



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90103907.1

[51] Int.Cl⁵

C12N 9/50

[43] 公开日 1990年11月28日

[22] 申请日 90.4.27

[30] 优先权

[32] 89.4.28 [33] GB [31] 8909836.2

[71] 申请人 布茨公司

地址 英国英格兰

[72] 发明人 阿伦·约翰·巴列特

戴维·约翰·巴特尔

丹尼尔·胡伯特·里奇

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨九昌

说明书页数: 71

附图页数:

[54] 发明名称 治疗剂

[57] 摘要

本发明涉及制备一种用于治疗损伤, 突出或其它异常的哺乳动物椎间盘中所用的改良药物组合物制剂的木瓜凝乳蛋白酶的方法。

该方法包括一个酸沉淀步骤, 并且最好有一个使用直接基质的活性位点的亲和色谱方法。

△
22
△

1、一种纯化木瓜凝乳蛋白酶的方法，包括：

A.

a) 和一种直接亲合色谱基质的活性位点保温粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液，该基质含有一种载体基质，任选地通过间隔段而共价偶合到可逆的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽的N-端上，以使所述肽结合到木瓜凝乳蛋白酶分子的活性位点上；

b) 用适宜的洗脱液洗脱木瓜凝乳蛋白酶；

B.

1、在pH值低于2.0的条件下沉淀一种含有粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液混合物；

2、从所述混合物中分离粗制的木瓜蛋白酶的水溶液；

3、中和并任选地对所述粗制木瓜凝乳蛋白酶的溶液进行脱盐；

C.

i) 酸沉淀一种含有粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液混合物；

ii) 从所述混合物中分离粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液；

iii) 中和并任选地对所述粗制木瓜凝乳蛋白酶进行脱盐；

iv) 和一种直接亲合色谱基质的活性位点保温由iii)步骤得到的溶液，该色谱基质含有一种载体基质，该基质，可任选地通过间隔段，共价偶合到一种可逆的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽的N-端，以使所述肽结合到木瓜凝乳蛋白酶分子的活性位点上。

v) 用适宜的洗脱液洗脱木瓜凝乳蛋白酶。

2、根据权利要求1的方法，其中酸沉淀是在pH1.2-1.8

范围内进行。

3、根据权利要求 1 或 2 的方法，其中至少结合有一个阳离子交换色谱步骤。

治 疗 剂

本发明涉及木瓜凝乳蛋白酶，改进的含有木瓜凝乳蛋白酶的药物组合物，以及治疗脊椎动物椎间的损伤的，突出的或异常的椎间盘的方法。该方法包括将一种改进的组合物溶液注入所说的椎间盘。本发明还涉及制备本发明木瓜凝乳蛋白酶的方法，和用于这些方法中的肽和亲合色谱法的基质，以及抗木瓜凝乳蛋白酶培养的单一特异抗体制剂。

木瓜凝乳蛋白酶是一种存在于巴婆 (paw-paw) [番木瓜 (carica papaya)] 植物胶乳中的一种半胱氨酸蛋白酶。已知它可用于临床。特别是在周知的“化学核溶解 (chemonucleolysis)”中治疗椎间盘的脱垂或突出或坐骨神经痛，(smith, L. (1964), J, Amer. Med. Assoc. 187, 137-140)。

Jansen和Balls(1941)首先尝试将木瓜凝乳蛋白酶纯化和表征它 (J. Biol. chem., 137, 405-417)。它们采用酸沉淀和盐析方法制备酶。近来，都使用离子交换色谱法进行纯化。例如，GB 2098997 (Smith Laboratories Inc.) 和 GB 2156821 (Simmons) 都描述了采用阳离子交换树脂从其它已知的半胱氨酸蛋白酶中分离木瓜凝乳蛋白酶，这些方法都已用于工业规模生产木瓜凝乳蛋白酶。但是所得产物与Buttle 和Barrett(1984. Biochem. J. 223, 81~88) 所制备的相比较，其比活度相当低，该方法使用小规模的多步法，中间结合阳离子交换色谱步骤。这种高比活度的产物，其产率极低，而且方法不宜

用于工业规模。Buttle等人(Biochem.J.(1989.7月)261,469-476)发现,这种产物由一种新近分离和表征的蛋白酶,番木瓜蛋白酶IV所污染,这种酶和木瓜凝乳蛋白酶一起从阳离子交换树脂上共洗脱。阳离子交换色谱法不能从番木瓜蛋白酶中分离木瓜凝乳蛋白酶达到这样的程度以致能用于制备木瓜凝乳蛋白酶而基本上没有番木瓜蛋白酶IV的污染。

