



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101478986 B

(45) 授权公告日 2016.05.04

(21) 申请号 200780023913.3

(22) 申请日 2007.06.28

(30) 优先权数据

06116322.6 2006.06.29 EP

60/842,485 2006.09.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008.12.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2007/056454 2007.06.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/000783 EN 2008.01.03

(73) 专利权人 生物技术工具公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 T·莱贡 S·皮罗顿 G·普拉希尔

G·凯尔戈阿

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

A61K 39/35(2006.01)

A61K 39/36(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006/005535 A1, 2006.01.19,

WO 2006/005535 A1, 2006.01.19,

WO 2004/112833 A1, 2004.12.29,

WO 2004/112833 A1, 2004.12.29,

US 6350590 B1, 2002.02.26,

审查员 李艳丽

权利要求书2页 说明书7页 附图4页

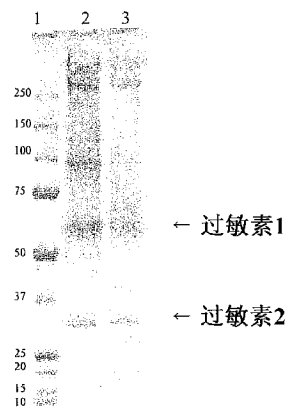
(54) 发明名称

水解过敏素的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及天然过敏素的纯化的提取液的制备方法,该制备方法包含如下步骤 a) 提取包含致敏性蛋白质的过敏素天然源以形成提取液, b) 纯化所述提取液以去除非蛋白质成分以形成纯化的提取液, c) 将所述纯化的提取液变性以形成纯化的变性提取液,所述纯化的变性提取液包含蛋白质,其中一起形成所有蛋白质的至少 60% (w/w) 的最丰富 (w/w) 的蛋白质为至少两种蛋白质,且所有蛋白质占纯化的变性提取液干燥重量的至少 60% (w/w),以及天然过敏素的纯化的提取液的制备方法,该制备方法包含如下步骤 a) 水解变性过敏素以形成过敏素水解产物, b) 纯化所述过敏素水解产物以去除分子量超过 10,000Da 和低于 1,000Da 的肽,从而获得纯化的水解产物,其中 70%,更优选 80%的肽介于 10,000Da 和 1,000Da 之间。

CN 101478986 B



1. 一种纯化的过敏素水解产物的制备方法,该制备方法包含如下步骤:  
提取包含致敏性蛋白质的过敏素天然源以形成提取液,  
纯化所述提取液以去除非蛋白质成分以形成纯化的提取液,  
将所述纯化的提取液变性以形成纯化的变性提取液,其中使用离液剂和还原剂的混合物进行变性,  
所述纯化的变性提取液包含蛋白质,其中一起形成所有蛋白质的 60%或更多 (w/w) 的最丰富 (w/w) 的蛋白质为至少两种蛋白质,且所有蛋白质占纯化的变性提取液干燥重量的至少 60% (w/w),  
所述天然过敏素选自花粉过敏素和螨类过敏素,  
水解所述纯化的变性提取液以形成过敏素水解产物,  
纯化所述过敏素水解产物以去除分子量超过 10,000Da 和低于 1,000Da 的肽,从而获得纯化的水解产物,其中 80%的肽介于 10,000Da 和 1,000Da 之间。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在不含盐或包含选自碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、醋酸盐、TRIS 或 HEPES 的盐的溶液中进行所述提取。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中用提取介质进行所述提取,其中提取介质的重量为过敏素天然源重量的至少 20 倍。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中用提取介质进行所述提取,其中提取介质的重量为过敏素天然源重量的 100 倍。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述纯化包含一个或多个离子交换色谱法步骤、凝胶过滤或体积排阻色谱法步骤、沉淀步骤、疏水相互作用色谱法步骤、假亲合或亲合色谱法步骤或渗滤步骤。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中使用包含表面活性剂和 / 或变性剂的溶液进行至少一个纯化步骤。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中离液剂选自尿素、盐酸胍、及其混合物,以及其中还原剂选自二硫苏糖醇、硫代甘油、 $\beta$ -巯基乙醇及它们的混合物。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中尿素的浓度高于 4M 和 / 或盐酸胍的浓度超过 3M。
9. 根据权利要求 7 所述的方法,其中尿素的浓度高于 5M 和 / 或盐酸胍的浓度超过 4M。
10. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中使用酶进行水解。
11. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法,其中使用胃蛋白酶、胰蛋白酶或糜蛋白酶进行水解。
12. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法,其中在离液剂的存在下进行水解。
13. 根据权利要求 1 或 12 所述的方法,其中在尿素和盐酸胍的存在下进行水解。
14. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法,其中通过体积排阻色谱法和 / 或通过超滤进行肽的去除。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中在离液剂存在下进行体积排阻色谱法步骤。
16. 根据权利要求 14 所述的方法,其中在尿素、盐酸胍、乙二醇、异丙醇或它们的混合物存在下进行体积排阻色谱法步骤。
17. 可通过权利要求 1 或 10 所述的方法获得的纯化的过敏素水解产物。
18. 权利要求 17 的过敏素水解产物用于制备诱导耐受性的药物组合物的用途。

19. 权利要求 17 的过敏素水解产物用于食物组合物的用途。
20. 根据权利要求 18 所述的用途,其中耐受性的诱导用于治疗或防止过敏性反应。
21. 包含权利要求 17 的过敏素水解产物的药物组合物。
22. 根据权利要求 21 所述的药物组合物,其中所述过敏素选自花粉过敏素。
23. 根据权利要求 21 所述的药物组合物,其中所述过敏素选自螨类过敏素。
24. 根据权利要求 21 所述的药物组合物,用于口腔施用、用于舌下药物传递、用于肠道药物传递。

