵素は、pH 4 - 6 にpH最適値を有する。

【0019】

本発明による薬剤は、テトラヒメナ属、コルピジウム(Colpidium)属、およびゾウリムシ属の繊毛虫から得られる酵素を含むことが好ましい。

【0020】

好ましくは、本発明による薬剤は、薬学的に安全な補助剤およびキャリアーを含む。

【0021】

本発明による薬剤は、特に、タブレット、マイクロペレット、油、ジュース、ゲル、座薬

50

、カプセル、被覆されたタブレットの状態で使用される。

【 0 0 2 2 】

本発明は、消化系疾患、特に、薬剤によって引き起こされる消化不良、慢性萎縮性胃炎、慢性膵炎、急性膵炎、手術によって引き起こされる消化系疾患（消化不良）、または嚢胞性線維症によって引き起こされるもの、の治療のための薬剤の調製のための、加水分解酵素、リパーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、グリコシダーゼ、ホスホリパーゼ、ホスホジエステラーゼ、および/またはホスファターゼからなる群から選ばれる、繊毛虫からの酵素の使用にも関する。

【 0 0 2 3 】

繊毛虫の目(order)の原生動物によって生成され、かつ、本発明による薬剤において使用される酵素は、消化系疾患の治療に特に適している。また、本発明による薬剤に含まれる、繊毛虫からの酵素および酵素組成物、ならびにそれらの調製物は、上記の膵酵素またはカラフトシヤモもしくはオキアミからの酵素の欠点を有さない。

【 0 0 2 4 】

酵素は、繊毛虫によって周辺の培養培地内へ放出される。例えば、表 1 は、繊毛虫の培養培地中の異なる酵素の酵素活性を示す。表 1 に示された酵素活性は、文献に記載されている通常の方法によって測定された。リパーゼの測定には、アゾ - カゼインテストを使用した(ムリカン(Muricane)、1986)。リパーゼおよびアミラーゼの測定は、菌類のアミラーゼおよび微生物のリパーゼのための F I P の方法の指示と同様に行った(デメスター(Deme ester)ら、"薬学的酵素(Pharmaceutical Enzymes)"、A. ロウワーズ(Lauwers)およびS. シャルペ(Scharpe)[編集者]、マルセル・デッカー(Marcel Dekker)、ニューヨーク、1997、pp. 372-382)。酸性ホスファターゼおよび  $\beta$ -ヘキソサミジナーゼ(hexosaminidase)に対して、p - ニトロフェニルホスファターゼ基質、および p - ニトロフェニル - N - アセチル - D - グルコサミン基質が、それぞれ、キイ(Kiy)ら(1996)に記載されているように使用される。ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> 活性は、放射分析による酵素テストによって決定された(ハートマン(Hartmann)ら、2000)。

【 0 0 2 5 】

【表 1】

表 1	2リットルの発酵槽中の脱脂乳培地における72時間の培養後の細胞外培養培地中の酵素活性 (U/l)					
	プロテアーゼ	リパーゼ	$\alpha$ -アミラーゼ	$\beta$ -ヘキソサミジナーゼ	ホスホリパーゼ A <sub>1</sub>	酸性ホスファターゼ
テトラヒメナ	800 U/l	164 U/l	20 U/l	500 U/l	10 U/l	1000 U/l
コルピジウム	12 U/l	-	-	40 U/l	1.5 U/l	80 U/l

【 0 0 2 6 】

培養培地内へ酵素を放出する繊毛虫は、高細胞濃度で連続的に、安価な発酵培地上で低コストで発酵され得る。酵素は、灌流モジュール(マイクロフィルター)によって、発酵槽から細胞を含まないように濾過されることができ、そのため、発酵培地から、連続的に除去され得る。発酵プロセスは、安価な栄養培地(成分:脱脂乳培地および酵母抽出物)を連続的に供給することによって、長期間にわたって維持され得る。

【 0 0 2 7 】

【実施例】

実施例 1

図 1 は、14日間の発酵期間にわたって示された、繊毛虫の分泌反応速度論を示す。灌流モジュールによる連続的な発酵のために、以下の工程を使用した:

【 0 0 2 8 】

バイオリアクターシステムは、デジタル DCU 制御ユニットおよびポンプユニットを有する、プロセッサによって制御された2リットル発酵槽(バイオスタット(Biostat) MD、ブラウン・ディッセル・バイオテック(Braun Diessel Biotech)、メルスンゲン(Melsungen)