文献中也有涉及到使用亲合色谱步骤的方法。Polgar(1981,Biochim, Biophys, Acta, 658,262~269)描述了纯化木瓜凝乳蛋白酶的方法,在许多其它技术中,采用了在琼脂糖-汞化合物柱上的亲合色谱法Dubois等人(Biol.Chem.Hoppe-Seyler(1988), 369,733-740)报导了采用类似的技术由番木瓜胶乳中分离半胱氨酸蛋白酶。这种亲合色谱法是基于键合到惰性基质的汞配位体和蛋白酶的暴露的硫醇基团之间的相互作用。因此,除了木瓜凝乳蛋白酶之外的蛋白质,尤其是其它半胱氨酸蛋白酶,如番木瓜蛋白酶IV,能结合到这种柱上并接着能和木瓜凝乳蛋白酶一起共洗脱。

最近,科学论文报导了采用固定肽衍生物通过亲合色谱法来纯化特异蛋白酶,例如,人体组织蛋白酶(Rich等人,1986,Biochem.J. 235, 731-4)和由溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)分离组织溶解酶(Luaces和Barrett, 1988, Biochem. J.250,903-909)。然而,至今这种方法还没有用于纯化木瓜凝乳蛋白酶。因此,很明显,需要一种适用于工业规模的,纯化木瓜凝乳蛋白酶的改进方法。

本发明人发现了一种新的纯化和分离高活性木瓜凝乳蛋白酶而没有污染的方法,特别是,没有番木瓜胶乳中的其它半胱氨酸蛋白酶(包括番木瓜蛋白酶IV)的污染。

本发明提供了一种木瓜凝乳蛋白酶，它基本是纯的并含有高比率的活性酶。

本发明的木瓜凝乳蛋白酶基本上不含存在于番木瓜胶乳中的免疫学上特殊的蛋白酶，即木瓜蛋白酶和番木瓜蛋白酶Ⅲ（P P I I I），这两种酶都由Buttle和Barrett（(1984), Biochem. J., 223, 81~88.）描述，尤其近来发现的番木瓜蛋白酶Ⅳ（P P I V）。本文所用的“基本上纯”可以进一步定义为“基本上免疫学纯”是指本发明的木瓜凝乳蛋白酶与抗纯的P P I V所产生的特异抗体（由Buttle等人分离和表征的，见Biochem. J. (1989.7月) 261, 469~476而且在下文有简述）之间基本上没有任何交叉反应，以及与对木瓜蛋白酶和P P I I I而培养的特异抗体（如上文Buttle和Barrett(1984)所述, 同上文）基本上没有任何交叉反应。需要特别注意的是，发现按Buttle和Barrett方法制备的所谓“纯”木瓜凝乳蛋白酶含有明显量的P P I V（约14%），因此最初由它们制备的抗木瓜凝乳蛋白酶抗体试剂对本发明纯化的木瓜凝乳蛋白酶和纯化的P P I V两者都具有特异性。优选的本发明木瓜凝乳蛋白酶中的各种P P I V、P P I I I和木瓜蛋白酶的含量低于1%（重量）、更好的低于0.2%（重量），最好的低于0.1%（重量）。抗本发明木瓜凝乳蛋白酶的单一特异抗体试剂是本发明的另一方面。

在抗原和抗体之间的交叉反应可以用通常技术检测。这些技术包括：如熔融火箭（fused rocket）免疫电泳法和双向免疫扩散法（double immunodiffusion）（由Buttle和Barrett描述，（1984），同上文），单一散射免疫测试法，放射免疫测试法（R I A）以及连接酶的免疫吸附剂测定法（E L I S A）。

任何酶制剂中的所含活性酶的量一般是指，在指定测定条件下，对一种特定的基质的比活性。本文所用的“对BAPNA的比活性”是指在标准测定条件下用合成基质N- α -苯甲酰基-DL-精氨酸对-硝基酰苯胺(BAPNA)测定时，按每毫克干产物每秒所产生的对硝基酰苯胺的皮摩尔数(pmol/sec/mg)表示的蛋白酶活性。对已知木瓜凝乳蛋白酶药物制剂所用的标准测定条件详细描述于下文，如“BAPNA测定方法1”或“Smith测定方法”以及由此得到的比活性是指在37℃ pH 6时，对BAPNA(1 mM)的比活性。本发明的木瓜凝乳蛋白酶定义为，在37℃和pH 6.0时，对BAPNA(1 mM)的比活性至少为750单位每毫克。一般，本发明的木瓜凝乳蛋白酶，在37℃和pH 6时，对BAPNA(mM)的比活性为800~1700单位每毫克，优选的为1000~1700单位每毫克，如1200~1500单位每毫克。在本发明的一个优选方案提供一种在37℃ pH 6.0时具有至少1300单位每毫克的对BAPNA(1 mM)的比活性的木瓜凝乳蛋白酶。