## 水解过敏素的制备方法

[0001] 本发明涉及天然过敏素的提取液的制备方法、来自这些提取液的肽以及可由新型方法获得的过敏素提取液。

[0002] 普通的过敏素为花粉、尘螨、霉菌、药物、食物和动物毛发和皮屑。

[0003] 最普通的过敏反应疾病为鼻炎，哮喘和特应性皮炎。过敏性哮喘为慢性炎性紊乱。通过使用抗阻胺药、 $\beta$ -拮抗剂 ( $\beta$ -antagonists) 和皮质类固醇实现过敏性紊乱的症状治疗。

[0004] 此外，所谓的“特效”免疫疗法基于脱敏作用。通常对患者实施特效冒犯性 (offending) 过敏素的皮下注射。治疗起始于小的过敏素剂量并增加剂量。通常治疗保持几年。此类治疗遭受纯的患者顺应性，且因为患者经受严重的过敏性反应之苦，该类治疗由于安全性原因而被质疑。

[0005] 除了包含重复的皮下注射的方法之外，还有口腔脱敏作用的方法。

[0006] 美国专利 4,822,611 公开了包含使用过敏素的口腔治疗的治疗过敏的方法。美国专利 4,822,611 描述了显示来自不同制造商的提取液的逐批差异和不同的商购“散装”致敏性提取液。未描述这些提取液的制备。

[0007] GB 1 247 614 公开了提取过敏素的方法。该方法的目的是通过包括所有可提取的过敏素成分得到更完全和有效的致敏性提取液。

[0008] 美国专利 5,770,698 公开了过敏性活性蛋白质提取液的提纯方法。图 2 的谱未显示 280<sub>nm</sub> 的峰。这意味着所述提取液含有显著含量的非蛋白质杂质。WO 99/22762 公开了类似的方法，因此，产物也包含大量非蛋白质杂质。

[0009] 在另一方面，有发展基于单表位的高特效制剂的趋势。例如，WO 00/58349 公开了分离并纯化的包含两个肽键远离酪氨酸 / 精氨酸对的亮氨酸的肽。能使用这些肽制备药物组合物以完成治疗或预防，在此情况下尤其用于狗的犬过敏反应。

[0010] 在一方面，使用方法以纯化特定识别的单个致敏性分子。在另一方面，人们试图制造尽可能完全的致敏性提取液。

[0011] 根据第一选择，过敏素制剂无相关的表位以在确定的患者内引发耐受性一直都有可能。第二选择具有逐批差异的缺点和存在能够引起免疫反应的化合物（如 DNA 分子、碳水化合物、它们的络合物的脂）的缺点。

[0012] 本发明的一个目标是克服现有技术的至少一些缺点，特别是提供来自天然过敏素的抗原，所述抗原相比于粗过敏素提取液具有显著降低的引起变应原性反应的能力，但也能够刺激 T- 细胞。

[0013] 通过提供过敏素提取液的制备方法解决了所述问题，该过敏素提取液包含大多数蛋白质（该蛋白质含有部分过敏素提取液）但具有降低的，优选非常低含量非蛋白质成分（如核酸、脂、糖等）。

[0014] 本发明制备的提取液优于现有技术的提取液，特别是本发明制备的提取液显示可再生的蛋白质组合物而不会被纯化至单表位。

[0015] 本发明的过敏素提取液的制备方法包含如下步骤：

- [0016] a) 提取包含致敏性蛋白质的过敏素天然源以形成提取液，
- [0017] b) 纯化所述提取液以去除非蛋白质成分以形成纯化的提取液，
- [0018] c) 将所述纯化的提取液变性以形成纯化的变性提取液，
- [0019] 所述纯化的变性提取液包含蛋白质，其中最丰富 (w/w) 的蛋白质 (其一起形成所有蛋白质的至少 60% (w/w)) 为至少两种蛋白质，且所有蛋白质占纯化的变性提取液干燥重量的至少 60% (w/w)。
- [0020] 该方法称为方法 I。
- [0021] 与现有技术的方法相反，本发明的方法制备主要包含蛋白质的过敏素提取液而不会将所述提取液纯化至单肽或蛋白质。
- [0022] 与现有技术的产物相反，本发明的产物具有如下优点：
- [0023] -基本上去除了除蛋白质之外的免疫物质
- [0024] -天然过敏素提取液能够刺激 T-细胞而具有降低的引起迅速过敏性反应 (嗜碱性粒细胞活化、肥大细胞脱颗粒) 的能力
- [0025] 能使用不同的天然过敏素作为起始原料。典型的天然起始原料为牛奶、毒液、蛋、杂草、草、树、灌木、花、蔬菜、谷物、菌类、水果、浆果、坚果、种子、豆类、鱼类、贝类、海产、肉类、香料、昆虫、螨类、霉菌、动物、鸽子扁虱、蠕虫、海鸡冠、动物皮屑、线虫、巴西橡胶树，以及它们的混合物。
- [0026] 在材料提取之后，纯化提取液以去除非蛋白质成分，如糖、脂、核酸等。典型的几个不同的蛋白质以纯化的提取液的蛋白馏分存在。
- [0027] 根据现有技术，一种蛋白质被纯化而其他剩余蛋白质为“杂质”。
- [0028] 相反，本发明的目的是一起纯化蛋白质。使用如 SDS-PAGE 的方法并接着通过密度测量法能轻易地测量纯化的提取液中的蛋白质的相对含量。
- [0029] 对于蛋白质总重量的 60%，需要结合至少两种最主要的蛋白质，即，没有单个蛋白质占有所有蛋白质的 60% (w/w) 或更多。更优选地，所有蛋白质的 60% 由至少 3 种主要的蛋白质形成，优选由至少 4 种主要的蛋白质且更优选由至少 5、6、7、8、9 或 10 种蛋白质形成。
- [0030] 例如，有如下蛋白质：
- [0031] 蛋白质 1 :27%
- [0032] 蛋白质 2 :13%
- [0033] 蛋白质 3 :34%
- [0034] 蛋白质 4 :19%
- [0035] 蛋白质 5 :17%
- [0036] 一起形成至少 60% (≈ 60% 或更多) 的最主要的蛋白质为蛋白质 3+1 (34+27 = 61%)。
- [0037] 此外，纯化的提取液的蛋白质总含量为纯化的提取液的至少 60 重量%，所述含量优选为纯化的提取液的至少 70 重量% 或 80 重量%，更优选为 90 重量%。
- [0038] 优选用水溶液进行提取。合适的盐为但不限制于如碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、醋酸盐、TRIS 和 HEPES。
- [0039] 也与许多其他提取方法不同，优选提取介质的量相对较大，即至少为过敏素天然源重量的 20 倍，优选为所述重量的 100 倍或更多。