、ドイツ)に基づいている。細胞を含まない上清の採取が、灌流モジュールによって行われ、パドルインペラー(paddle impeller)が、攪拌機として使用された。1 ml / l のシリコーン油濃度を用いた。細胞のダメージを防ぐために、攪拌機の1分当たりの回転を、800 rpm に制限した。カスケードの調整によって、溶解した酸素の濃度を、60%で一定に保った。通気速度は、第一の優先事項の制御品質として選択され、攪拌機の1分当たりの回転は、第二の優先事項の連続した制御として選択された。酸素濃度の測定は、アンペア測定型(amperometric) O<sub>2</sub>電極によって行った(インゴールド・メステクニク(Ingold Messtechnik)、シュタインバッハ)。二重壁(double-walled)容器およびサーモスタットによって、発酵槽中の温度を30に保ち、かつ、4 Mの酢酸を用いるDCU-制御型調整剤ポンプ(DCU-controlled correction agent pump)による連続発酵段階中に、pHをpH7に調整した。連続発酵段階において、脱脂乳培地を発酵槽へ供給し、酵素を含む消費された培地を、発酵プロセスから取り除いた。伝導度プローブによって制御されたポンプを使用することにより、作業容量を、2リットルで一定に保つことができた。約0.3 μmの膜孔サイズを有する灌流モジュールによって、細胞を含まない上清を、粒子を含まないように採取した。灌流モジュールは、支持体上に巻きつけられた、それぞれ2 mmの外径および1 mmの内径ならびに2.8 mの長さを有するS6/2ポリプロピレンキャピラリー(エンカ(Enka)、ウッパータル(Wuppertal))から構成されていた。単位時間当たりの培地容量の交換を、灌流速度と定義した。脱脂乳培地の供給速度を、1日当たりの1つの発酵槽容量(2リットル)の灌流速度が調整されるように、蠕動ポンプの回転数によって制御することができた。オートクレーブの中に入れる前に、泡捕集器を発酵槽に完全に据え付け、グルコースなしの1.8リットルの脱脂乳培地を充填させた。オートクレーブの中に入れた後、200 mlの10%グルコース溶液を、注入口を通してポンプでくみ入れた。滅菌培養室(cabinet)における迅速な結合によって、培地と採取瓶との連結を行った。滅菌培養室では、接種培養物(inoculation culture)を、底部排水管を有する500 mlの三角フラスコ内へ移し、可撓性チューブおよびばらばらの接種片を通して、バイオリアクター内へポンプでくみ入れた。

#### 【0029】

繊毛虫は、発酵中、ダメージを受けないままであるので、培養培地は、繊毛虫によって分泌された蛋白質のみを含み、細胞内成分を含まない。このため、発酵物または培養培地からの酵素は、わずかなクロマトグラフィー精製段階で高純度になり得る。

#### 【0030】

##### 実施例2

図2は、実施例として、繊毛虫テトラヒメナの培養培地からのホスホリパーゼの精製のためのカラムクロマトグラフィー段階を示す。3つの連続したカラムクロマトグラフィー段階の溶出プロファイルを示す。詳細には、図2 aは、段階1としての疎水性相互作用クロマトグラフィーの溶出プロファイルを示し、図2 bは、段階2としてのアニオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイルを示し、そして図2 cは、段階3としてのサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロファイルを示す。その後のクロマトグラフィーに対して、それぞれの前のクロマトグラフィーの活性画分を使用した。よって、酵素は、最終段階後に、ほぼ完全に均質に精製され得た(異質の活性なし、異質の蛋白質の含有量は低い)。この精製スキームと同様にすることにより、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼまたはヘキソサミニダーゼ(hexosaminidase)のような、繊毛虫からの他の酵素も精製され得た。

#### 【0031】

1つの条件的な(facultatively)病原性の典型(バランチジウム菌(Balantidium coli))以外、繊毛虫は、フリーリビング(free-living)(非寄生性)非病原性(apatogenic)微生物である。よって、繊毛虫テトラヒメナについてのGRAS状態(“一般に安全と認識されている(generally recognized as safe)”)は、例えば、文献に記載されている(ティディケ(Tiedtke)、1994)。また、繊毛虫が、他の生物に移され得ない体内寄生虫を何ら有さない(do not harbor)ことが確実であると考えられている。また、テトラヒメナ

10

20

30

40

50

たはコルピジウムのような、バイオテクノロジーに重要な繊毛虫種には、ウイルスや他の体内寄生虫は何ら存在しない。従って、毒性または発熱性不純物による酵素組成物の汚染を排除することができる。

【0032】

図3は、異なるpH値での、繊毛虫テトラヒメナの培養培地からの3つの酵素の相対的な酵素活性の表示を示す(a - ホスホリパーゼ A<sub>1</sub>、b - トリアシルグリセロール - リパーゼ、c - -ヘキソサミニダーゼ)。

