



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106699869 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201710110192.5

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(22)申请日 2009.05.14

代理人 张广育 姜建成

(30)优先权数据

- 2008902373 2008.05.14 AU
- 2008902366 2008.05.14 AU
- 2008902369 2008.05.14 AU
- 2008902375 2008.05.14 AU

(51)Int.Cl.

- G07K 14/515(2006.01)
- G07K 1/34(2006.01)
- G07K 1/14(2006.01)
- A23J 1/20(2006.01)
- A23L 33/18(2016.01)
- A23L 33/19(2016.01)

(62)分案原申请数据

200980127436.4 2009.05.14

(71)申请人 维多利亚农业服务控股公司

地址 澳大利亚维多利亚

申请人 墨累古尔本合作有限公司

(72)发明人 M·麦克多诺 B·库克斯

A·泰斯特 P·霍布曼 A·布朗

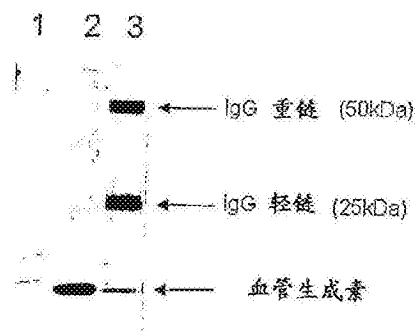
权利要求书2页 说明书22页 附图8页

(54)发明名称

血管生成素富集的乳级分

(57)摘要

本发明提供富集乳提取物的血管生成素的方法,所述方法包括通过尺寸、电荷或免疫亲和的分离。本发明还提供通过所述方法生产的血管生成素富集的提取物,以及在用于治疗多种血管生成素可治疗的疾病或病症的医药和营养组合物以及食品中提供所述提取物。



1. 一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:
 - (a) 将所述乳样品与抗血管生成素的抗体接触,从而使所述乳样品中存在的血管生成素与所述抗体相互作用形成一种血管生成素-抗体复合物;
 - (b) 将所述复合物从所述乳样品中分离出来;
 - (c) 将血管生成素从所述复合物的抗体中释放出来;和
 - (d) 收集步骤(c)的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品;其中在步骤(a)之前,将所述乳样品加热以降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量。
2. 权利要求1的方法,其中所述抗血管生成素的抗体固定于一种支持物。
3. 一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:
 - (a) 将所述乳样品加至其上面固定有与血管生成素相互作用的抗体的支持物,其中所述乳样品中存在的血管生成素与所述支持物上的抗体相互作用形成一种血管生成素-抗体复合物;
 - (b) 从所述支持物上洗去所述乳样品中存在的与所述抗体相互作用的组分以将所述复合物从所述乳样品中分离出来;
 - (c) 将血管生成素从所述复合物的抗体中释放出来;和
 - (d) 收集步骤(c)的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品;其中在步骤(a)之前,将所述乳样品加热以降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量。
4. 一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:
 - (a) 将液相乳样品加至第二相,所述第二相使得可基于所述乳样品组分的尺寸分离组分;和
 - (b) 收集与所述乳样品的其他组分分离的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品,其中在步骤(a)之前,将所述乳样品加热以降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量,并且在步骤(a)之前,不对所述乳样品进行凝乳或酸沉淀处理,或者所述乳样品不是乳清或乳清级分。
5. 权利要求4的方法,其中所述第二相为半渗透相。
6. 权利要求5的方法,其中所述半渗透相允许尺寸小于30kDa的组分作为渗透物通过所述半渗透相。
7. 权利要求6的方法,其中血管生成素作为渗透物通过所述半渗透相。
8. 权利要求5的方法,其中所述半渗透相允许尺寸小于10kDa的组分作为渗透物通过所述半渗透相。
9. 权利要求8的方法,其中血管生成素作为保留物被所述半渗透相所保留。
10. 权利要求5的方法,其中借助于由注射器、压缩气体、泵、离心力或其组合施加的力迫使所述乳样品通过所述半渗透相。
11. 权利要求4的方法,其中所述第二相为半渗透膜。
12. 一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:
 - (a) 将液相乳产品加至第二相,所述第二相使得可基于所述乳样品组分的尺寸将所述组分分离为级分;

(b) 鉴定那些含有血管生成素的级分并收集所述级分以获得血管生成素富集产品；
在步骤(a)之前,将所述乳样品加热以降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量。

13. 权利要求12的方法,其中所述第二相为尺寸排阻树脂。

14. 权利要求12或13的方法,其中所述第二相分离分子量为约10-20kDa的蛋白。

15. 一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

(a) 将电场在横于流动的水性乳样品的方向上施加于所述乳流;

(b) 回收被施加所述电场的乳流级分;并

(c) 鉴定那些血管生成素富集的级分并收集所述级分,从而获得血管生成素富集产品;
在步骤(a)之前,将所述乳样品加热以降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量。

16. 权利要求15的方法,在变性条件下进行。

17. 权利要求15的方法,其中水性乳的流动在提供pH梯度的缓冲介质中进行。

18. 权利要求17的方法,其中所述梯度在8-11的pH范围内。

19. 前述权利要求任一项的方法,还包括对所述血管生成素富集产品进行一个或多个其他血管生成素富集步骤。

20. 权利要求19的方法,其中所述一个或多个其他血管生成素富集步骤选自阳离子交换色谱法、电泳包括自由流动电泳、尺寸排阻色谱法和超滤。

21. 前述权利要求任一项的方法,其中所述乳样品选自全乳、脱脂乳、酪乳、乳清、乳清级分和初乳。

血管生成素富集的乳级分

[0001] 本申请是2009年5月14日提交的申请号为PCT/AU2009/000604、发明名称为“血管生成素富集的乳级分”的国际申请的分案申请,所述国际申请于2011年1月13日进入中国国家阶段,其申请号为200980127436.4。

[0002] 本发明涉及用于从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,以及这一产品作为食品添加剂、营养品、医药或兽药产品或者用于制备治疗性组合物的应用。

背景技术

[0003] 血管生成素是一种14kDa的非糖基化多肽,其由数种生长细胞类型产生,例如血管内皮细胞、主动脉平滑肌细胞、成纤维细胞以及某些肿瘤如结肠癌、卵巢癌和乳腺癌。血管生成素已从多种来源分离,包括正常人血浆、牛血浆、牛乳以及小鼠、兔和猪血清。血管生成素在这每一种来源中均以低水平存在(在牛乳中小于12mg/L,在人血浆中小于150 μ L/L)。

[0004] 除了作为血管生成的强效刺激素以外,血管生成素还被证明具有多种其他活性。这些活性包括除去皮肤缺陷例如色素斑的能力、调节免疫反应、保护多形核白细胞免于自发降解和抗系统性细菌和真菌病原体的杀微生物活性。基于该蛋白的已知生理功能,可预测血管生成素在医药、饮食食品添加剂和化妆品中的多种用途。

[0005] 血管生成素在这些用途中的应用需要一种以商业规模从合适来源制备该蛋白的有效方法。提供这一方法是本发明一个优选实施方案的目标。

发明内容

[0006] 虽然牛乳是一种高度丰富的商品时,但其用作血管生成素来源并不有利,因为血管生成素仅以低水平存在于牛乳中,而且乳中存在的某些蛋白(例如免疫球蛋白、乳铁蛋白和乳酸过氧化物酶)掩盖血管生成素并阻碍其纯化。发明人已发现数种富集乳级分的血管生成素的方法,如下面第一至第五方面和本发明人以W02008/055310公布的申请中所述,所述每种方法均能够从乳中生产血管生成素富集产品。

[0007] 本发明的第一方面提供一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

[0008] (a) 将所述乳样品与一种与血管生成素相互作用的捕获剂接触,从而使所述乳样品中存在的血管生成素与所述捕获剂相互作用形成一种血管生成素-捕获剂复合物;

[0009] (b) 将所述复合物从所述乳样品中分离出来;

[0010] (c) 将血管生成素从所述复合物的捕获剂中释放出来;和

[0011] (d) 收集步骤(c)的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品。在

[0012] 一个实施方案中,所述捕获剂固定于一种支持物。

[0013] 在另一个实施方案中,所述捕获剂是一种抗体。

[0014] 本发明的第二方面提供一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

[0015] (a) 将所述乳样品加至其上面固定有与血管生成素相互作用的抗体的支持物,其

中所述乳样品中存在的血管生成素与所述支持物上的抗体相互作用形成一种血管生成素-抗体复合物;

[0016] (b) 从所述支持物上洗去所述乳样品中存在的不与所述抗体相互作用的组分以将所述复合物从所述乳样品中分离出来;

[0017] (c) 将血管生成素从所述复合物的抗体中释放出来;和

[0018] (d) 收集步骤(c)的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品。

[0019] 在第一方面或第二方面的一个实施方案中,所述方法涉及免疫亲和色谱法。

[0020] 第三方面提供一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

[0021] (a) 将液相乳样品加至第二相,所述第二相使得可基于所述乳样品组分的尺寸分离组分;和

[0022] (b) 收集与所述乳样品的其他组分分离的血管生成素,从而获得血管生成素富集产品,其中在步骤(a)之前,不对所述乳样品进行凝乳或酸沉淀处理,或者所述乳样品不是乳清或乳清级分。

[0023] 在第三方面的一个实施方案中,所述第二相为半渗透相。

[0024] 在第三方面的其他实施方案中,所述半渗透相允许尺寸小于20kDa、甚至尺寸小于50kDa的组分作为渗透物通过所述半渗透相。在一个优选实施方案中,所述半渗透相允许尺寸小于30kDa的组分作为渗透物通过所述半渗透相。在这些实施方案中,血管生成素作为渗透物通过所述半渗透相。

[0025] 在第三方面的又一实施方案中,所述半渗透相允许尺寸小于10kDa的组分作为渗透物通过所述半渗透相。在这一方案中,血管生成素作为保留物为所述半渗透相所保留。

[0026] 在第三方面的另一实施方案中,迫使所述乳样品通过所述半渗透相。

[0027] 在第三方面的一个实施方案中,借助于由注射器、压缩气体、泵、离心力或其组合施加的力迫使所述乳样品通过所述半渗透相。

[0028] 在第三方面的一个实施方案中,所述第二相为半渗透膜。

[0029] 在第三方面的另一个实施方案中,所述方法涉及超滤。

[0030] 本发明的第四方面提供一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

[0031] (a) 将液相乳样品加至第二相,所述第二相使得可基于所述乳样品组分的尺寸将所述组分分离为级分;

[0032] (b) 鉴定那些含有血管生成素的级分并收集所述级分以获得血管生成素富集产品。

[0033] 在第四方面的一个实施方案中,所述方法涉及尺寸排阻色谱法。

[0034] 在第四方面的另一个实施方案中,所述第二相为尺寸排阻树脂。

[0035] 在第四方面的一个实施方案中,所述树脂分离分子量为约10-20kDa的蛋白。

[0036] 本发明的第五方面提供一种从乳样品中获得血管生成素富集产品的方法,所述方法包括:

[0037] (a) 将电场在横于流动的水性乳样品的方向上施加于所述乳流;

[0038] (b) 回收被施加所述电场的乳流级分;并

[0039] (c) 鉴定那些血管生成素富集的级分并收集所述级分,从而获得血管生成素富集

产品。

[0040] 在第五方面的一个实施方案中,所述方法涉及自由流动电泳。自由流动电泳可选自等电点聚焦、区带电泳、等速电泳、场分布电泳(field step electrophoresis)和场流分级分离。此外,自由流动电泳可为连续自由流动电泳或间歇自由流动电泳。

[0041] 在另一个实施方案中,所述方法在变性条件下进行。

[0042] 在第五方面的又一实施方案中,水性乳的流动在提供pH梯度的缓冲介质中进行。在一个实施方案中,所述梯度在8-11的pH范围内。

[0043] 在第一至第五任一方面的另一个实施方案中,对所述血管生成素富集产品进行一个或多个其他血管生成素富集步骤。所述一个或多个其他血管生成素富集步骤可选自阳离子交换色谱法、电泳包括自由流动电泳、尺寸排阻色谱法和超滤。这尤其是对于血管生成素级分的纯度很重要的情况,例如血管生成素的医药应用。然而可期望的是,第一和第二方面的方法能够提供较高纯度——取决于所述捕获剂的特异性——的血管生成素富集产品。当所述捕获剂为对血管生成素特异的抗体时,可期望较高的纯度。

[0044] 第六方面提供一种通过第一至第五任一方面的方法制备的血管生成素富集产品。

[0045] 第七方面提供本发明第六方面的血管生成素富集产品在制备食品物质、营养品、医药或兽药产品中的应用。

[0046] 第八方面提供包含第六方面的血管生成素富集产品的食品物质、营养品、医药或兽药产品。

[0047] 在第七或第八方面的一个实施方案中,所述食品物质是一种运动营养素或食品添加剂,特别是针对婴儿、运动员尤其是优秀运动员、老年人或体弱者的食品添加剂。

[0048] 第九方面提供包含第六方面的血管生成素富集产品的医药组合物或兽药组合物。

[0049] 第十方面提供第六方面的血管生成素富集产品在制备用于治疗 and/或预防由病毒、细菌或真菌及其毒素引起的疾病,或者需要血管生成素的刺激作用的疾病的药剂中的应用。