[0040] 可通过如下的一种或多种进行提取液的纯化：

[0041] - 离子交换色谱法步骤（包括阴离子交换色谱法和阳离子交换色谱法），

[0042] - 体积排阻色谱法步骤（也称为凝胶过滤），

[0043] - 沉淀步骤，

[0044] - 疏水相互作用色谱法步骤，

[0045] - 假亲合和亲合色谱法和 / 或

[0046] - 渗滤

[0047] 在优选的具体实施方案中使用离子交换色谱法，其中在阳离子交换剂的情况下负载溶液的 pH 介于阳离子交换剂的酸性官能 pKa 和具有提取液中的蛋白质的最低 pKa 的蛋白质的 pKa 之间。在阴离子交换剂的情况下所述 pH 介于阴离子交换剂的碱性官能 pKa 和具有组成提取液的蛋白质的最高 pKa 的蛋白质的 pKa 之间。

[0048] 通过该方法，所有的蛋白质结合于离子交换剂上，而中性杂质以及与离子交换树脂具有相同电荷的杂质将被去除。

[0049] 在优选地具体实施方案中，用包含一种或多种表面活性剂和 / 或变性剂的溶液进行至少一个纯化步骤。所述表面活性剂可为非离子型、阴离子型、阳离子型或两性的。合适的变性剂为离液剂、还原剂和它们的混合物。合适的变性剂例如尿素、盐酸胍、乙二醇、异丙醇。尿素的合适浓度为 3M 或更高，优选 4M 或更高。胍盐的合适的浓度优选为 2M，优选为 3M 或更高。乙二醇和 / 或异丙醇的合适浓度为 5 重量%或更高，更优选为 10 重量%或更高，不超过 20 重量%。

[0050] 在一些情况中，根据本发明的方法 I 制备纯化的提取液是足够的。此类提取液可用于制备活体外 / 活体内以及试管内诊断、过敏性疾病的预防和治疗。本发明的进一步的具体实施方案为由方法 I 的提取液或者由任何其他来源制备过敏素水解产物的方法。若所述提取液来自任何其他纯化的过敏素源而非来自方法 I，需要一个变性的初步步骤以改进消化性。

[0051] 所述方法（方法 II）包含如下步骤

[0052] a) 水解变性过敏素以形成过敏素水解产物，

[0053] b) 纯化所述过敏素水解产物以去除分子量超过 10,000Da 和低于 1,000Da 的肽，从而获得纯化的水解产物，其中 70%，更优选 80%的肽介于 10,000Da 和 1,000Da 之间。

[0054] 由此获得的产物的优点是所述肽为变性蛋白质的消化结果。由于特定的大小标定，所述肽具有降低的诱导快速过敏性反应以及促炎症反应的能力。

[0055] 如需要，优选在离液剂、还原剂或它们的混合物的存在下进行变性。合适的离液剂例如尿素和盐酸胍。典型的还原剂例如二硫苏糖醇 (dithiotriethol)、 $\beta$ -巯基乙醇、硫代甘油和它们的混合物。

[0056] 通常用酶进行水解步骤。合适的酶例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶。也能在离液剂，优选尿素或盐酸胍的存在下进行该水解步骤。在水解过程中尿素和盐酸胍的浓度应低于 4M，优选低于 3M。

[0057] 在方法 II 的步骤 b) 中，分子量大于 10,000Da 或小于 1,000Da 的肽被去除。

[0058] 因此，纯化的水解产物的肽包含分子量介于 1,000 至 10,000Da 的肽。去除大或小的肽的合适方法为超滤和体积排阻色谱法。该体积排阻色谱法也可在离液剂，例如尿素、盐

酸胍、乙二醇、异丙醇和它们的混合物的存在下进行。

[0059] 本发明的进一步的具体实施方案为可由本发明的方法 I 获得的过敏素提取液。通常在该提取液中,以重量计最主要的蛋白质(其一起形成所有蛋白质的至少 60 重量%)为至少 2 种蛋白质,优选至少 3 或 4 种蛋白质或更优选至少 5、6、7、8、9 或 10 种蛋白质。通过光密度 260<sub>nm</sub>见到纯度:光密度 280<sub>nm</sub>-比率 < 1,优选 < 0.9,更优选介于 0.75 和 0.9 之间。