【0033】

酸性加水分解酵素である、繊毛虫からの酵素は、酸性の最適pH値を有する。図3は、異なるpH値での、繊毛虫テトラヒメナの培養培地からの3つの酵素の酵素活性を示す。詳細には、ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (図3a)、および -ヘキソサミニダーゼ (図3b) の相対的な酵素活性、ならびに、リパーゼ (図3c) の絶対的な酵素活性を示す。

10

【0034】

繊毛虫からの酵素に対する最適pH値が4.1~6.5の間であることが明らかになる。繊毛虫からのプロテアーゼは、3と同じくらい低いpH値であっても、高い酵素活性を示す。以下の表2に、細胞を含まない上清(培養培地)からの繊毛虫プロテアーゼの活性を、pH値の関数として示す。既に上述したように、酵素活性は、菌類のアミラーゼおよび微生物のリパーゼのためのFIPの方法の指示と同様にすることによって決定した。

【0035】

【表2】

20

pH 値	3	4	5	6
プロテアーゼ活性 (単位/リットル)	2266 ± 19%	1854 ± 12%	1483.2 ± 11%	11948 ± 25%

【0036】

このため、繊毛虫酵素は更に、膵酵素と比べて酸に対してより安定であった。従って、それらは、胃を通過して移動した後十二指腸において、膵酵素と比べてはるかに高い活性を有する。

【0037】

30

図4は、胃液中で見られる典型的なpH値(pH1.5)での10分間の作用段階における、パンクレアチンと比べた、繊毛虫テトラヒメナからのプロテアーゼの酸安定性を示す。高モル濃度の酸性緩衝液(1Mのグリシン/HCl、pH1.5)の作用によって、37で、低pH値をシミュレーションした。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、14日間の発酵期間にわたって示された、繊毛虫の分泌反応速度論を示す。

【図2】 図2は、実施例として、繊毛虫テトラヒメナの培養培地からのホスホリパーゼの精製のためのカラムクロマトグラフィー段階を示す。

【図3】 図3は、異なるpH値での、繊毛虫テトラヒメナの培養培地からの3つの酵素の相対的な酵素活性の表示を示す(a - ホスホリパーゼ A<sub>1</sub>、b - トリアシルグリセロール - リパーゼ、c - -ヘキソサミニダーゼ)。

40

【図4】 図4は、胃液中で見られる典型的なpH値(pH1.5)での10分間の作用段階における、パンクレアチンと比べた、繊毛虫テトラヒメナからのプロテアーゼの酸安定性を示す。