[0050] 第十一方面提供第六方面的血管生成素富集产品作为可靶向引起黏膜表面感染的病原体的营养品、医药或兽药产品的成分的应用。

[0051] 第十二方面提供一种靶向引起黏膜表面感染的病原体的方法,包括给予受试者有效量的本发明第八方面的营养品、医药或兽药产品或者第九方面的组合物的步骤。

[0052] 在本发明第十一或第十二方面的一个实施方案中,所述黏膜表面可包括鼻、眼、耳、肺、胸和阴道的黏膜表面。

[0053] 第十三方面提供一种治疗和/或预防由病毒、细菌或真菌及其毒素引起的疾病,或者需要血管生成素的刺激作用的疾病的方法,包括给予受试者有效量的本发明第八方面的营养品、医药或兽药产品或者第九方面的组合物的步骤。

附图说明

[0054] 图1示出了以Sypro Ruby (Molecular Probes) 染色并在ProXpress (Perkin Elmer) 成像系统上使用5秒曝光而成像的一维SDS聚丙烯酰胺凝胶。泳道1、2和3是:1) 分子量标准,2) 乳衍生级分,和3) 在与所述乳衍生级分孵育后从抗血管生成素IgG标记的Protein G Dynabead上洗脱的洗脱液。

[0055] 图2示出了免疫亲和纯化后的血管生成素的蛋白质印迹分析。血管生成素使用0.5 μg 小鼠抗牛单克隆抗体(克隆1B14D4)检测,第二抗体为IRDye 800CW山羊抗小鼠IgG(Licor)并且在Odyssey红外成像仪(Licor)上成像。泳道是:1)分子量标准,2)乳衍生级分,3)在与所述乳衍生级分孵育后从抗血管生成素IgG标记的Protein G Dynabead上洗脱的洗脱液。

[0056] 图3示出了比较借助通过30kDa膜的超滤制备的不含血管生成素的保留物与血管生成素富集的渗透物的电泳分离。泳道内含物:1,分子量标准;2,保留物的2D PAGE分析;3,保留物的1D PAGE分析;4,血管生成素富集的渗透物的1D PAGE分析;5,分子量标准;6,血管生成素富集的渗透物的2D PAGE分析。血管生成素的位置由圆圈标示。

[0057] 图4示出了一个Tris-tricine PAGE凝胶,其显示对WGFE以及通过对WGFE的UF分离或对WGFE的热致沉淀获得的级分的分离(泳道内含物:1,分子量标准;2,加热的WGFE;3,加热的WGFE;4,空白;5,100kDa渗透物;6,50kDa渗透物;7,30kDa渗透物;8,10kDa渗透物;9,空白;10,未分级分离的WGFE)。血管生成素的位置被标示(▶)。

[0058] 图5示出了为了分离血管生成素而对WGFE的Sephacryl S-100HR分离(-在280nm处的吸光度信号,-级分收集器信号,|合并开始/结束)。

[0059] 图6示出了为了分离血管生成素而对WGFE的Sephacryl S-300HR分离(-在280nm处的吸光度信号,-级分收集器信号,|合并开始/结束)。

[0060] 图7示出了为了分离血管生成素而对WGFE的Superose 12分离(-在280nm处的吸光度信号,-级分收集器信号,|合并开始/结束)。

[0061] 图8是一个Tris-tricine PAGE凝胶,其显示对WGFE和通过对WGFE的SEC分离获得的级分的分离(泳道内含物:1,未分级分离的WGFE;2,空白;3,S-100HR合并液A;4,S-100HR合并液B;5,S-100HR合并液C;6,S-100HR合并液D;7,空白;8,S-100HR合并液E;9,空白;10,分子量标准。)血管生成素的位置被标示(▶)。

[0062] 图9是一个Tris-tricine PAGE凝胶,其显示对WGFE和通过对WGFE的SEC分离获得的级分的分离(泳道内含物:1,空白;2,S-300HR合并液A;3,S-300HR合并液B;4,S-300HR合并液C;5,空白;6,Superose 12合并液A;7,Superose 12合并液B;8,空白;9,未分级分离的WGFE;10,分子量标准)。血管生成素的位置被标示(▶)。

[0063] 图10示出了溶液内等电点聚焦实验中的蛋白质分离的2维凝胶电泳分析,其中乳衍生蛋白溶液被分级分离为pH 3-5、pH 5-6.5、pH 6.5-8和pH 8-11的级分。pH 8-11的级分中大约80%的蛋白被鉴定为血管生成素。

具体实施方式

[0064] 发明人已经认识到对使得可从容易获得的起始材料乳(特别是牛乳)中以有效方式富集和分离血管生成素的方法的需要。这些方法中的一些在研究规模上提供高度纯化的血管生成素级分,其他提供商业可行的富集方法。

[0065] 第一和第二方面提供一种方法,其中通过与血管生成素蛋白相互作用的捕获剂将在乳样品中存在的血管生成素蛋白与所述样品中存在的其他蛋白和物质分离。

[0066] 在第一或第二面的另一个实施方案中,先将所述乳样品加至不存在所述捕获剂或抗体的预备的不同支持物,然后将所述乳样品与所述接触剂接触,其中将所述乳样品中存

在的与所述支持物非特异性相互作用的物质从所述乳样品中除去。

[0067] 在第一或第二方面的一个实施方案中,所述支持物基于聚合物和/或基于琼脂糖。例如所述支持物可为Dynabeads Protein G。

[0068] 在第一或第二方面的另一个实施方案中,所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。所述抗体优选为单克隆抗体。一种合适的抗牛血管生成素抗体为得自Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea的克隆号为1B14D4的单克隆抗体。

[0069] 在第一或第二方面的又一实施方案中,所述捕获剂或抗体通过与所述支持物的共价连接而固定于所述支持物。

[0070] 本文所用的术语“捕获剂”是指能够与血管生成素蛋白“相互作用”形成血管生成素-捕获剂复合物的实体。所述相互作用优选地使血管生成素蛋白固定化。理想地,所述捕获剂只对所述乳样品中存在的血管生成素蛋白具有特异性;然而,本领域技术人员应理解,所述乳样品中的其他组分也可与所述捕获剂非特异性地相互作用。因此首选的捕获剂是呈现最小非特异性结合的捕获剂。

[0071] 合适的捕获剂可包括但不限于:血管生成素的抗体、肽或蛋白(包括结合血管生成素的蛋白,例如卵泡抑素)、化学实体、受体、配体、适体、多糖、脂质、激素等。所述捕获剂优选为抗体或其功能性片段。

[0072] 在一个实施方案中,所述捕获剂能够区分核糖核酸酶4和血管生成素,尽管其具有30%的序列同一性。

[0073] 所述捕获剂与血管生成素之间的相互作用应是可逆的从而使得血管生成素可最终与所述捕获剂分离。所述相互作用可以是直接的,也可以是间接的从而使得所述捕获剂与血管生成素的相互作用为使所述捕获剂与血管生成素接触的第三种(或更多)试剂所介导,例如接头分子、肽等。

[0074] 在一个实施方案中,所述捕获剂连接或“固定”于支持物。本文所用的术语“支持物”是指其上面连接有所述捕获剂的材料。所述支持物可为固体支持物。合适支持物的实例包括基于聚合物和/或琼脂糖的基质支持物,例如琼脂糖凝胶、硝酸纤维素、尼龙、聚偏氟乙烯(PVDF)、玻璃、塑料、凝胶、溶胶(sol)s、陶瓷、金属以及任何这些材料的衍生物。

[0075] 捕获剂可直接或间接地连接于支持物。捕获剂可直接或间接地以高密度沉积在所述支持物上。例如,可将蛋白A或G印在支持物上。然后可将捕获剂(例如血管生成素的抗体)通过其与蛋白A或G的相互作用偶联于所述支持物。此方法的优点在于通过使抗体的恒定区接合于蛋白A或G,该抗体的可变区(血管生成素结合结构域)会完全暴露以与血管生成素相互作用。

[0076] 捕获剂也可连接于如下支持物:由聚合物、弹性体或其他合适的膜材料制成的膜。这些材料的实例包括但不限于PVDF、硝酸纤维素、尼龙或其改性变体。本发明涵盖任何这种材料(例如本领域技术人员已知的用于RNA印迹、DNA印迹或蛋白质印迹的那些材料)的应用。就本发明的目的而言,所需的膜的具体方面包括结合大量血管生成素蛋白的能力、在最小变性的情况下结合血管生成素蛋白的能力以及最小化所述乳样品中存在的非血管生成素组分结合的能力。

[0077] 所述第一和第二方面倚赖血管生成素与用作所述捕获剂的血管生成素抗体之间

的可逆亲和相互作用。

[0078] 本发明以此方式使用抗体的一种方法通常称为免疫亲和色谱法。在这点上,将对血管生成素具有特异性的抗体固定于支持物上,以产生活性免疫吸附剂。然后将所述活性免疫吸附剂装入准备接收要纯化的混杂蛋白样品的柱子中。将一种含有蛋白复杂混合物的乳样品加至或使其通过所述免疫吸附剂,藉此使所述样品中存在的血管生成素蛋白与所述抗体相互作用形成血管生成素-抗体复合物,并将所述样品中存在的其他蛋白和材料洗去至柱穿流液(flow-through)中。然后破坏所述抗体与血管生成素之间的可逆相互作用以生成血管生成素富集的柱洗脱液形式的高度纯化的产品。

[0079] 本文所用的术语“血管生成素抗体”或“抗体”包括多克隆和单克隆抗体类型。此外,术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白、嵌合免疫球蛋白分子或Fab或F(ab')₂片段。本文定义的抗体还包括单链抗体(ScFv),其包括相连的V_H和V_L结构域并且保留所述抗体的天然个体决定簇的构象和特异性结合活性。这种单链抗体是本领域公知的并且可通过标准方法生产。所述抗体可为任何同种型,IgG、IgA、IgD、IgE和IgM。可清楚地理解,所述抗体或其片段包括目前已知或将来可知的那些。

[0080] 多克隆血管生成素抗体可通过本领域已知的技术获得。例如多克隆血管生成素抗体可通过免疫兔或山羊并从得到的血清中纯化免疫球蛋白级分而获得。所获得的抗体是一种抗体混合物,其具有能够结合用作免疫原的血管生成素蛋白的不同部分的不同特异性。

[0081] 血管生成素的多克隆抗体也可商业购得(例如购自Calbiochem,USA;Lifespan Biosciences,USA;R&D Systems,USA)。

[0082] 尽管多克隆抗体易于生产,然而它们用于免疫亲和色谱法具有多个缺点。例如,它们的表位特异性和结合性质各异,必须使用非常纯的抗原以避免在蛋白制备中产生针对少量杂质的不想要的抗体。此外,所述抗体制备在一只免疫动物与另一只免疫动物之间不是完全可重复的,导致难以获得大量相同材料。因此尽管血管生成素多克隆抗体可用于本发明方法,然而它们不是首选的抗体。

[0083] 可使用血管生成素的单克隆抗体。血管生成素的单克隆抗体可使用任何用于通过培养连续细胞系生产抗体分子的技术制备。这些包括但不限于本领域技术人员已知的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和EBV杂交瘤技术。血管生成素的单克隆抗体也可商购(例如购自Abeam,UK;GeneTex,USA;BACHEM,USA)。

[0084] 单克隆抗体可用较少量的血管生成素作为免疫原生产,所述血管生成素不必是纯的。一旦建立杂交瘤细胞系,则其可用于生产可能无限的抗体供应,具有可重复性。此外,所述单克隆抗体会结合于单个表位并会具有同质的结合和洗脱性质。

[0085] 免疫吸附剂性能取决于其上面固定有抗体的支持物的性质。本领域技术人员会理解,有效的免疫吸附剂应理想地具有机械和物理稳定性、合适的流动性、可接受的压力下降、最小非特异性结合、用于蛋白-抗体相互作用的大表面积和化学稳定性。

[0086] 在这点上,基于聚合物和/或琼脂糖的基质支持物例如琼脂糖凝胶是常用并且是市售的。将用于本发明亲和色谱方法中的支持物的合适基质的实例包括CNBr-活化的Sepharose(GE Healthcare)、Emphaze™活化的色谱树脂(Pierce Chemical)、CM Bio-Gel A凝胶(Bio-Rad)、ECH Sepharose 4B(GE Healthcare)、Reacti-Gel 6X(Pierce Chemical)、蛋白A和G Sepharose CL 4B Beads(Pierce Chemical)、HiTrap NHS-Activated(GE

Healthcare) 和 AffiPrep 10 (Bio-Rad)。

[0087] 所述免疫吸附柱的有效功能倚赖于使所述抗体偶联于所述基质藉此固定所述抗体的活化化学。通常采用共价偶联。如会为本领域技术人员所知的,存在多种不同的用于使抗体共价结合于固相基质的方案;然而,最容易的是使抗体偶联于蛋白A或蛋白G小珠。蛋白A或G基质特异性地结合于抗体的F_c结构域。抗体结合后,通过用双官能偶联剂将抗体与蛋白A或G共价交联而稳定相互作用。