[0060] 进一步的具体实施方案为可由方法 II 获得的过敏素水解产物。所述过敏素水解产物能用于

[0061] - 过敏性疾病的活体内诊断:点刺试验、皮内注射、结膜、吸气和吸入试验

[0062] - 过敏性疾病的活体外和试管内诊断:试验中所用的 ELISA 试剂盒或标准样品

[0063] - 过敏性疾病的预防和治疗:用于脱敏/脱敏作用治疗以及结合/不结合佐剂的免疫应答调节。

[0064] 本发明的过敏素提取液能用于药物组合物和/或食物组合物的制备以诱导耐受性。耐受性的诱导能用于治疗 and 防止过敏性反应。

[0065] 本发明的进一步的具体实施方案为包含完整形式或水解形式的本发明的过敏素提取液的药物组合物。此外,药物组合物可包含一种或多种如下物质:三磷酸核苷、二磷酸核苷、单磷酸核苷、核酸、肽核酸、核苷或它们的类似物、免疫抑制细胞因子、诱导免疫蛋白酶体、1,25-二羟基维生素 D3 或它们的类似物的表达的化合物、脂多糖、内毒素、热休克蛋白、具有 NADPH 或 NADP- 硫氧还蛋白还原酶的硫氧还蛋白、二硫苏糖醇、如舒喘灵的肾上腺素能受体、如丁氧胺的肾上腺素能受体、调节粘连分子 ICAM-1、N-乙酰基-L-半胱氨酸、 $\gamma$ -L-谷氨酰基-L-半胱氨酸-甘氨酸(还原的 L-谷胱甘肽)、 $\alpha$ -2-巨球蛋白的表达的化合物、Foxp3 基因表达的诱导物、黄酮类、异黄酮类、紫檀碱(pterocarpanoids)、如白藜芦醇的二苯乙烯、速激肽受体拮抗剂、糜酶抑制剂、类似 CpG 或 MPL 的疫苗佐剂或类似酵母多糖、 $\beta$ -1,3-葡聚糖的致耐受性佐剂、调节 T-细胞诱导物、将粒子粘合至肠粘膜的粘膜-粘连剂(如植物凝集素、锌、锌盐、多糖、维生素和细菌溶菌产物)。

[0066] 基于组合物中的天然过敏素源,可包含选自花粉过敏素、牛乳过敏素、毒液过敏素、蛋过敏素、杂草过敏素、草过敏素、树过敏素、灌木过敏素、花过敏素、蔬菜过敏素、谷物过敏素、菌类过敏素、水果过敏素、浆果过敏素、坚果过敏素、种子过敏素、豆类过敏素、鱼类过敏素、贝类过敏素、海产过敏素、肉类过敏素、香料过敏素、昆虫过敏素、螨类过敏素、霉菌过敏素、动物过敏素、鸽子扁虱过敏素、蠕虫过敏素、海鸡冠过敏素、动物皮屑过敏素、线虫过敏素、巴西橡胶树过敏素的过敏素。

[0067] 在优选的具体实施方案中,制备药物组合物用于口腔施用、用于舌下药物传递、用于肠道药物传递。

[0068] 图 1:通过 IgG 免疫印记确定的免疫反应性。带 1:分子量标记,带 2:粗蛋白质提取液,带 3:纯化的过敏素变性提取液。由 BSA 5%和牛乳 3%封闭膜。患者血清稀释至 1/250。IgG 结合通过稀释至 1/2,500 的羊抗人 IgG HRP 检测并通过 TMB 载体揭示。过敏素 1:±61-54kDa, 过敏素 2:±36-31kDa。

[0069] 图 2:通过 IgE 免疫印记确定的免疫反应性。带 1:分子量标记,带 2:粗蛋白质提取液,带 3:纯化的蛋白质。由 BSA 5%和牛乳 3%封闭膜。患者血清稀释至 1/5。IgE 结合通过稀释至 1/10,000 的羊抗人 IgEHRP 检测并通过 TMB 载体揭示。过敏素 1:±61-54kDa,

过敏素 2 : ± 36-31kDa。

[0070] 图 3: SEC G25洗脱曲线的排阻峰。柱体积 / 样品体积的比率为 12。使用三 HCl 25mM、尿素 1.5M, pH8.0 以 9 毫升 / 分钟的流速平衡树脂。通过 280nm 的吸光度跟踪洗脱。

[0071] 图 4:通过 SDS-PAGE确定的蛋白质曲线。4-12% 双 - 三凝胶。带 1 : 分子量标记, 带 2 : 纯化的过敏素变性提取液。使用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

[0072] 图 5:通过 SDS-PAGE确定的蛋白质和肽曲线。4-12% 双 - 三凝胶。带 1 : 分子量标记, 带 2 : 纯化的过敏素变性提取液 (13 微克), 带 3 : 水解产物 (13 微克)。使用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

[0073] 图 6: G50SEC洗脱曲线。使用尿素 2M、NaCl 100mM, pH 3.0 平衡柱子。流速为 15 毫升 / 分钟。柱体积 / 样品体积的比率为 10。通过 280nm 的吸光度跟踪洗脱。

[0074] 图 7: HPLC分析的标定曲线。将 10 微升如下标准样品 (1 毫克 / 毫升) 注射至 BioSep-SEC S2000 柱 : 1. 牛血清白蛋白 (66kDa), 2.  $\beta$ -乳球蛋白 (18.5kDa), 3. 细胞色素 C (12kDa), 4. 高血糖素 (3.5kDa), 5. 1kDa 合成肽。

[0075] 图 8:体积排阻 HPLC曲线。柱 : BioSep-SEC S2000 (PHENOMENEX)。洗脱缓冲液 :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50mM-SDS 0.5% (w/v) pH6.8。流速为 1 毫升 / 分钟。在 214nm 检测。注射 10 微升样品。使用介于 10kDa 和 1kDa 界限之间的曲线下面积计算感兴趣的肽的百分率。

[0076] 图 9:花粉衍生产物的变应原性性质。用增加浓度 (0、1、10、100 和 1000 纳克 / 毫升) 的花粉粗提取液, 花粉纯化的蛋白质和花粉纯化的肽孵育来自花粉过敏志愿者的血样。通过具有在 IgE- 阳性白细胞上的门控的流式细胞术测定 gp53 蛋白质表达。结果表述为活化细胞中的 gp53 阳性细胞百分数 (2 次测量的平均 ± 偏差)。