【 図 1 】

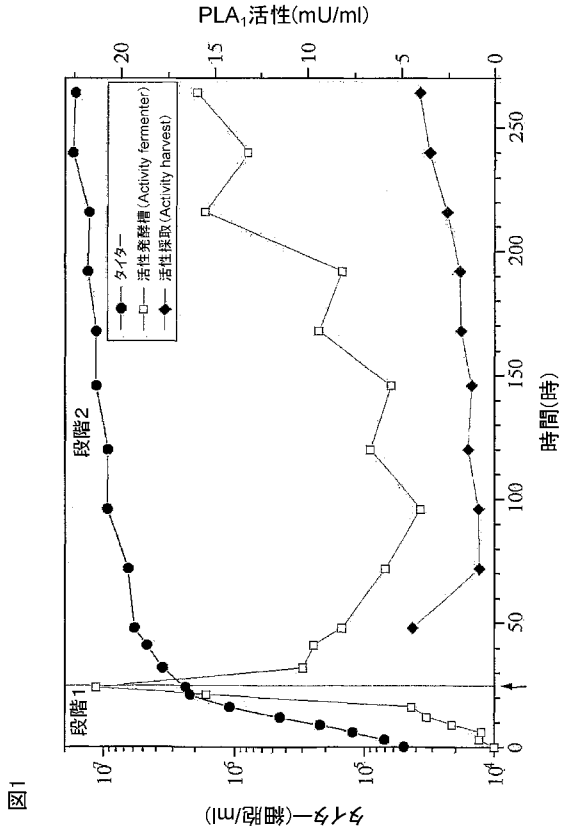


図1

【 図 2 】

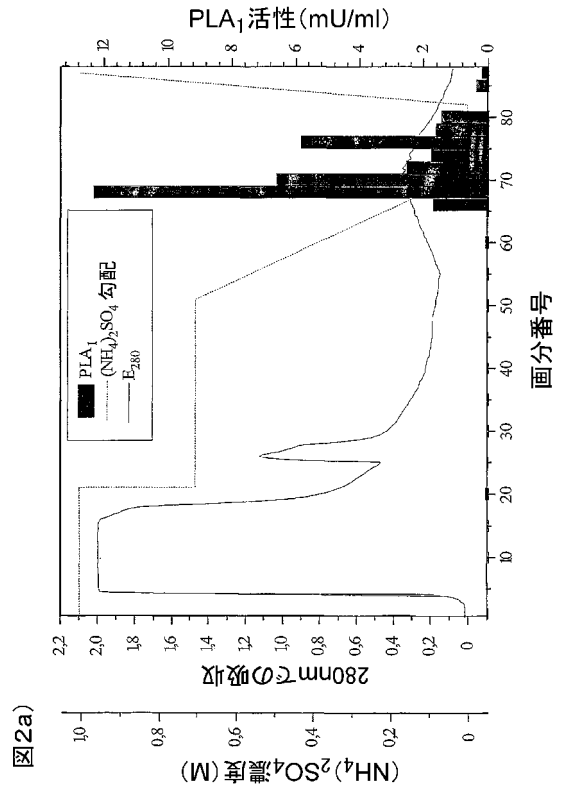


図2a)

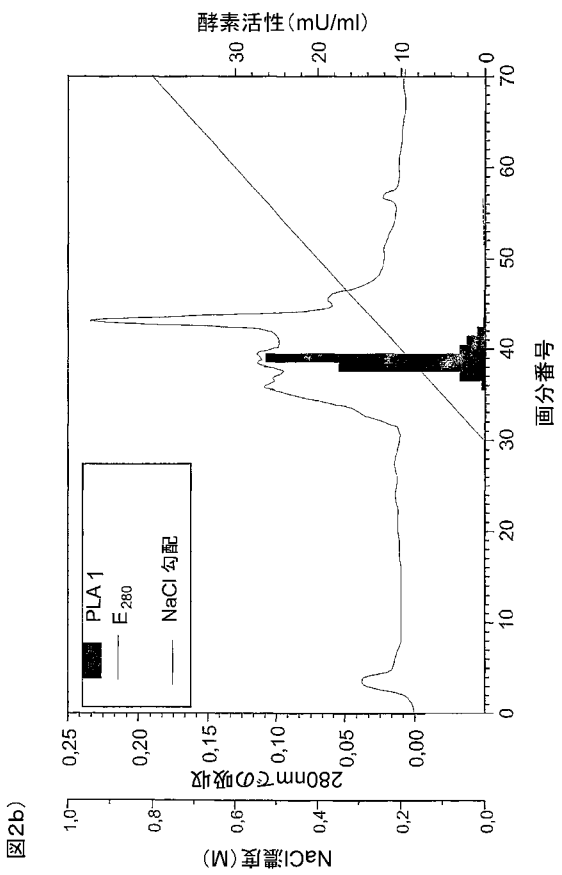


図2b)