[0088] 另一方法是使抗体与已被化学改性以含有活性基团的基质小珠偶联。将活化小珠与抗体混合,所述抗体与活性位点相互作用以形成共价键。此方法优于使用蛋白A或G基质的方法的优点在于:所述小珠可在比蛋白可承受的条件严苛得多的条件下活化,从而允许使用多种本领域已知的活化方案(也参见Porath and Axen,1976,Methods Enzymol.44:19to45;Scouten WH,1987,Methods Enzymol.135:30to65)。此方法的其他优点包括如上所述存在多种市售活化小珠,以及这些偶联方法中的许多都可产生对大范围变性条件稳定的键。

[0089] 可通过多种方法实现对所述基质小珠进行化学改性以产生活性基团,包括以羰基二咪唑、溴化氰、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、氯化碘乙酸和三氟代乙烷磺酰氯处理。

[0090] 所述活化小珠与血管生成素抗体之间的偶联主要是通过所述抗体上存在的伯氨基基团或巯基基团介导的。例如,可以以如下方式实现抗体(通过氨基基团)与NHS-活化的基质(例如AffiPrep)偶联以产生功能免疫吸附剂。将以悬浮于乙醇中的小珠(50%v/v)的浆体形式提供的合适量的活化AffiPrep基质倒入烧结的玻璃漏斗中并且通过温和和真空吸取所述液体。用玻棒搅拌剩余的悬浮液并一直保持潮湿。用冰冷的蒸馏水洗涤所述活化小珠以确保除去全部乙醇。用温和和真空使所述小珠排尽水,将湿润的小珠转移至一个含有溶于偶联缓冲液(0.1M 4-吗啉基丙磺酸(MOPS)、0.1M NaCl,pH 7.2)的3-5mg/ml血管生成素抗体溶液的烧瓶中。然后在冷室中将该烧瓶中的内容物低速混合过夜或在室温下混合4小时。所述偶联涉及小珠上的活化酯与抗体上的活性胺之间的反应,这最终导致稳定酰胺(共价)键的形成。在偶联步骤完成后,可使所述小珠在室温下沉降,然后通过抽取或倾析除去上清液。然后将封闭溶液(1M乙醇胺,pH 8.0)至所述免疫吸附剂并在室温下低速混合1小时。该封闭步骤完成后,再使所述小珠沉降并除去上清液。为确保未使用活化位点的完全封闭,将该封闭步骤再重复两次。

[0091] 然后将配体偶联缓冲液(10mM Tris HCl,50mM NaCl,pH 6.8)加入抗体偶联的小珠中,在室温下将内容物低速混合1小时。优选地,将此步骤再重复4-5次以确保从小珠除去全部封闭溶液。然后将所述免疫吸附剂重悬浮于合适量的配体偶联缓冲液中并保存在4℃待用。因此所述免疫吸附剂即可使用并可通过重力装入柱中用于血管生成素结合。

[0092] 可将所述柱用合适的洗涤缓冲液“平衡”,然后将乳样品加入准备好小珠的柱中。合适的洗涤缓冲液的实例包括但不限于含有10mM Tris HCl和50mM NaCl,pH为7.0的那些;含有10mM Tris HCl、140mM NaCl、0.5%Triton X-100和0.5%脱氧胆酸钠,pH为8.0的那些;含有10mM Tris HCl、140mM NaCl和0.5%Triton X-100,pH为8.0的那些;含有10mM Tris HCl、140mM NaCl和0.5%Triton X-100,pH为9.0的那些;以及含有150mM NaCl、0.1% Triton X-100和50mM三乙醇胺的那些。所述柱可用一种或多种上述洗涤缓冲液平衡。

[0093] 通常实行但不必需的是,先使样品通过含有与免疫吸附柱相同支持物但不含连接

于所述支持物的抗体的预备的不同“前置柱”，然后将所述乳样品加入经平衡的免疫吸附（含有抗体）柱中。这将进一步确保所述样品不含可能与所述免疫吸附柱非特异性结合的物质。在加入乳样品之前，使用如上所述的洗涤缓冲液以与平衡所述免疫吸附柱相同的方式平衡所述前置柱。

[0094] 更优选地，先从所述乳样品中除去脂肪（通常称为去脂），然后再将所述乳样品加入经平衡的免疫吸附柱和前置柱（如果使用的话）中。然而这不是必需的。脂肪可以以本领域已知的任何常规方法除去，包括低速离心、分离或微滤。任选地，也可例如通过1微米膜的微滤、凝乳或酸沉淀除去酪蛋白，然后再进行免疫亲和色谱法。如果选择微滤，酪蛋白会被膜保留而乳清蛋白包括血管生成素会进入渗透物。

[0095] 如果通过微滤或其他膜方法除去酪蛋白，那么将渗透物直接施加于经平衡的免疫吸附柱和前置柱（如果使用的话），或者任选地将所述渗透物浓缩后再施加。合适的浓缩方法包括过滤（例如用0.5–10kDa膜的超滤、用150–500Da膜的纳米过滤，或只允许水透过膜的反渗透），或冷冻干燥，然后重悬浮于上述洗涤缓冲液。

[0096] 通常以每小时0.2–2倍柱体积的流速将所述乳样品（粗品或经预处理的）加入前置柱和/或预处理（primed）的免疫吸附柱（即所述固体支持物）中。然而，最快至每小时5倍柱体积的流速也是合适的。一旦加入全部样品，则使用上面公开的任意一种或多种洗涤缓冲液进行一系列洗涤步骤。施加所述洗涤缓冲液直至通过所述柱的洗涤缓冲液在280nm处于基线吸光度。这表明不再有未结合蛋白从柱上被洗脱。

[0097] 对通过抗原（捕获剂）结合于所述固体支持物的血管生成素的分离可以倚赖所用固体支持物的性质以多种方式实现。重要的是避免可能使所述血管生成素变性的分离条件。如会为本领域技术人员所理解的，当选择合适的分离方案时可考虑多种可用的分离策略。这些策略可包括酸分离、碱分离和使用离液剂（chaotropic agent）。

[0098] 酸分离是最广泛使用的方法并且通常是非常有效的。广泛使用的酸包括甘氨酸-盐酸（pH 2.5）、0.02M HCl和柠檬酸钠（pH 2.5）。然而，为避免酸引起的变性，分离后必须将所分离样品的pH用2M Tris碱（pH 8.5）迅速中和至pH 7.0。碱分离通常倚赖由1M NH₄OH、50mM二乙胺（pH 11.5）或含有150mM NaCl和0.1% Triton X-100的50mM三乙醇胺溶液构成的分离剂。

[0099] 离液剂破坏蛋白的三级结构并因此可用于打断血管生成素：抗体复合物。可使用离液剂是因为其打断离子相互作用、氢键并有时打断疏水相互作用。有效的离液序列高的阴离子包括SCN⁻、ClO₄⁻、I⁻、Br⁻和Cl⁻。有效的离液序列高的阳离子包括Mg、K和Na。分离剂例如8M脲、6M盐酸胍和4M NaSCN可有效地打断大多数抗体：抗原相互作用。然而，为最小化离液盐引起的蛋白变性，建议对分离剂进行快速脱盐或透析。

[0100] 收集从固体支持物分离出来的样品并分析血管生成素的存在情况，从而确定血管生成素富集的程度。合适的分析步骤包括对染色SDS-PAGE的密度计分析以比较血管生成素特异蛋白与任何存在的污染蛋白的条带丰度；质谱例如MALDI-TOF/TOF MS；免疫亲和检测例如蛋白质印迹或ELISA；氨基酸分析和测序；阳离子交换色谱法和反相色谱法。这些技术的每一种都可为本领域技术人员所知。

[0101] 第三方面提供一种方法，其中将（以液相形式提供的）乳样品的组分（包括血管生成素）加至能够基于所述乳样品组分的尺寸使组分相互分离的第二相。然后可收集所分

离的血管生成素,基本上提供血管生成素富集产品。

[0102] 当在本文中使用时,对于乳的组分——包括血管生成素——所提及的“尺寸”应认为是指该组分的“流体力学直径”或“流体力学体积”。组分的“流体力学直径”或“流体力学体积”是指当所述组分以液体形式运动时表现出的直径或体积。

[0103] 在本发明的上下文中“第二相”是指可基于所述乳样品的每一组分的尺寸分离各个组分的任何机构。

[0104] 在一个实施方案中,所述第二相是半渗透相。“半渗透相”是指一种非水相,所述乳样品的组分可与该半渗透相相互作用,并且可通过该半渗透相或被该半渗透相所保留。

[0105] 术语“渗透物”是指所述乳样品通过或透过所述第二相的组分。

[0106] 术语“保留物”是指所述乳样品被所述第二相所保留的组分。

[0107] 例如所述半渗透相可为膜或过滤器等,其可基于该相的相对孔隙度根据尺寸分离乳组分从而起到分子筛的作用。

[0108] 在本发明的上下文中,被所述第二相所“保留”的组分基本上被所述第二相捕获或无法通过所述第二相。被所述第二相所“保留”的组分是可从第二相除去的保留物的一部分,其只是不能通过所述第二相。收集通过所述第二相的组分作为渗透物。

[0109] 在一个实施方案中,所述第二相是半渗透膜。在本发明的上下文中,术语“膜”与术语“网”和“过滤器”等同义。所述膜可由使所述膜具有半渗透性或“多孔性”的任何材料制成,即所述材料能够基于膜上孔、洞等的尺寸允许或阻止分子通过所述材料。例如,合适的材料包括但不限于热塑性塑料例如聚砜(PSU)、聚醚砜(PES)、醋酸纤维素、尼龙、聚偏氟乙烯(PVDF)、聚四氟乙烯(PTFE)、聚碳酸酯、聚醚酰亚胺和聚丙烯腈。这些膜可从例如Millipore、Sartorius、GE Healthcare (Osmonics)、Koch Membrane Systems商购。

[0110] 对于第三方面的方法,可选择一种第二相,使得血管生成素可通过所述第二相,但阻止比血管生成素大的分子通过。例如,分子量截止值在20kDa和50kDa之间的任何第二相都可接受。

[0111] 术语“分子量截止值”用于表明能通过所述第二相的组分的最大分子尺寸。在一个优选实施方案中,最佳第二相的分子量截止值为30kDa。

[0112] 应理解,可使用本发明方法进行另外一轮或多轮纯化。所述一轮或多轮纯化的目的是进一步浓缩初步纯化获得的血管生成素并降低不想要杂质的浓度。在此点上,所述另外一轮或多轮纯化可使用分子量截止值小于血管生成素尺寸的第二相,例如可选择分子量截止值为5kDa或10kDa的第二相。这样,血管生成素会被阻止通过所述第二相并被所述第二相所保留。然后,如果需要的话,可使用诸如冷冻干燥或喷雾干燥的方法干燥被所述第二相所保留的纯化血管生成素。

[0113] 在将乳样品加至所述第二相后可对所述样品施加压力从而基本上迫使其通过所述第二相。力可通过提供不超过290psi (20Bar)、更优选218psi (15Bar)、甚至更优选145psi (10Bar)压力的任何机构施加。

[0114] 例如,所述力可以通过注射器、压缩气体(即搅拌式超滤装置(stirred cell))、泵、离心机或其任何实用组合施加的力。理想地,所述力是以压力为70psi (5Bar)的压缩氮气气瓶施加。

[0115] 所述第三方面方法的变型还可利用对血管生成素蛋白特异的粘合剂。原理是血管

生成素与所述粘合剂的结合物的尺寸会比血管生成素自身更大。因此,当血管生成素与所述粘合剂复合时,可使用所述第三方面方法使血管生成素与尺寸相似的乳组分分离。在此点上,可选择一种第二相,其保留所述血管生成素-粘合剂复合物并允许尺寸小于所述复合物的乳样品其他组分通过所述第二相。

[0116] 所述粘合剂与血管生成素之间的相互作用应该是可逆的,从而可使用本发明方法使血管生成素最终与所述粘合剂分离。在此实例中,可选择一种第二相,其使得可进行这种根据粘合剂与血管生成素的相对尺寸的分相。因此,血管生成素可被所述第二相保留或可通过所述第二相,反过来对于所述粘合剂也是这样。

[0117] 所述第三方面方法的任何其他变型也被考虑在本发明的范围内。例如,可首先使用所述第三方面方法,其中无粘合剂存在。然而,包含血管生成素的产品可与粘合剂结合从而形成血管生成素-粘合剂复合物。然后可将所述产品加入另一第二相以除去所述产品中存在的非血管生成素组分。此后,可逆转所述粘合剂与血管生成素之间的相互作用并通过将所述组分施加于另一第二相而使其分离。

[0118] 当在本文中用于第三方面时,术语“粘合剂”是一种能够与血管生成素蛋白相互作用或与其形成复合物并使其保留的实体。在此上下文中术语“保留”或“保持”是指保持或结合血管生成素蛋白。理想地,所述粘合剂只对所述乳样品中存在的血管生成素蛋白具有特异性;然而,本领域技术人员应理解所述乳样品中的其他组分也可能与所述粘合剂非特异性地相互作用。因此,首选的粘合剂是呈现最小非特异性结合的粘合剂。

[0119] 合适的粘合剂可包括但不限于:血管生成素的抗体、肽或蛋白(包括结合血管生成素的蛋白,例如卵泡抑素)、化学实体、受体、配体、多糖、脂质、聚合物例如DEAE葡聚糖、激素等。所述粘合剂优选为抗体或其功能性片段。