[0077] 图 10:通过花粉蛋白质和花粉肽进行的人类 PBMC增殖性的刺激。在增加浓度 (10 30 和 90 微克 / 毫升) 的花粉蛋白质或花粉肽存在下在 37°C 孵育由花粉过敏志愿者纯化的人类 PBMC 5 天。将 [ $^3\text{H}$ ]-胸腺嘧啶核苷加入细胞培养基 16 小时, 并使用液体闪烁原理利用  $\beta$  计数器测定所述 [ $^3\text{H}$ ]-胸腺嘧啶核苷的掺入。结果表述为 5 次测量的平均。本发明的方法进一步通过如下非限制性的实施例示例。

[0078] 实施例

[0079] 实施例 1:提取

[0080] 将 1% (w/v) 花粉 (来自 ALLERGON 的 *Lolium perenne*) 加入碳酸氢钠 (12.5mM) 并在搅拌下孵育 2 小时。然后通过加入 2% (w/v) 的硅藻土 (ACROS) 并通过 0.2 微米的过滤器使所述溶液澄清并过滤。该样品构成粗提取液。

[0081] 使用花粉过敏患者的血清通过免疫印迹分析提取液中过敏素的存在。用抗人 IgG 或 IgE 抗体使 IgG 和 IgE 表位显影。

[0082] 如图 1 和 2 所示, 在提取液中有两种主要的过敏素。

[0083] 将所述粗提取液酸化至 pH 3.0 并加入 Tween 20 (0.1%, v/v)。该样品构成酸化的提取液。

[0084] 实施例 2:过敏素蛋白质的纯化

[0085] 所述过敏素提取液通过如下进行纯化 :

[0086] - 阳离子交换色谱法

[0087] 用 28× 床体积 (Bv) 的碳酸氢钠 12.5mM、柠檬酸盐 30mM, pH 3.0、Tween 20 0.1%

(v/v) 平衡微孔离子交换膜 (sartobind) S 膜 (SARTORIUS)。将所述酸化的提取液加载至所述平衡膜。最初用 35×Bv 的碳酸氢钠 12.5mM、柠檬酸盐 30mM, pH 3.0、Tween 20 0.1% (v/v) 冲洗柱子, 然后用 42×Bv 的碳酸氢钠 12.5mM、柠檬酸盐 30mM, pH3.0 冲洗柱子。用碳酸盐 0.1M、氯化钠 0.5M, pH 9.15 洗脱蛋白质。通过 280nm 的 OD 跟踪蛋白质的存在。集中感兴趣的馏分。

[0088] - 硫酸铵沉淀

[0089] 该步骤在 0-4℃ 下进行。

[0090] 将达到 90% 饱和的一定数量的硫酸铵在搅拌下加入产物。在盐全部溶解之后停止搅拌。所述悬浮液孵育过夜并在 15 分钟期间以 10,000g 离心 2 次。每次仔细丢弃上清液。

[0091] - 变性

[0092] 将微粒以 9 毫克 / 毫升再悬浮于尿素 6M、DTT 10mM、三 HCl 0.1M, pH 8.0, 并在 37℃ 下孵育 1 小时。

[0093] - 在 G25 树脂 (来自 AMERSHAM 的细 Sephadex) 上的体积排阻色谱法

[0094] 将所述变性样品加载至柱子并用三 HCl 25mM、尿素 1.5M, pH 8.0 洗脱蛋白质。

[0095] 通过在 280nm 的 OD 测量跟踪蛋白质的存在。集中感兴趣的馏分以构成纯化的变性过敏素提取液。

[0096] 进一步分析所述纯化的过敏素提取液。测定蛋白质含量 (BCA 测定) 和干燥重量以评估蛋白质纯度。通过去除碳水化合物 (苔黑酚试验) 并也通过  $OD_{260}/OD_{280}$  的降低跟踪纯化效率。

[0097] 表 1: 去除非蛋白质组分以形成纯化的提取液

[0098]

	蛋白质/干燥重量 比率	$OD_{260}/OD_{280}$ 比率	碳水化合物/蛋白质 比率
粗提取液	16%	1.3	400%
纯化的提取液	85%	0.75	17%

[0099] 如表 1 所示, 所述纯化方法允许

[0100] - 提取液中蛋白质百分率由 ~ 15% 增加至 80%

[0101] -  $OD_{260}/OD_{280}$  比率趋于 0.5 (其表示纯蛋白质)

[0102] - 碳水化合物的显著去除 (剩余含量代表蛋白质的碳水化合物部分)。

[0103] 图 4 表示对于纯化的变性过敏素提取液得到的典型的 SDS-PAGE 曲线。由图可见, 6 种蛋白质占纯化的提取液中的蛋白质总重量的至少 60%。

[0104] 实施例 3: 变性过敏素提取液的水解

[0105] 使用如下规程水解所述提取液:

[0106] 将所述纯化的过敏素提取液酸化至 pH 2.0。以 2.5 毫克 / 毫升的花粉蛋白质和 1Eu. Ph. U 的胃蛋白酶 (MERCK) (对于 337 毫克蛋白质) 在 37℃ 和 2 小时期间进行消化。

[0107] 图 5 显示了纯化的提取液 (带 2) 和水解的提取液 (带 3) 之间的比较。由图可见, 在用胃蛋白酶孵育之后, 对应于变性未消化蛋白质的高分子量蛋白质消失。

[0108] 实施例 4:纯化

[0109] 为了去除  $MW \geq 10,000\text{Da}$  和  $MW \leq 1,000\text{Da}$  的肽,通过如下方式纯化所述水解产物