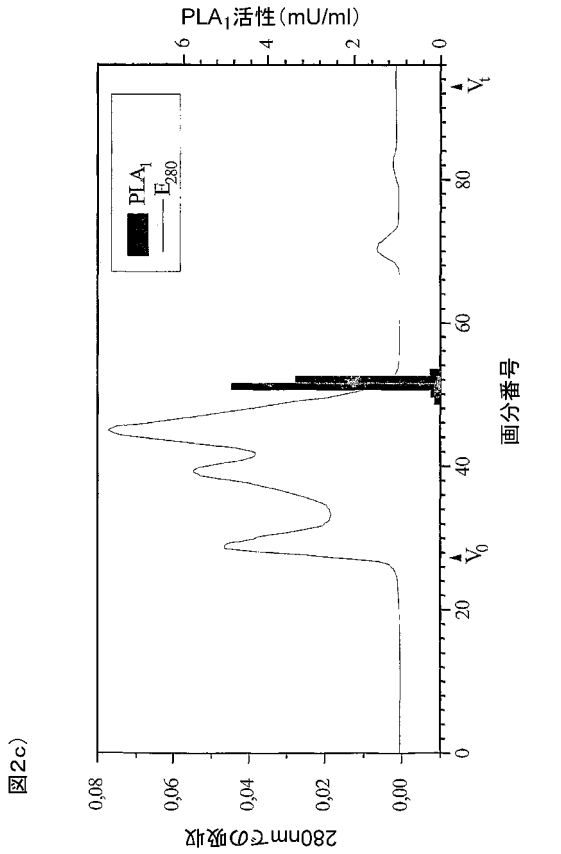
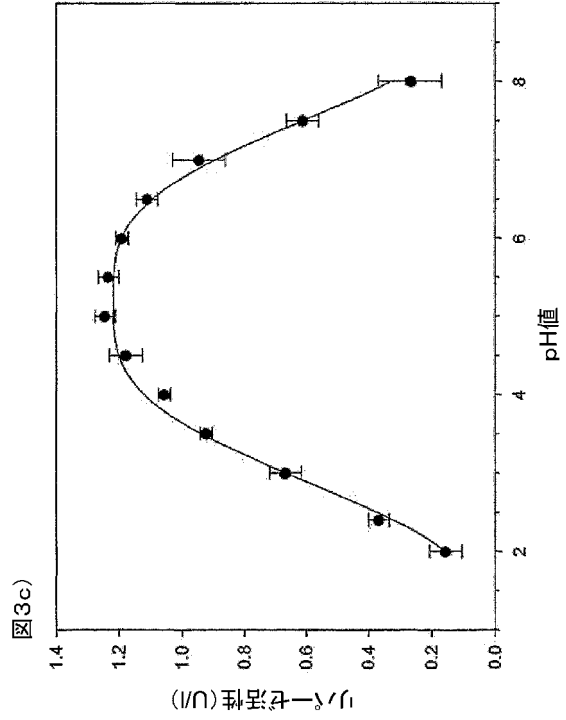
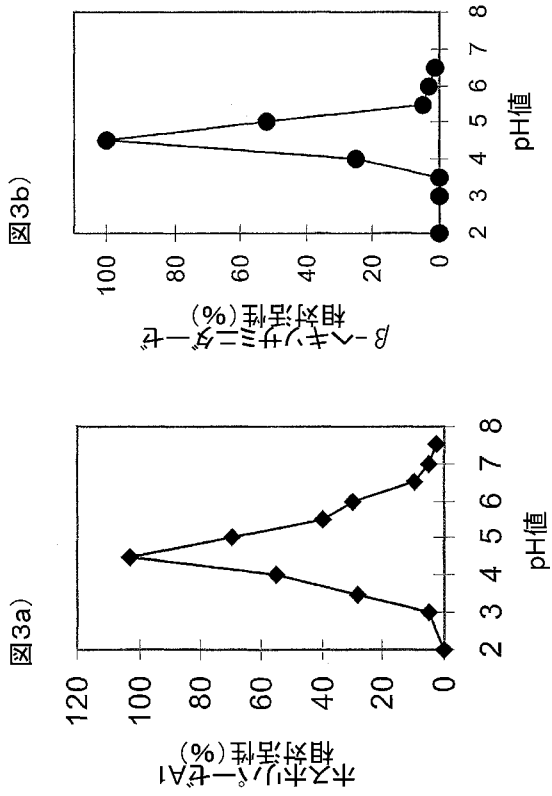
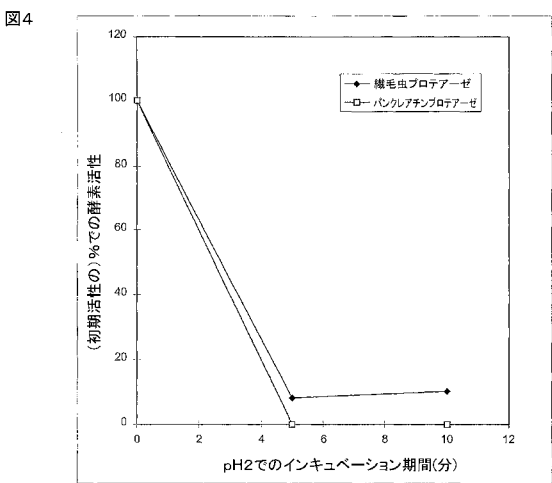


図2c)

【 図 3 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	9/28	(2006.01)	A 6 1 K	9/28
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/14
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
C 1 2 N	9/14	(2006.01)	C 1 2 N	9/14

- (56)参考文献 特表2000-506740(JP,A)  
 国際公開第00/024911(WO,A1)  
 ARAI,H. et al, Properties of acid phospholipases in lysosome and extracellular medium  
 of Tetrahymena pyriformis, J Biochem (Tokyo), 1986年, Vol.99, No.1, p.125-33

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/68  
 A61K 38/46  
 A61K 9/02  
 A61K 9/08  
 A61K 9/10  
 A61K 9/14  
 A61K 9/20  
 A61K 9/28  
 A61K 9/48  
 A61P 1/00  
 A61P 1/04  
 A61P 1/14  
 A61P 1/18  
 C12N 9/14  
 BIOSIS(STN)  
 CApIus(STN)  
 EMBASE(STN)  
 MEDLINE(STN)