[0120] 所述相互作用可以是直接的,也可以是间接的从而使得所述捕获剂与血管生成素的相互作用为使所述捕获剂与血管生成素接触的第三种(或更多)试剂所介导,例如接头分子、肽等。

[0121] 术语“血管生成素的抗体”或“抗体”包括用于第三方面时意义与如上所述用于第一和第二方面时意义相同的多克隆和单克隆抗体类型。

[0122] 可分析在第三方面方法的分离步骤后收集的渗透物或保留物中血管生成素的存在情况并从而确定血管生成素富集的程度。

[0123] 第四方面提供另一种方法,其中使所述乳样品的组分(包括血管生成素)基于其尺寸而相互分离。一种依照第四方面所述的方法通常称作尺寸排阻色谱法。

[0124] 当用于第四方面时,术语“尺寸”具有与如上所述用于第三方面时相同的意义。

[0125] 术语“尺寸排阻色谱法”包括称为凝胶渗透、凝胶渗透色谱法、凝胶过滤或凝胶过滤色谱法的方法。以下,任何提及“尺寸排阻色谱法”之处都应认为包括任何上述术语,或者基于其尺寸来分离蛋白与其他蛋白或其他生物分子的任何其他类似色谱方法。

[0126] 第四方面方法的原理是其提供一种方法,其中使得乳样品溶液中的组分可与第二相接触,其中所述第二相影响产物组分的流速,因为所述组分与第二相相互作用和/或基于所述组分的尺寸通过第二相。所述产物组分分离开,因为所述样品中存在的各种组分的运动因其被第二相“俘获”而减慢,并随后被释放。

[0127] 在本发明的上下文中“第二相”是指可基于所述乳样品的每一组分的尺寸控制各

个组分的运动的任何机构。

[0128] 对于第四方面,所述第二相可为固相。“固相”是指一种非水基质,所述乳样品的组分可与所述基质相互作用和/或通过所述基质。所述固相可为纯化柱、离散颗粒的非连续相、树脂、膜或过滤器等。用于形成所述固相的材料实例包括多糖(例如琼脂糖和纤维素);以及其他机械稳定的基质例如二氧化硅(例如受控孔隙的玻璃)、聚(苯乙烯二乙烯)苯、聚丙烯酰胺、陶瓷颗粒以及上面任何材料的衍生物。

[0129] 在第四方面的一个实施方案中,所述第二相为可装入色谱柱的树脂。在这点上,所述俘获可通过组分进入所述树脂中存在的孔而进行。大于所述孔直径的分子不能进入那些孔并迅速从所述柱中流出,而较小的分子进入所述树脂的孔,花费更长的时间才能通过所述柱。俘获速度及随后释放的速度随组分不同而变动,从而出现利用尺寸排阻而分离的现象。

[0130] 如果所述第二相由多孔树脂构成,那么所述多孔结构理想地必须界限明确并具有批次间的可重复性,并且孔尺寸的分布和形状应尽可能窄。此外,含有所述树脂的柱的总孔体积(pore volume)与空体积(void volume)的比例应尽可能高以拓宽分离窗口,从而提高峰容量。如果所述树脂尺寸较小(例如5 μm 或更小)并规则,那么可进一步提高分离效率。最后,所述树脂柱理想地应具有大于5mm的直径,其应较长(任何大于100mm的长度)并应被树脂紧密填充。

[0131] 所述树脂可由聚丙烯酰胺、葡聚糖、琼脂糖、二氧化硅或交联聚苯乙烯构成。适于尺寸排阻色谱法的树脂的实例可包括但不限于Superose (GE Healthcare)、Sephadex (GE Healthcare)、Sephacryl (GE Healthcare)、**TSK-GEL**[®] HHR (Tosoh Biosciences)、Toyopearl HW (Tosoh Biosciences) 和 TSK-GEL PW (Tosoh Biosciences)、**Ultrogel**[®] AcA (IBF Biotechnics, Inc) 以及 Bio-Gel A (Bio-Rad)。最合适的树脂应为可将分子量为10kDa到20kDa的蛋白进行良好分离的那些。合适树脂的实例包括 Superose 12、Sephadex 75、Sephacryl S-100HR、Toyopearl HW-50、TSK-GEL PW-50、**Ultrogel**[®] AcA 54 和 Bio-Gel A 1.5M。最优选地,所述树脂将为 Sephacryl S-100HR。

[0132] 对于分离树脂的制备(“平衡”)以及所述分离方法自身,待使用的理想缓冲液应具有低的摩尔渗透压浓度并具有中性pH。理想地,合适的缓冲液包括水、磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲盐水,但也可使用具有类似性质的其他缓冲液。

[0133] 然而,由于血管生成素是一种非常稳定的蛋白并可在变性后重折叠,因此合适的缓冲液也可具有非常低或非常高的pH,具有高摩尔渗透压浓度或含有变性剂(例如十二烷基硫酸钠、脲或胍),所述变性剂可后来除去而不影响血管生成素的生物活性。

[0134] 理想地,使大于2倍柱体积(CV)的缓冲液通过所述色谱柱以平衡所述柱,然后再施加所述乳样品。平衡过程中的流速为0.1-3CV/h。优选地,所述流速为0.66CV/h,但如果压力不超过所述树脂可耐受的压力那么1CV/h也可接受。分离过程中的流速也为0.1-3CV/h。优选地,所述流速为0.375CV/h,但可接受的分离可通过最快至0.66CV/h的流速实现。

[0135] 施加于经平衡柱的样品体积可为0.005-0.2CV,理想地为0.015-最高至0.05CV。所施加样品中存在的蛋白量可为0.001-0.2克蛋白/mL CV,理想地为0.0016g蛋白/mL CV-最高至0.05克蛋白/mL CV。

[0136] 分离一般在上述条件下进行约1-2小时。理想地,用UV分光光度计在280nm监测流出所述柱的分离样品级分。血管生成素在免疫球蛋白、乳铁蛋白和乳酸过氧化物酶后,但在大多数生长因子之前洗脱出来。应收集各级分以确保血管生成素被捕获。重叠的乳铁蛋白和乳酸过氧化物酶的峰会显示为棕绿色带,因此在棕绿色带流出之前不需进行收集。如果全部 β -乳球蛋白已被所述柱除去,那么下个峰会是血管生成素。

[0137] 第五方面提供一种从乳中获得血管生成素富集产品的方法,在该方法中,当所述乳样品流过电场时,根据血管生成素的电荷和电泳迁移率将所述乳样品中存在的血管生成素蛋白与所述样品中存在的其他蛋白分离或分级分离。因此所述乳样品作为“水性乳流”提供。

[0138] 回收被施加所述电场的乳流级分,并鉴定那些血管生成素富集的级分。

[0139] 第五方面的方法倚赖使用电场根据蛋白的电泳迁移率或等电点来分离混杂蛋白群。所述技术还倚赖在无载体介质即无固定相(或固体支持材料)的液体(水性)介质中分离蛋白,以最小化由吸收造成的样品损失。这一技术通常称为自由流动电泳。

[0140] 第五方面的一种方法可在由相互平行且间隔狭窄的两块板构成的电泳箱中进行。所述板的侧面有两个电极(阳极和阴极),所述电极在所述两块板之间产生高压电场。一种通常称为“分离缓冲液”的缓冲介质匀速流过所述箱,其中所述电场的施加方向横于缓冲介质和待纯化乳样品两者的流动方向。

[0141] 在第五方面的上下文中,“横于”是指以一个角度(即不平行)或在一个与其不同的平面上将电流施加在所述缓冲介质和乳样品流。

[0142] 将待分析的样品施加于所述电场,并在通风橱下将所述样品输送到两块板之间的缓冲介质中。带电颗粒因它们的电荷性质而被偏转,从而允许随后的分离。由于每种蛋白都具有不同的电荷量,因此它们在电场中的电泳迁移率也不同。因此,每种蛋白在所述分离缓冲液中流过所述电泳箱时都结合所述分离缓冲液流速发生偏转并被分离。此方法可用于连续分离蛋白并因此可用于血管生成素在工业规模上的有效分离与纯化。

[0143] 本领域已知多种自由流动电泳技术,每一种的物类分离模式都是独特的。例如,物类可根据它们的PI(等电点聚焦)、净电荷密度(区带电泳)和电泳迁移率(等速电泳、场分布电泳和场流分离)而被分离。

[0144] 自由流动电泳技术可以多种模式进行,包括例如连续模式或短暂停止(间歇)模式。在连续施加模式中,所述乳样品被连续施加于所述箱中,藉此,在整个分离过程中在缓冲介质(分离缓冲液)连续流动并在电场被不间断施加的情况下,血管生成素与样品中的其他组分分离。在间歇模式中,所述乳样品和分离缓冲液被引入所述箱的分离空间或“区带”中,然后进行分离过程,其中在施加电场时包括所述样品的介质总体流动被停止从而实现分离。在分离/分级分离所述样品后,将电场关闭或减小至不起作用,并重新开始总体流动从而驱动所分级样品通过所述箱并继而收集。

[0145] 所述自由流动电泳技术还可在变性条件下进行,例如通过加入脲或本领域已知的合适洗涤剂。本领域技术人员会理解血管生成素的PI会与其天然状态下的PI相似。

[0146] 第五方面的一种方法可包括上述自由流动电泳技术中的每一种。优选地,血管生成素根据其PI以连续模式从所述乳样品中被分离。

[0147] 在这点上,如会为本领域技术人员所理解的,合适的缓冲介质即分离缓冲液可包

包括但不限于：二元缓冲系统(A/B介质)、市售两性电解质例如**Servalyt**[®](Serva, Germany)、互补多对缓冲系统例如Prolyte分离缓冲液I和II(Becton Dickinson Diagnostics, Germany)以及挥发性缓冲液系统。此外,由K.Hanning和K.H.Heidrich出版的书籍“Free-flow Electrophoresis”(ISBN 3-921956-88-9)提供了一个适用于自由流动电泳的分离介质的列表。

[0148] 为根据其PI分离血管生成素,所选择的缓冲介质将适于在所述箱的分离空间中形成pH梯度。在这点上,优选Prolyte分离缓冲液I和II。分离缓冲液I含有29%的IEF Prolyte缓冲液2,分离缓冲液II含有17%的Prolyte缓冲液2、50mM HEPES和42mM 6-氨基己酸。

[0149] 术语“pH梯度”意指未观察到分明的pH边界。在此定义下,对于目的部分,等电点聚焦装置中的pH梯度图会显示为无尖锐转折的较平滑曲线。对于血管生成素的分离,所述梯度优选8-11的pH范围。

[0150] 第五方面的方法可通过加入稳定介质和逆流介质而改进。例如,可将一种逆流介质与在所述电极之间移动的总分离缓冲液和样品的连续流动方向相反的方向加入所述分离空间。

[0151] 稳定介质可用于稳定由例如合适的二元缓冲系统形成的分离空间内的条件。因此一种合适的稳定介质也用作提供或替换分离空间中离子的“贮库”。

[0152] 本文所用的术语“稳定介质”是指一种由两种组分组成的介质。第一种组分是一种阴极稳定介质,第二种组分是一种阳极稳定介质。所述阴极或阳极稳定介质可包括一元酸和/或一元碱。本领域技术人员会理解在所述稳定介质中形成的离子具有非常低的电泳迁移率。

[0153] 对于血管生成素的有效分离和纯化,一种合适的阳极稳定介质由100mM硫酸、50mM乙酸、100mM DL-2-氨基丁酸和30mM甘氨酸-甘氨酸组成,而一种合适的阴极稳定介质由100mM氢氧化钠、30mM乙醇胺和300mMβ-丙氨酸组成。

[0154] 进行本发明的自由流动电泳方法的合适装置是市售的。例如Becton Dickinson FFE System(BD Diagnostics, Germany)。

[0155] 优选从所述乳样品中除去脂肪(通常称为去脂),然后再将所述乳样品加至电场;但这种去脂并不是必需的。去脂方法是本领域已知的并且这些方法的实例在下文中有记载。任选地,也可使用本领域已知的方法除去酪蛋白,然后再进行自由流动电泳方法,这些除去酪蛋白方法的实例也在下文有记载。

[0156] 如果通过微滤或其他膜方法除去酪蛋白,那么将渗透物直接施加于所述自由流动电泳装置,或者任选地将所述渗透物浓缩后再施加。合适的浓缩方法包括过滤(例如用0.5-10kDa膜的超滤、用150-500Da膜的纳米过滤,或只允许水透过膜的逆渗透),或冷冻干燥,然后重悬浮于可用于自由流动电泳的缓冲液。

[0157] 优选地,先从所述乳样品中除去脂肪(通常称为去脂),然后再进行第三、第四或第五方面的方法。然而这不是必需的。脂肪可以以本领域已知的任何常规方法除去,包括低速离心、分离或微滤。

[0158] 可任选地对去脂乳样品进行另一“处理”步骤,然后再进行第三、第四或第五方面的方法。这一步骤可包括使所述样品通过阴离子交换柱。这些方法是本领域已知的。例如,阴离子交换柱可填充官能团例如DEAE(二乙胺基乙基)、Q(季铵)、QAE(二乙基-(2-羟丙基)