[0110] - 在 G50 树脂(来自 AMERSHAM 的细 Sephadex)上的体积排阻色谱法

[0111] 将 16.5% (v/v) 的异丙醇和 0.1M NaCl 加入所述水解产物。迅速将该样品加载至 G50 柱。洗脱所述肽并集中含有肽 ( $MW \leq 10\text{kDa}$ ) 的馏分,如图 6 所示。

[0112] - 在 1kDa 膜上的渗滤(来自 PALL 的超滤卡 Omega PES)

[0113] 将所述肽浓缩 10 $\times$ ,用 10 体积的三 HCl 50mM pH 7.4 渗滤,并最终浓缩 2.5 $\times$ 。该样品构成纯化的过敏素水解产物。

[0114] 通过体积排阻 HPLC 控制纯化的效率。用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50mM-SDS0.5% (w/v) pH 6.8 以 1 毫升/分钟的流速平衡 BioSep-SEC S2000 柱 (PHENOMENEX)。在 214nm 处检测肽。

[0115] 如图 7 所示例由标定曲线计算 10kDa 和 1kDa 界限。

[0116] 如图 8 所示,分子量介于 1,000Da 和 10,000Da 之间的肽占纯化的水解产物中所有肽的约 75%。

[0117] 实施例 5:变应原性的降低

[0118] 通过测量其诱导嗜碱性细胞脱粒的能力评定花粉粗提取液(根据实施例 1)、纯化的花粉蛋白质(根据实施例 2)和纯化的花粉肽(根据实施例 4)的变应原性性质。

[0119] 在试管内对用增加浓度的花粉粗提取液、纯化的蛋白质和纯化的肽孵育的来自花粉过敏志愿者的新鲜人类血样进行试验。通过测量、通过流式细胞法、在活化细胞(即 IgE 阳性细胞)的细胞膜上的 gp53 蛋白质标记的表达评定嗜碱性细胞脱粒。该蛋白质通常在剩余细胞内的颗粒的膜中存在,且一旦细胞活化会出现在细胞表面(由于颗粒的膜与细胞质膜的融合)。因此通过标记的特定抗-gp53 抗体,该蛋白质变得可检测。如图 9 所示,相比于纯化的蛋白质,纯化的肽为约 30 $\times$  较不致敏,且相比于花粉粗提取液,纯化的肽为 100 $\times$  较不致敏。

[0120] 实施例 6:花粉蛋白质和花粉肽的致免疫性

[0121] 通过测量其激发人类外周血单核细胞(PBMC)的增殖性研究过敏素蛋白质和肽的致免疫性。

[0122] 将通过密度梯度离心纯化的 PBMC(其来自“花粉-致敏性”志愿者的血样)在增加浓度的花粉蛋白质和花粉肽存在下在 96-孔板中培养 5 天。在第 5 天,将 [ $^3\text{H}$ ]-胸腺嘧啶核苷加入细胞培养基并进一步在 37 $^\circ\text{C}$  下孵育所述板 16 小时。使用液体闪烁原理利用  $\beta$  计数器测定 [ $^3\text{H}$ ]-胸腺嘧啶核苷的掺入。

[0123] 花粉蛋白质(根据实施例 2)和花粉肽(根据实施例 4)以剂量浓度依赖性的方式激发人类 PBMC 的增殖。由过敏素肽诱导的增殖略微低于在应答蛋白质中所观察到的增殖。这些结果显示肽的制备方法保持了大多数在 T 细胞活化中牵涉的过敏素的表位。