氨基乙基)连接于合适的支持物(例如纤维素、聚丙烯酰胺、葡聚糖、琼脂糖、二氧化硅或交联聚苯乙烯)的树脂。所述去脂乳样品可以10CV/h(尽管可使用最快至1000CV/h)的流速通过所述柱直至施加10CV的去脂乳(尽管可使用0.1CV至50CV)。可预期的是,蛋白例如 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白和牛血清白蛋白会被除去。色谱样品中保留的蛋白主要会是乳铁蛋白(LF)、乳酸过氧化物酶(LP)和免疫球蛋白;然而,血管生成素也会以 $<1\%$ w/w蛋白的浓度存在并可被进一步纯化。

[0159] 在第一到第五方面的每个方面的另一实施方案中,先将乳样品加热,然后再进行所述方法。加热乳样品可降低样品中乳酸过氧化物酶和其他变性温度低于血管生成素的蛋白的量并因此提高血管生成素的量。

[0160] 可分析从第一到第五方面的方法获得的级分中血管生成素的存在情况并从而确定血管生成素富集的程度。合适的分析步骤包括染色SDS-PAGE的密度计分析以比较血管生成素特异蛋白与任何存在的污染蛋白的条带丰度;质谱例如MALDI-TOF/TOF MS;免疫亲和检测例如蛋白质印迹或ELISA;氨基酸分析和测序;阳离子交换色谱法和反相色谱法。这些技术的每一种都可为本领域技术人员所知。

[0161] 第一到第五方面的任一方面的方法均可独立进行以获得血管生成素富集产品,或可作为联合分级分离方法的一部分纳入,在该方法中其他所需的乳产品组分也被分级分离。

[0162] 可对通过第一到第五方面的任一方面的方法获得的血管生成素富集产品进行进一步处理以除去残余的非血管生成素蛋白和/或除去盐。这被认为对于标准化食品或营养品的生产以及对于医药级血管生成素的制备很重要。这些步骤可通过以下方式实现:阳离子交换色谱法、一或多个额外的自由流动电泳步骤、免疫亲和色谱法、膜过滤、理想地超滤,或者本领域已知的等同方法例如透析、电透析、尺寸排阻色谱法、固相萃取、纳米过滤或其他已知方法。本领域技术人员会理解,当血管生成素用于生产食品物质或营养品时,其纯度不需如生产医药或兽药组合物所需的那么高。例如,纯化至60%水平的血管生成素可被认为是可接受的。

[0163] 由于血管生成素参与多种生理功能,因此使用本发明方法富集此蛋白提供了随后可针对这些功能的蛋白的一种理想和经济的来源。例如纯化的蛋白可用于制备食品物质、营养品、医药或兽药产品。

[0164] 在第一到第五方面的任一方面的另一实施方案中,在所述方法进行之前或进行中将酪蛋白从所述乳样品中除去。也可在所述方法进行之前或进行中浓缩所述乳样品中的蛋白。

[0165] 合适的乳样品可包括全乳、脱脂乳、酪乳、乳清(例如酸或奶酪/凝乳乳清或者乳或脱脂乳的微滤渗透物)或乳清级分(例如乳清蛋白浓缩物或乳清蛋白分离穿流液)以及初乳。

[0166] 本领域技术人员会明了,所述乳样品可从任何泌乳动物获得,例如反刍类如奶牛、绵羊、水牛、山羊、牦牛和鹿,非反刍动物包括马和驴,灵长类例如人,以及单胃类如猪。所述动物可为转基因动物,特别是改良以在其乳中表达比同种野生型动物更多的血管生成素的动物。

[0167] 在第一到第五方面的任一种方法中,优选地使用源于全牛乳——任选地来自在其

乳中过表达血管生成素的转基因奶牛——的脱脂乳作为乳样品。

[0168] 此外,已经证明在牛乳中,血管生成素在哺乳期的首个1-14天内以最高或最浓的量(最多至12mg/升)存在。此后,所述浓度下降至约1-2mg/升的基础水平。因此,在本发明方法中优选使用在哺乳期的首个14天内获得的牛乳。考虑到哺乳期较晚期的牛乳中剩余的血管生成素水平,其也可用作富集血管生成素的来源。

[0169] 术语“血管生成素富集产品”是指所述产品中存在的血管生成素蛋白:总蛋白的比例高于进行所述方法前乳样品中存在的比例。对于被认为血管生成素富集的产品,应具有至少2%w/w、至少10%w/w、至少20%w/w、至少30%w/w、至少40%w/w、至少50%w/w、至少60%w/w、至少70%w/w、至少80%w/w、至少90%w/w、至少95%w/w或至少99%w/w的血管生成素含量。

[0170] 在第一到第五方面方法的上下文中,术语“产品”并非意图将本发明限制于血管生成素富集的最终产品的生产。通过本发明方法生产的血管生成素富集产品可用作其他产品的生产中的起始或中间产品。

[0171] 本文所用的术语“级分”是指所述乳样品经部分纯化的部分。

[0172] 术语“有效的和商业可行的”的使用是指与目前采用的富集血管生成素的方法相比低廉并且快速的方法。

[0173] 可受益于存在血管生成素的典型食品物质包括运动营养添加剂、婴儿食品添加剂或者用于体弱者、疾病患者或老年人的食品添加剂。

[0174] 本文所用的术语“营养品”是指一种从食物中(在本文中从乳样品中)分离或纯化的可食用产品,所述产品被证明口服时具有生理益处或对急性或慢性疾病或损伤提供保护作用或缓解作用。因此营养品可以以单独或者与可食用食品或饮料混合的饮食制品或添加剂的形式存在。

[0175] 所述食品或营养品组合物可为可溶性粉末、液体或即饮制剂的形式。或者,所述食品或营养品组合物可为固体形式例如即食棒或早餐谷类食品的形式。还可存在各种香料、纤维、增甜剂和其他添加剂。

[0176] 所述食品或营养品优选地具有可接受的感官性质(例如可接受的气味、味道和适口性),并还可包含选自维生素A、B1、B2、B3、B5、B6、B11、B12、生物素、C、D、E、H和K以及钙、镁、钾、锌和铁中至少一种的维生素和/或矿物质。

[0177] 所述食品或营养品组合物可以以常规方式生产;例如,所述组合物可通过将所述蛋白和其他添加剂混合在一起而制备。如果使用,所述混合物中也可包括乳化剂。其他维生素和矿物质也可在此时加入但通常在以后加入以避免热降解。

[0178] 如果需要生产粉末状食品或营养品组合物,那么可将所述蛋白与粉末形式的其他组分混合。所述粉末的水分含量应小于约5重量%。然后可混入水,优选已进行逆渗透的水,以形成液体混合物。

[0179] 如果所述食品或营养品组合物将以即食液体形式提供,那么可将其加热以减少细菌负荷。如果需要生产液体食品或营养品组合物,那么优选将所述液体混合物无菌地灌装到合适的容器中。所述容器的无菌灌装可使用本领域常用的技术进行。进行这种无菌灌装的合适装置是市售的。

[0180] 通过本发明方法获得的血管生成素富集产品也可被制剂为适于对患者给药的医

药组合物或兽药组合物。

[0181] 优选地,所述组合物还可包括一种或多种可药用载体、稀释剂或赋形剂。这种组合物可包括缓冲液例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖;甘露醇;蛋白;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂例如EDTA;佐剂和防腐剂。本发明组合物可被制剂用于静脉内给药、局部涂敷或口服。

[0182] 本文所用的术语“受试者”是指患有需要用药物活性剂治疗或预防的疾病的任何动物。所述受试者可为哺乳动物优选人,或可为非人灵长类或非灵长类动物,例如用于动物模型试验的那些。

[0183] 尽管特别考虑了所述血管生成素富集产品适用于人的医学治疗,然而其也适于兽医学治疗,包括对宠物例如狗和猫、家畜例如马、矮种马、驴、骡子、美洲驼、羊驼、猪、牛和绵羊,或动物园动物例如非人灵长类、猫科动物、犬科动物、牛科动物和有蹄类的治疗。

[0184] 所述血管生成素富集产品可以以适合待治疗和/或预防的疾病的方式对受试者给药。给药量和频率可由诸如受试者的身体情况以及受试者疾病的类型和/或严重程度的因素确定。合适的剂量还可通过临床试验确定。所述组合物的有效量可由医生考虑受试者在年龄、体重、疾病严重程度、身体情况的个体差异,给药途径以及与受试者的治疗有关的任何其他因素而确定。基本上,所述组合物的“有效量”是足以获得所需治疗效果的量。

[0185] 在另一方面,本发明提供用于治疗和/或预防疾病的方法。所述治疗方法包括给予受试者有效量的上述营养品、医药组合物或兽药组合物。优选地,所述疾病包括由病毒、细菌或真菌以及它们的毒素所导致的那些疾病。然而由于血管生成素在血管发生中起作用,因此需要血管生成素刺激的疾病也可使用本发明含血管生成素的组合物治疗。这些疾病包括冠状动脉疾病、中风、肢体缺血疾病和创伤愈合迟缓。

[0186] 本文所用的术语“治疗”和“疗法”是指减轻症状的严重程度和/或频率、消除症状和/或根本病因、防止症状的发生(预防)和/或其根本病因的发生,以及改善或矫正损伤。因此,例如,本发明的“治疗”疾病的方法包括在易患个体中预防疾病以及在呈现临床症状的个体中治疗疾病。

[0187] 本文所用的“治疗”涵盖对脊椎动物、哺乳动物特别是人类的病症的任何治疗或预防,并包括:抑制病症,即中止其发展;或缓解或改善所述病症的影响,即,使所述病症的影响减弱。

[0188] 本文使用的“预防”或“预防的”或“预防性的”疗法包括在易患所述病症但尚未被诊断为患有该病的受试者中防止所述病症发生或改善所述病症的继续发展。

[0189] 在整个说明书通篇中,除非上下文另有规定,否则词语“包含”或者变化形式例如“包括”或“含有”应理解为意指包括所述元素或整数或者元素或整数的集合,但并不排除任何其他元素或整数或者元素或整数的集合。

[0190] 必须指出的是,除非上下文另有清楚的指明,否则本说明书所用的单数形式(“一”、“一个”和“所述”)也包括复数方面。

[0191] 本领域技术人员会明了,尽管出于清楚和理解的目的已在某些细节上对本发明进行了描述,然而可对本文所述实施方案和方法作出各种改变和变化而不背离本说明书公开的本发明构思的范围。

[0192] 实施例现在参照以下实施例进一步详细描述本发明。除非另有指明,否则提供所

述实施例只是出于举例说明的目的,而非意图限制。因此,本发明包括因本文提供的教导而显而易见的任何和所有变化方案。

[0193] 实施例1:使用第一和第二方面的方法(免疫亲和色谱法)从脱脂乳获得血管生成素富集产品的方法

[0194] 现有技术已对免疫亲和色谱方法进行了广泛地描述,但不是血管生成素纯化的背景下(参见例如Subramanian A,2002,Molecular Biotechnology,20:41-47)。

[0195] 本发明申请人已经证明,现在血管生成素可使用本文公开的方法从乳样品中提取。

[0196] 本实施例中采用的免疫亲和色谱方法是使用来自合适来源例如Monash Antibody Technology Facility,Australia的血管生成素单克隆抗体进行的。

[0197] 用SP Sepharose Big Beads(GE Healthcare)填充10cm深的柱从而使该柱的总床体积为29.7L。向该柱中以331cm/h(每小时每升树脂34升脱脂乳)的线性流速施加脱脂牛乳流2小时,直至施加的脱脂乳的体积为装入该柱的树脂体积的68倍。

[0198] 通过以147cm/h的流速(每小时每升树脂15升缓冲液)加入2.5倍柱体积(CV)的水或者以0.25CV/分钟的流速加水10分钟而除去该柱中保留的乳。

[0199] 在本实施例中采用的免疫亲和色谱方法是使用血管生成素的单克隆抗体进行的。此处使用的抗牛血管生成素抗体为得自Department of Biochemistry,Chungbuk National University,Cheongju,Chungbuk,Korea的克隆号为1B14D4的单克隆抗体。此处使用的抗人血管生成素抗体为克隆号为14017的单克隆抗体(R&D systems Incorporated)。

[0200] 所述固体支持物为Dynabeads Protein G(Invitrogen)。使用以下方案使所述血管生成素抗体共价偶联于所述小珠。通过简单震荡20秒准备所述Protein G Dynabeads用于亲和纯化。震荡后,从储液(Invitrogen)中取出50 μ L的重悬浮IgG Dynabeads。使用磁性架(magnet stand)使所述Protein G Dynabeads沉淀1分钟。除去上清液,然后用200 μ L W&B缓冲液(含有0.01%Tween 20的0.1M磷酸钠缓冲液,pH 8.2)洗涤。重复此过程。将含有约5 μ g牛或人抗血管生成素小鼠单克隆抗体的W&B缓冲液(200 μ L)加入所述Protein G Dynabeads。将此溶液在室温下旋转孵育10分钟。将所述Protein G Dynabeads沉淀,除去上清液。用200 μ L W&B缓冲液洗涤IgG标记的Protein G Dynabeads。将所述IgG标记的Protein G Dynabeads沉淀,除去上清洗涤缓冲液。重复此洗涤步骤。为洗脱牛血管生成素,使用变性条件。将吸附有牛血管生成素的IgG标记的Protein G Dynabeads重悬浮于20 μ L 1x NuPAGE LDS样品缓冲液(Invitrogen;含有2%十二烷基硫酸锂和2-巯基乙醇)中并在70 $^{\circ}$ C加热10分钟。将所述Dynabeads置于磁铁上,除去样品并装入1-D凝胶进行蛋白染色(图1)和蛋白质印迹分析(图2)。

[0201] 实施例2a:使用第三方面的方法(超滤)从脱脂乳获得血管生成素富集产品的方法

[0202] 将牛脱脂乳施加于填充以SP(磺丙基) Sepharose的柱直至所施加的乳体积为填充到所述柱中的树脂体积的70倍(可施加最多至1000CV)。用6CV的水(低离子强度缓冲液,<0.008M NaCl或等价物)洗涤10分钟以除去所述柱中保留的乳。用6CV含有相当于0.4-0.5M NaCl,最优选0.4M NaCl的钠离子(尽管其他阳离子也适合)的缓冲液从所述柱中洗脱含有乳清生长因子的级分。范围为5.5-7.5的pH提供最高的WGFE产量。在配有5kDa膜的超滤装置

中通过渗滤将WGFE脱盐,并通过冷冻干燥干燥。

[0203] 将WGFE (1g) 溶解于50mL含有0.2% Triton X-100的水中。将所述溶液施加于具有30kDa分子量截止值的膜 (Viva Spin) 上并在20°C下以8000×g离心1.5小时。

[0204] 渗透物和保留物中的蛋白浓度使用2D-Quant试剂盒 (GE Healthcare) 测定。使用5倍体积的冰冷的丙酮沉淀蛋白并通过以10,000×g离心20分钟收集渗透物和保留物的沉淀。将所述沉淀重悬浮于含有7M脲、2M硫脲、1.2%CHAPS、0.4%ASB-14、10mM Tris HCl和0.05%载体两性电解质的2D-电泳缓冲液中。使用三丁膦还原蛋白并用丙烯酰胺单体烷基化。将蛋白(100μg)上样到24cm、pH 3-11的非线性IPG条 (GE Healthcare) 并再水化过夜。

[0205] 等电点聚焦使用100V 2小时,500V 2小时,1000V 2小时,在4小时内线性增加至8000V,最后8000V 8小时。将IPG条在含有8M脲、2%SDS的平衡缓冲液中平衡15分钟,然后使用50V进行SDS PAGE电泳1小时,继而以150V电泳12小时。将凝胶在乙酸/甲醇/水(1:3:6)中固定并用Sypro Ruby (Invitrogen) 染色过夜。使用ProXpress成像系统 (Perkin Elmer) 抓取图像(图3)。观察到所述渗透物富含血管发生素,如图3圆圈内的条带所表明的,并且污染蛋白的含量明显下降。

[0206] 实施例2b:使用第三方面的方法(超滤)从脱脂乳获得血管生成素富集产品的方法

[0207] 含有生长因子的乳清级分以与实施例2a中相同的方法制备。

[0208] 将含有生长因子的乳清级分(2.5g)加入95g水中并以250rpm摇动30分钟以得到2.5%w/w的溶液。将所述溶液(15g)置于4个Vivaspin 20 (GE Healthcare) 离心机驱动的超滤装置(10kDa、30kDa、50kDa和100kDa)中。将管以4000×g离心10分钟,这导致大约2mL渗透物通过所述膜。

[0209] 通过SDS PAGE分析所述溶液和超滤渗透物。将每个样品(100μL)与100μL Tris-tricine样品缓冲液 (NuSep, Frenchs Forest, Australia) 混合。从每个样品中取蛋白(10μL)施加于Tris-tricine PAGE凝胶(16%丙烯酰胺, NuSep),以150V分离90分钟并用Coomassie Blue (NuSep) 染色。结果示于图4。现有技术已通过质谱表明在未分级分离的WGFE中存在的14kDa峰为血管生成素 (PCT/AU2007/001719“制备血管生成素的方法”,图2)。与血管生成素大小相同的条带被发现代表在50kDa渗透物和100kDa渗透物中存在的主要蛋白。10kDa渗透物和30kDa渗透物中不存在血管生成素。现有技术已证明血管生成素可通过30kDa膜,因此此结果意料不到并很可能是异常的。

[0210] 实施例3:根据第四方面(尺寸排阻色谱法)从脱脂乳获得血管生成素富集产品的方法

[0211] 含有生长因子的乳清级分以与实施例2a相同的方法制备。

[0212] 将乳清生长因子(5g)加入45g水中并以250rpm摇动30分钟以生产10%w/w溶液。通过离心(15000×g,6分钟)和过滤(0.45μm注射器驱动的过滤器)使所述WGFE溶液澄清。以3.5mL/min的流速用50mM Na₂HPO₄ (pH7.0)平衡三个尺寸排阻色谱柱 (Sephacryl S-100HR 26/60、Sephacryl S-300HR 26/60和Superose 1226mmD×600mmL[全部由GE Healthcare制造])。将蛋白溶液置于50mL Superloop (GE Healthcare) 中,然后向每个柱上泵入5mL WGFE溶液。通过以3.5mL/min的流速将50mM Na₂HPO₄ (pH 7.0)泵过所述柱而分离所述WGFE溶液。在280nm(蓝线)监测洗脱液并收集10mL级分(灰线表示每种级分的开始),如图5-7所示。

[0213] 合并相似蛋白的样品并通过BCA测定法 (Pierce, Rockford, IL) 估算蛋白浓度。将

蛋白浓度不足 (<1mg/mL) 的样品在5kDa Vivaspin 20离心机驱动的超滤装置 (GE Healthcare) 中浓缩直至所述蛋白浓度大于1mg/mL。将每个样品 (100 μ L) 与100 μ L Tris-tricine样品缓冲液 (NuSep) 混合。从每个样品中取蛋白 (0.02mg) 施加于Tris-tricine PAGE凝胶 (16%丙烯酰胺, NuSep), 以150V分离90分钟并用Coomassie Blue (NuSep) 染色。现有技术已通过质谱表明在未分级分离的WGFE中存在的14kDa峰为血管生成素 (PCT/AU2007/001719“制备血管生成素的方法”, 图2)。在S-100HR合并液D (图8)、S-300HR合并液C和Superose 12合并液B (图9) 中发现了与血管生成素大小相同的峰。

[0214] 样品还通过阳离子交换HPLC分析。将样品 (100 μ L) 施加于已用缓冲液A (50mM NaH₂PO₄ · H₂O和5% [v/v] 乙腈 [pH7.0]) 平衡的Mono S 5/50GL柱 (GE Healthcare)。然后用逐渐增加量的缓冲液B (50mM NaH₂PO₄ · H₂O和2M NaCl [pH 7.0]) 洗脱样品 (表1)。在220nm、280nm和450nm监测洗脱液。当通过此方法分析时, 之前已通过HPLC和随后的质谱证明血管生成素的保留时间为5.8 \pm 0.1分钟; 因此将保留时间相同的峰推定为血管生成素并对其定量 (表2)。

[0215] 表1. 阳离子交换HPLC的HPLC泵方案

时间 (分钟)	流速 (mL/分钟)	缓冲液 B (%)
0.0	1	0
2.0	1	0
6.5	1	50
8.5	1	50
9.5	1	0
15.0	1	0

[0218] 表2. 通过阳离子交换HPLC确定的以蛋白百分比表示的血管生成素纯度

合并液	血管生成素纯度 (蛋白%)
未分级分离的 WGFE	
WGFE	5
Sephacryl S-100HR	
A	0
B	1
C	6
D	55
E	0
Sephacryl S-300HR	
A	1
B	0
C	40
Superose 12	
A	1
B	27

[0220] 已证明尺寸排阻色谱法是一种从乳清生长因子提取物中分离血管生成素的合适方法。证明了Sephacryl S-100HR、Sephacryl S-300HR和Superose 12是合适的,说明大多数SEC树脂是合适的。含有高于55%的血管生成素的血管生成素富集级分可通过SEC获得。此纯度可通过额外的纯化步骤进一步提高。

[0221] 实施例4:根据第五方面(溶液内等电点聚焦)从脱脂乳获得血管生成素富集产品的方法

[0222] 现有技术已经广泛描述了溶液内等电点聚焦方法,但不是在血管生成素纯化的背景下(参见例如Michel P et al.,2003,Electrophoresis;24,3-11)。

[0223] 本发明申请人已经证明,现在血管生成素可使用本文公开的方法从乳样品中提取。

[0224] 在此实施例中采用的溶液内等电点聚焦(ISIEF)方法是使用IsoelectrIQ²(Proteome Systems Limited,Australia)进行的。分级分离在天然(水性)或变性条件下(包括变性剂例如脲)进行。

[0225] 还加入Prolyte (BD Diagnostics,Germany)或其他电解质(酸或碱)以形成pH梯度。分离梯度的一个实例如下:

[0226] 样品增溶溶液(sample solubilisation solution,SSS):7M脲、2M硫脲和1%3-羟丙基二甲基氨基丙磺酸3-(4-庚基)苯酯(C7BzO)。

[0227] 将乳蛋白稀释于10倍体积的SSS中并加入5mM三丁膦和5mM乙二胺四乙酸,然后立即进行ISIEF分离。使用pH 3.0、5.0、6.5、8.0和11.0的膜(Proteome Systems Limited, Australia)建立如下样品分离箱:pH 3.0-5.0、pH 5.0-6.5、pH 6.5-8.0和pH 8.0-11。将电极溶液(5mL,由供应商提供)用于阳极和阴极端,并向pH 5.0-6.5箱中加入5mL的重悬浮于SSS的乳蛋白。向其他箱中加入SSS(5mL)。电泳在14℃下以100V的恒压进行2小时,在6小时时间逐渐升高至1500V,然后以1500V的恒压进行8小时。收集每箱中的溶液。从分离箱(pH 8.0-11)的阴极端收集血管生成素富集的级分。

[0228] 通过二维SDS-PAGE并根据厂商说明以SYPRO Ruby染色来确认血管生成素的存在。例如,用另外的SSS将相当于40μg的每种蛋白级分的40μg的等份试样稀释至128μl。向每个样品中加入两性电解质溶液(0.6μl, pH 3-11)和DeStreak溶液(GE Healthcare)。将稀释的样品移液至7cm、pH 3-11的NL IPG条(GE Healthcare)下并使该IPG条重水化过夜。等电点聚焦使用以下方案:500V 1小时、1000V 1小时,在1小时时间逐渐升高至5000V,然后5000V 2小时。从等电点聚焦装置中取出IPG条,并在每10mL EB含有100mg二硫苏糖醇的平衡缓冲液(EB;6M脲、2%十二烷基硫酸钠、20%甘油、50mM Tris HCL (pH 8.8)、0.01%溴酚蓝)中孵育15分钟,然后在每10mL EB含有250mg碘代乙酰胺(iodoacetamide)的EB中再孵育15分钟。将还原的并烷基化的IPG条上样到SDS PAGE凝胶(可来自供应商,例如Invitrogen Novex的预制Tris HCl凝胶)上,并通过覆盖以含有1.0%琼脂糖的热电泳缓冲液(Tris碱3.03g/L、甘氨酸14.4g/L和SDS 1.0g/L),然后使其冷却而将所述IPG条封盖在所述凝胶上。将所述凝胶置于SDS PAGE装置中并将电泳缓冲液置于该装置的底仓和顶仓中。电泳以200V进行1小时。电泳后,使用固定/脱色溶液(10%甲醇和7%乙酸)将蛋白固定在凝胶内,然后用Sypro Ruby (Invitrogen)染色至少1小时。将凝胶在固定/脱色溶液中脱色至少1小时,然后在凝胶扫描系统上成像。通过对图像进行可视分析来确定级分的纯度,藉此评估级分中每点的强度和体积。

[0229] 图10示出了pH 8-11的含有低分子量(约15kDa)碱性蛋白的级分(pI约10.0)。此蛋白代表此级分中大约80%的总蛋白,现有技术已将此蛋白确定为血管生成素(PCT/AU2007/001719“制备血管生成素的方法”,图2)。图10示出了对pH 8-11级分中的碱性蛋白与该乳级分中的其他蛋白的解析。

[0230] 实施例5:热对获得血管生成素富集产品的方法的作用

[0231] 含有生长因子的乳清级分以与实施例2a相同的方法制备。

[0232] 将含有生长因子的乳清级分(2.5g)加入95g水中并以250rpm摇动30分钟以得到2.5%w/w的溶液。将所述溶液(10g)置于15mL的玻璃试管中并置于加热至80℃的水浴中。用温度探针监测该试管内液体的温度。所述溶液迅速达到70℃并在所述水浴中再保留1分钟(最高温度75℃)。从所述热水浴中取出该试管并在装有自来水的烧杯中冷却。

[0233] 将所述溶液转移到10mL离心管中,以3000×g离心7分钟并过滤(0.45μm)上清液。通过SDS PAGE分析滤出液。从每个样品中取蛋白(0.001mg WGFE,加热时滤出液少于0.025mg沉淀)施加于Tris-tricine PAGE凝胶(16%丙烯酰胺,NuSep),以150V分离90分钟并用Coomassie Blue (NuSep)染色。现有技术已通过质谱表明在未分级分离的WGFE中存在的14kDa峰为血管生成素(PCT/AU2007/001719“制备血管生成素的方法”,图2)。发现在加热WGFE的滤出液中存在与血管生成素大小相同的条带。加热富集了血管生成素。在WGFE(泳道