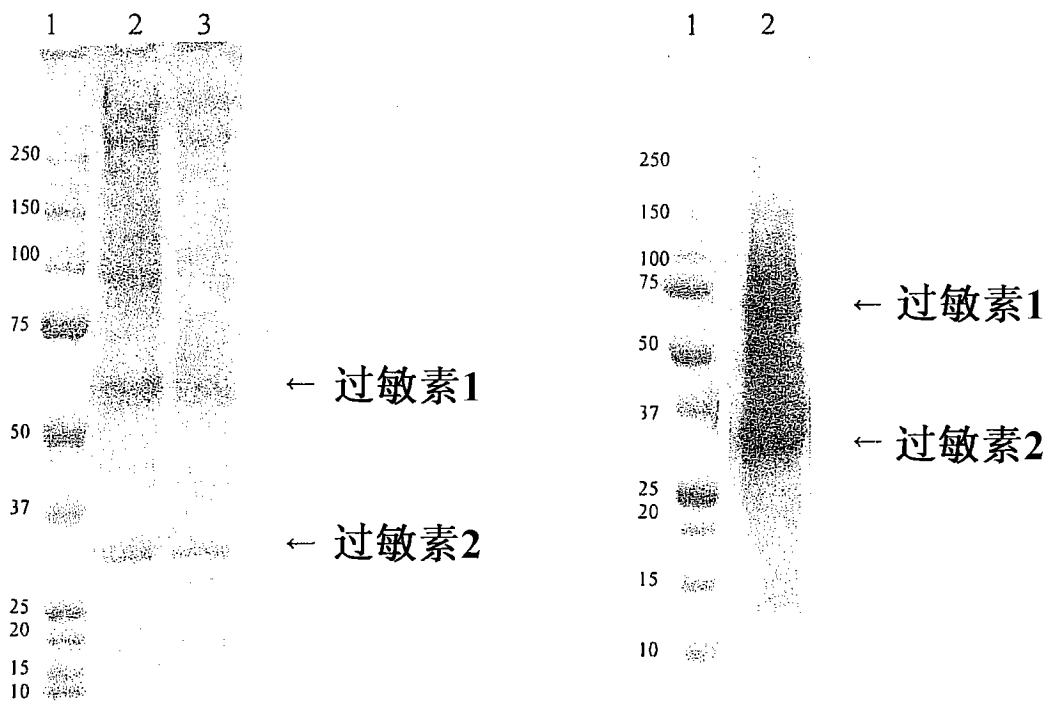


图 1

图 2

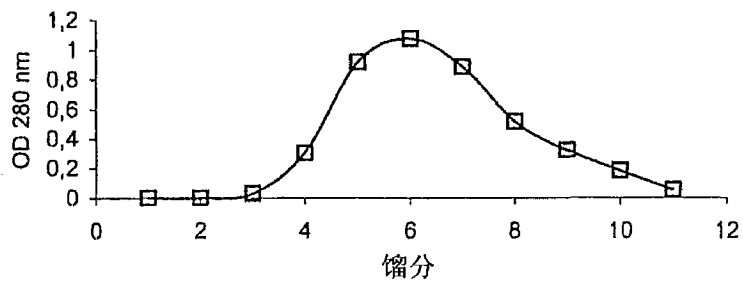


图 3

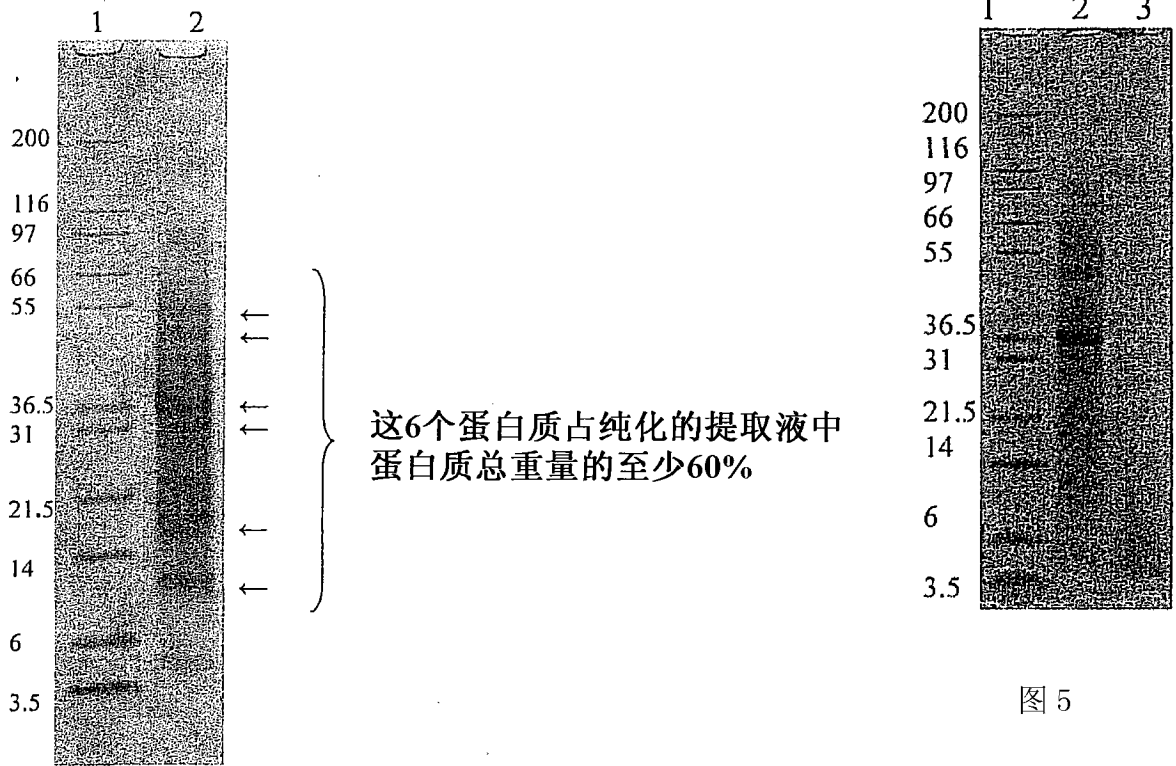


图 4

图 5

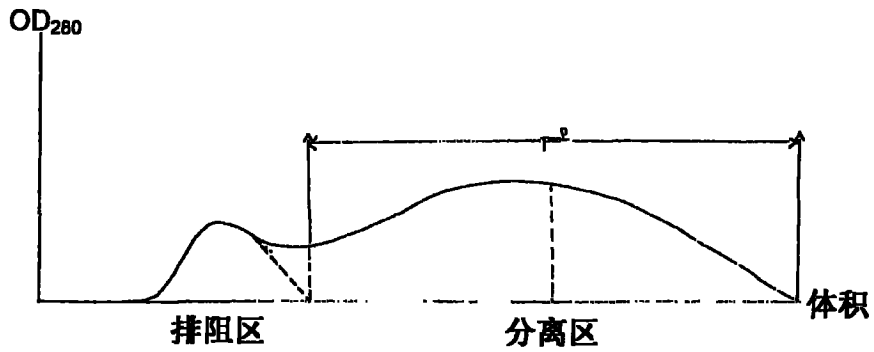