10) 中, 乳酸过氧化物酶是主要蛋白, 而加热WGFE产生其中血管生成素与乳酸过氧化物酶以相同比例存在的样品 (泳道2和3), 见图4。本领域技术人员会理解, 先进行加热步骤再进行第一到第五方面特别是第三到第五方面的任何方法应该会增加所述富集产品中血管生成素的纯度。

[0234] 本领域技术人员会明了, 在每个实施例中描述的血管生成素制备方法可扩大用于商业目的, 并可在进行第一到第五方面的任一方面的方法之前或之后结合以其他纯化步骤以获得医药级纯度的血管生成素。

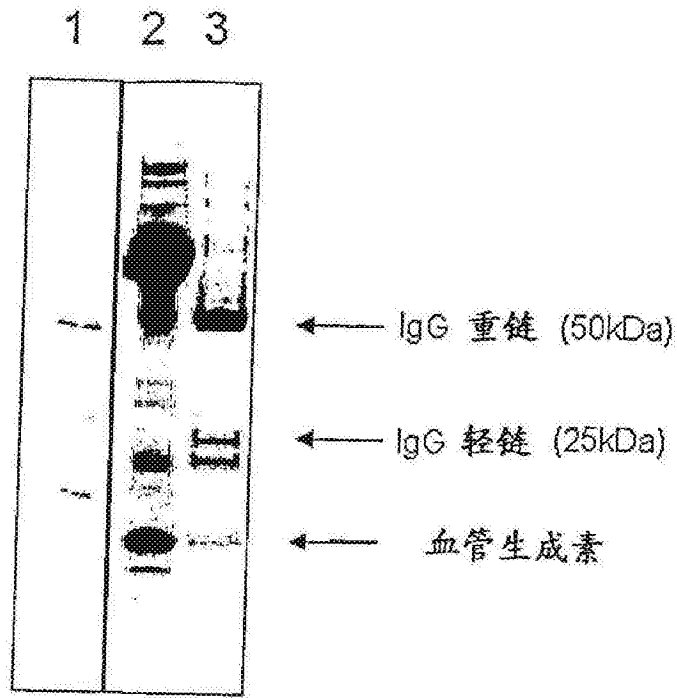


图1

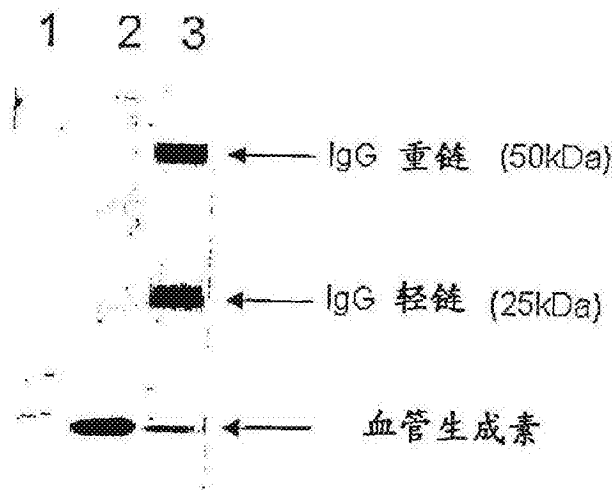


图2

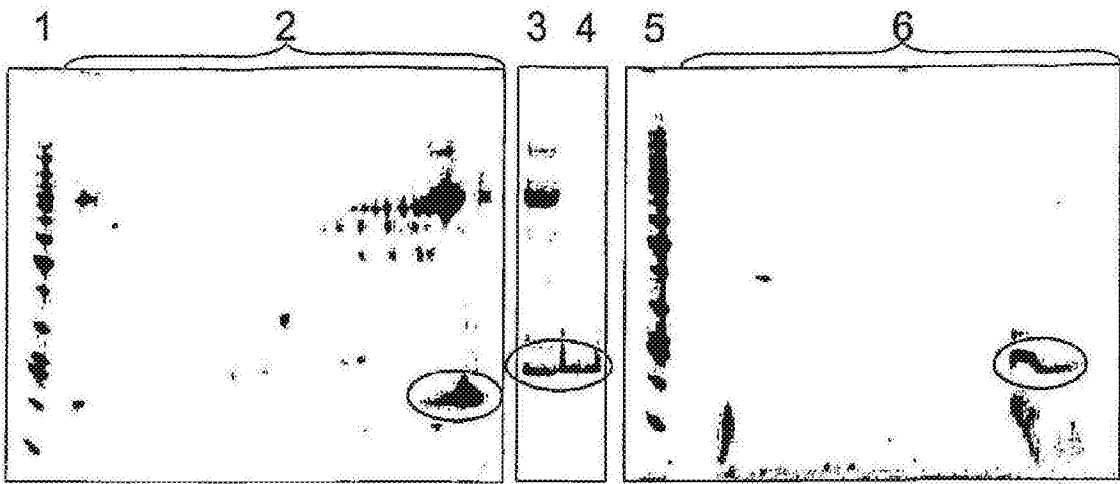


图3

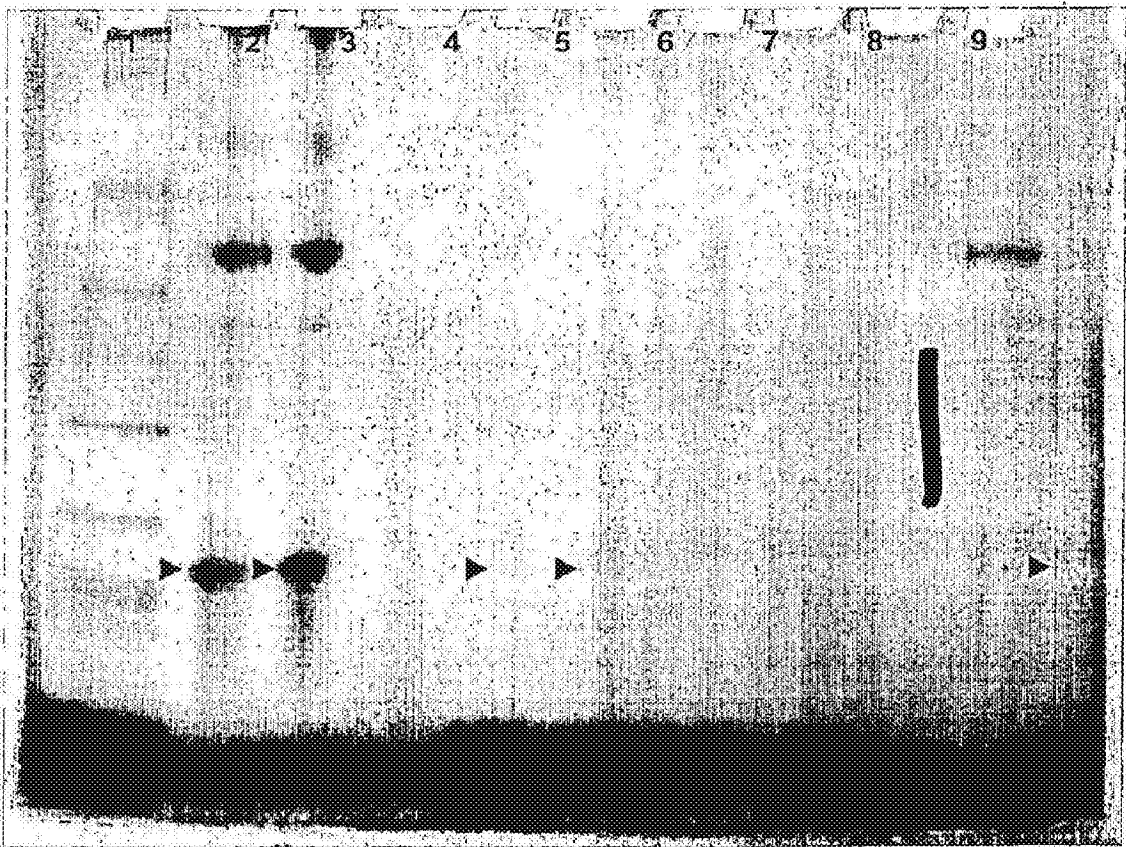
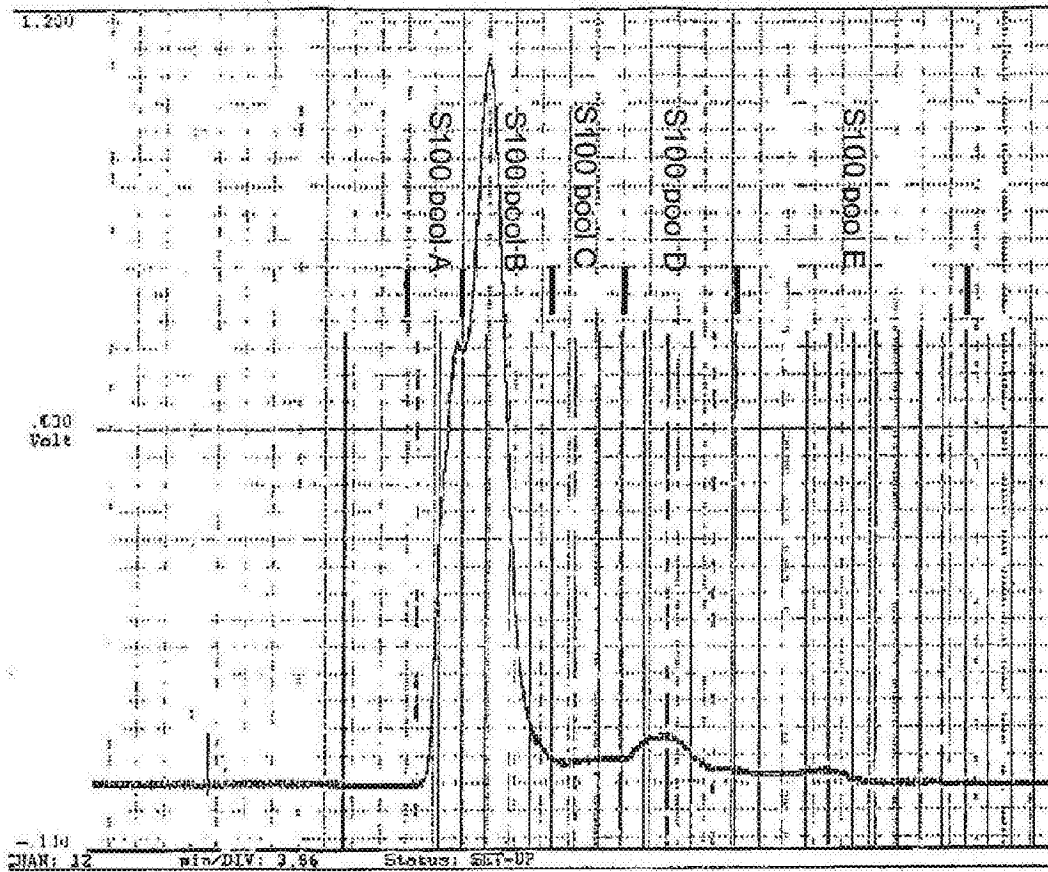


图4



pool: 合并液

图5

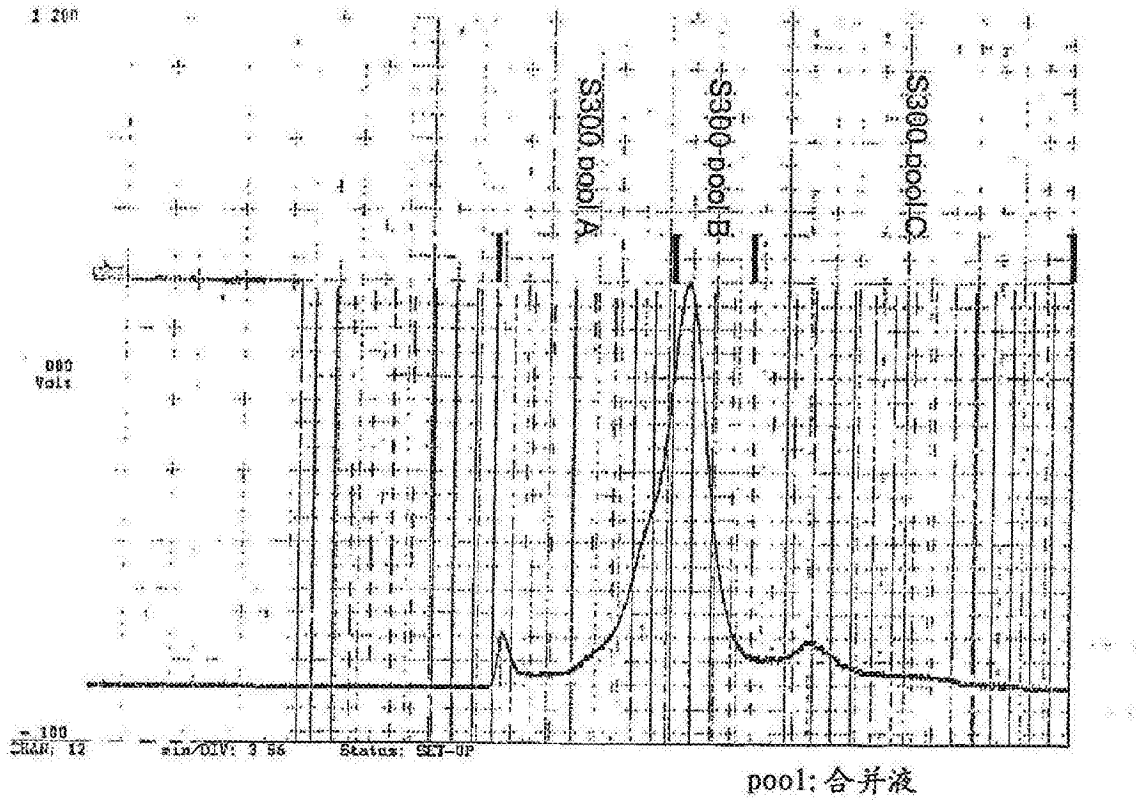
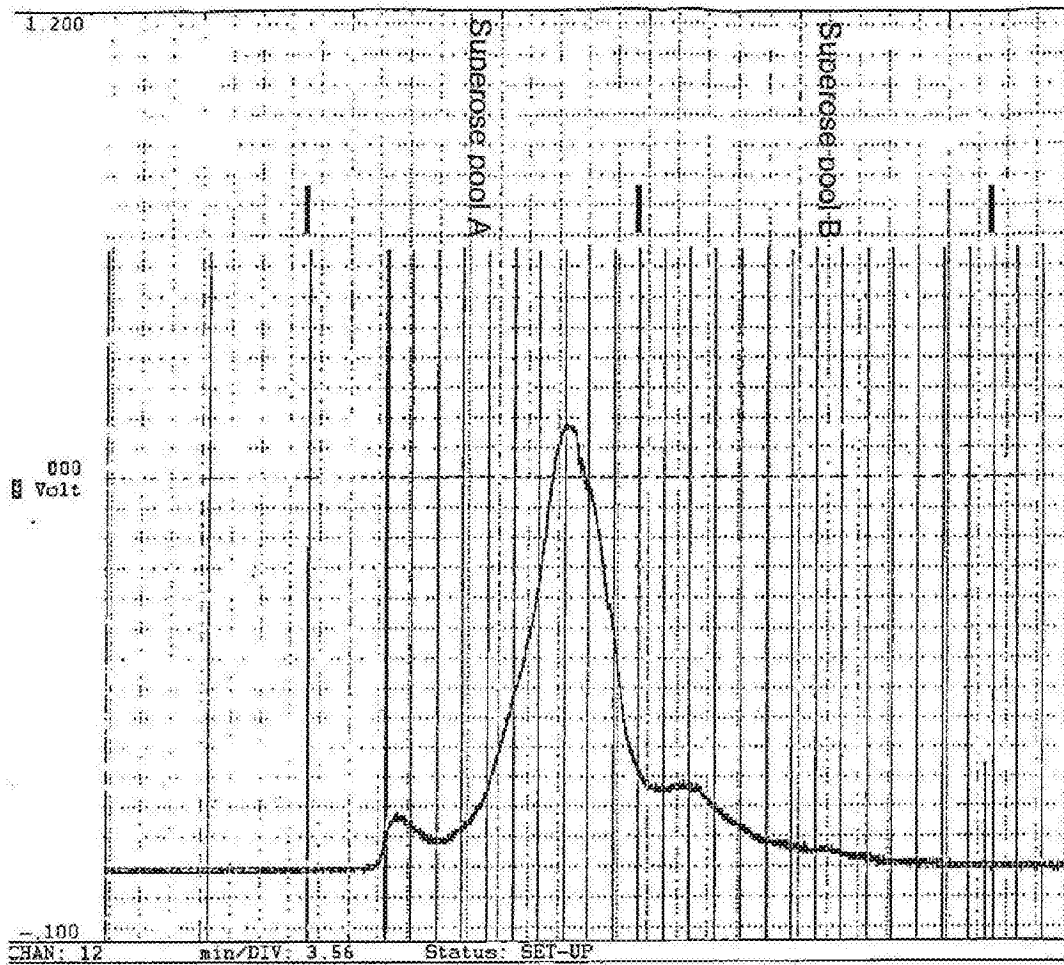


图6



pool: 合并液

图7

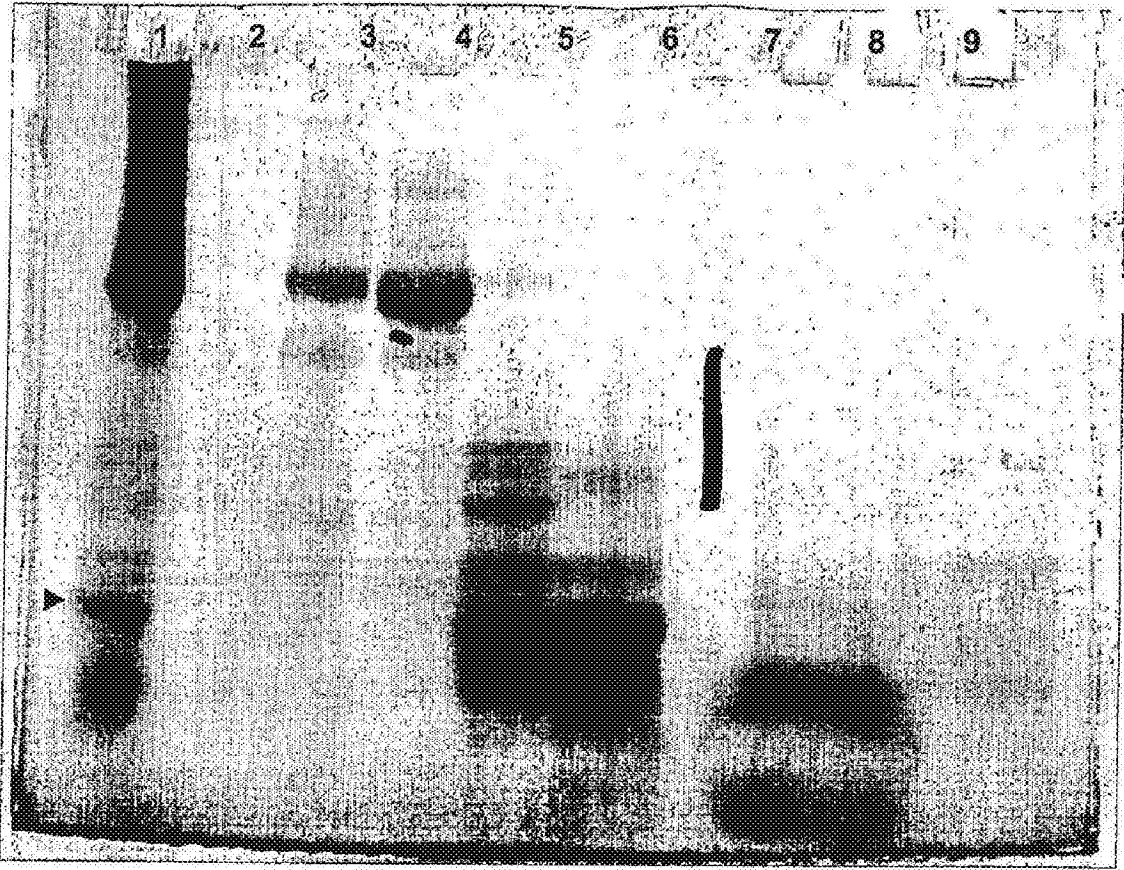


图8

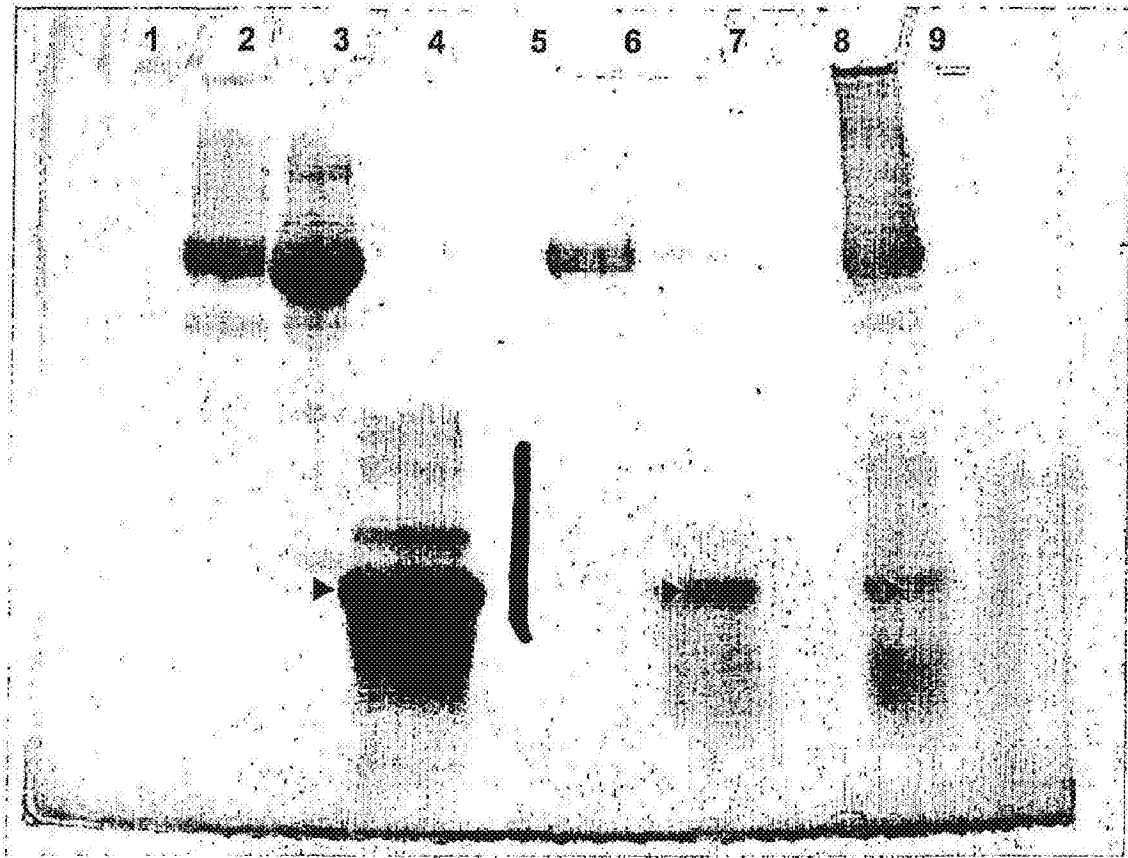


图9

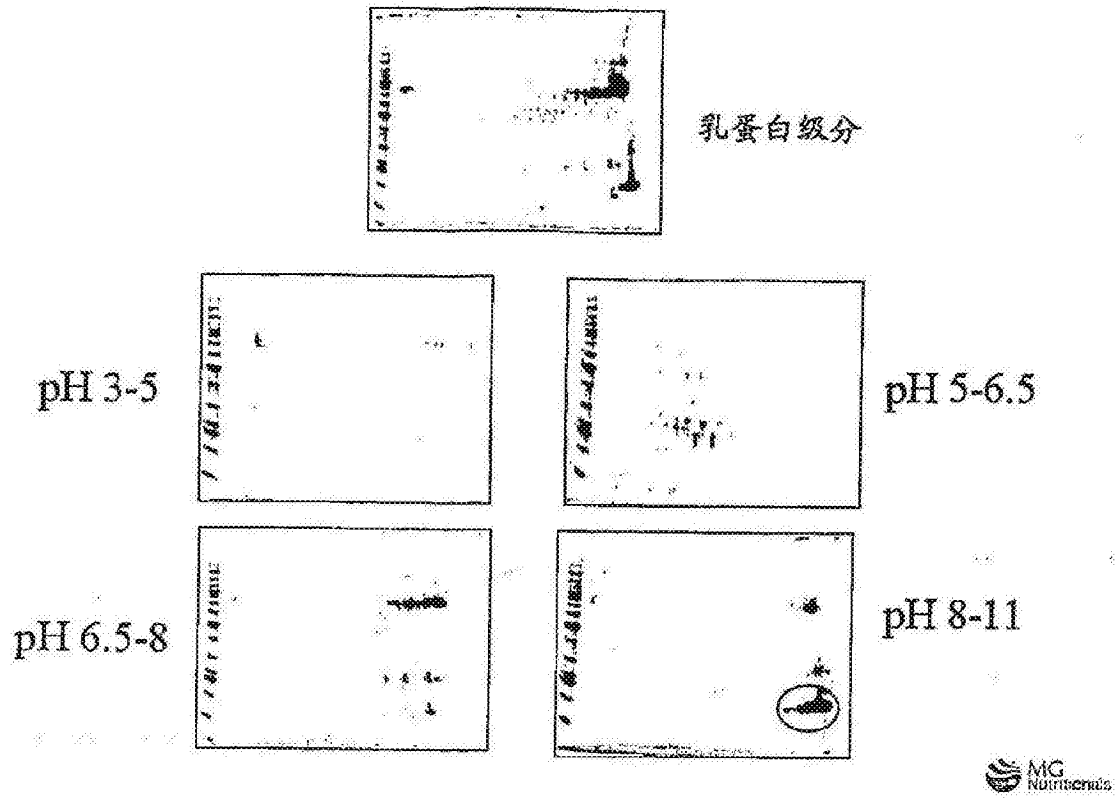


图10