图 6

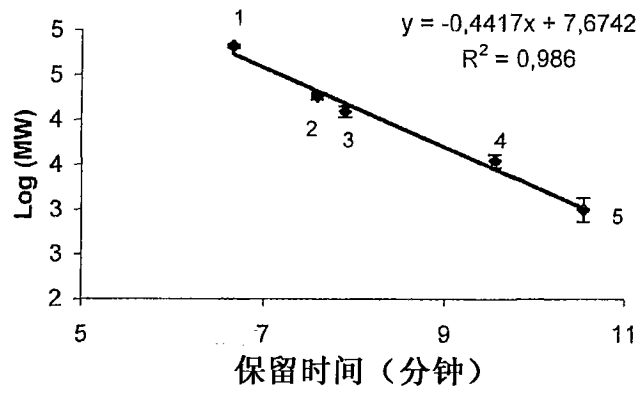


图 7

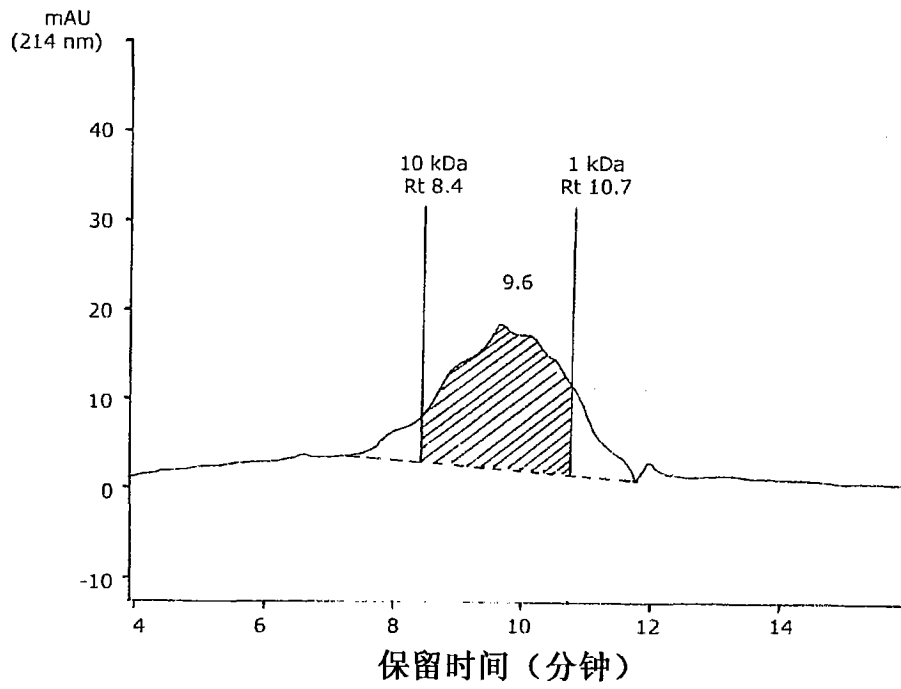


图 8

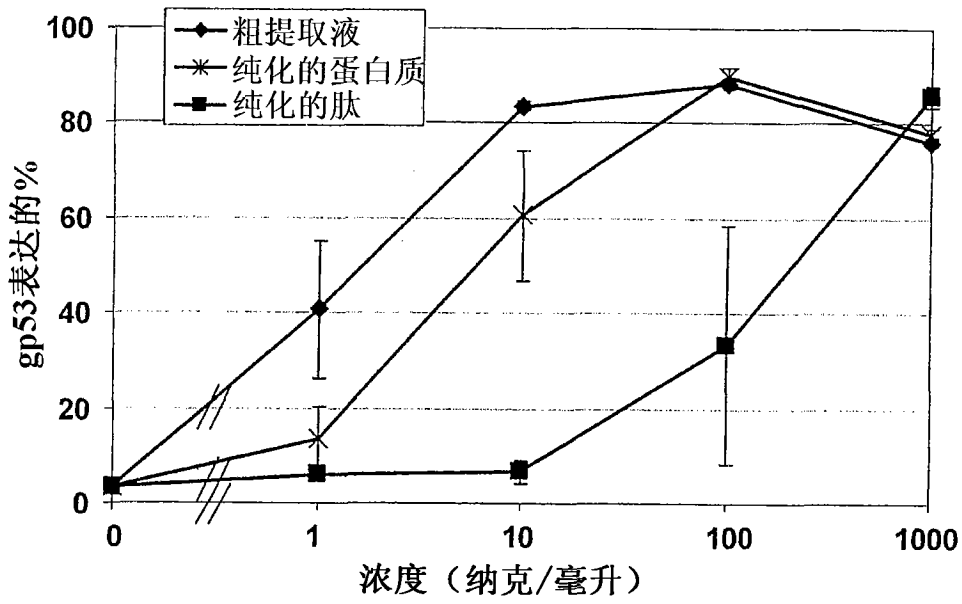


图 9

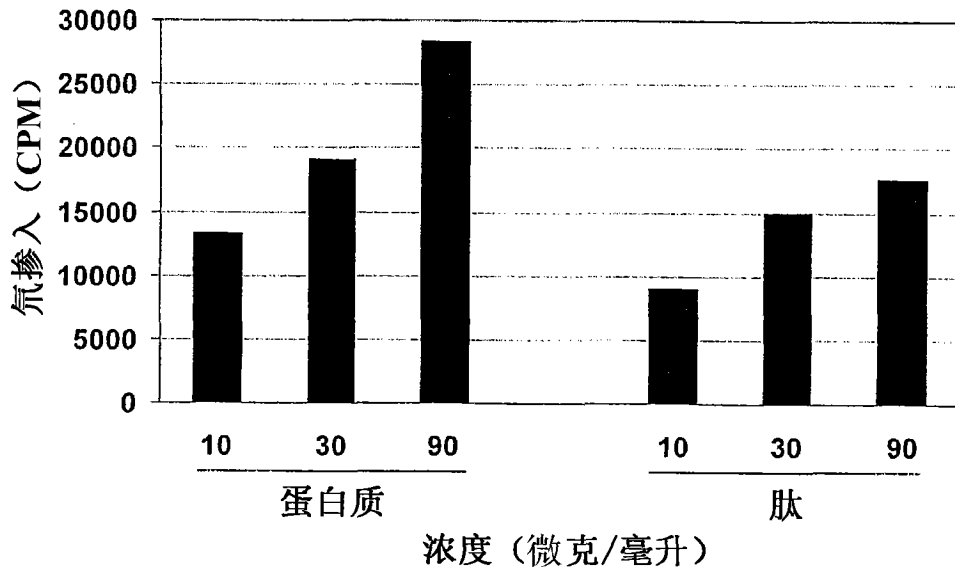


图 10