在大量涉及木瓜凝乳蛋白酶和其它半胱氨酸蛋白酶的文献中，蛋白酶活性广泛地定义是根据由合成基质BAPNA中所释放的对-硝基苯胺。当在所引用的比活性值之间进行直接比较时仍可遇到问题。要取得精确值决定于许多因数，特别是涉及精确的条件，如在测定中所用的pH值、温度、缓冲剂组份和基质浓度。由Buttle和Barrett(1984, 同上文)所制备的木瓜凝乳蛋白酶在其文中所引用的抗BAPNA的比活性为0.154 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ，相当于2567 pmol/sec/mg。但是Buttle和Barrett所用的测定条件不同于已知的药物级木瓜凝乳蛋白酶所用的测定条件。因此不能直接比较比活性。

因为Buttle和Barrett所制备的产物被认为在至今所报导的具有最高比活性的木瓜凝乳蛋白酶制剂，所以本发明的最初工作是按他们文献中所指定的测定条件进行。本文中将该方法以BAPNA测定方法2表示，由此得到的比活性是指在40℃和pH6.8时的抗BAPNA(2.5mM)的比活性。很明显，测定条件不同于木瓜凝乳蛋白酶的药剂制剂所用的条件。采用这测定方法测得的结果表明，比采用通常的药剂BAPNA测定法1所测得的结果高2—3倍，虽然这也许是科学上的错误，要使用一种简单的转换因素将一种测定方法的结果转换到另一种测定方法的结果。然而，涉及本发明的早期工作表明，本发明的纯木瓜凝乳蛋白酶在40℃和pH6.8时，其抗BAPNA(2.5mM)的比活性确定为至少2500单位/每毫克，优选的为3000—4500单位/每毫克，例如，3500—4500单位/每毫克。在一个优选方案中，本发明提供了在40℃和pH6.8时对BAPNA(2.5mM)具有的比活性至少为3000单位/每毫克的木瓜凝乳蛋白酶。

本发明的发明人，在其最近发表的工作(1989, 7月, 同上文)(在下文中有简述)中，纯化并表征了一种存在于现有技术方法所生产的木瓜凝乳蛋白酶中的，以前未知的污染物，称为番木瓜蛋白酶IV(PPIV)。PPIV对BAPNA是失活的，但对偶氮酪蛋白具有蛋白酶活性的。另外，还发现PPIV对偶氮酪蛋白的活性基本上不受1μM以下浓度的鸡胱素(chicken cystatin)的抑制。本发明的木瓜凝乳蛋白酶对偶氮酪蛋白的活性至少有95%被这些浓度的鸡胱素所抑制。本文所用的词“对偶氮酪蛋白的活性”是指蛋白酶活性，它根据在下文所述的标准条件下，使用衍生的蛋白基质偶氮酪蛋白

测定时，以每单位干重产物在每单位时间内所产生的三氯乙酸可溶肽的量来表示。根据本发明的优选木瓜凝乳蛋白酶具有对偶氮酪蛋白的活性，该活性至少有 97%，特别是有 98—100%，被 1 μ M 以下浓度的鸡胰素所抑制。

申请人确信本发明的木瓜凝乳蛋白酶基本上是纯的木瓜凝乳蛋白酶，是第一次制备出来的没有污染蛋白而含有高比例的活性酶。这一突破的取得仅仅在于发现了有一种污染蛋白至今一直与木瓜凝乳蛋白酶共纯化，如在离子交换和已知的亲和柱上的纯化。进一步的工作就是如 P P I V 污染物的分离和表征。用于制备 P P I V 的方法不宜用于制备纯木瓜凝乳蛋白酶，但是 P P I V 的制备提供了两个重要参数，通过这些参数就可以表征纯的木瓜凝乳蛋白酶，即 1) 纯木瓜凝乳蛋白酶与 P P I V - 特异抗体之间没有交叉反应作用，2) 在有鸡胰素存在下，纯木瓜凝乳蛋白酶和 P P I V 对偶氮酪蛋白的活性有区别的这两个特征是研究适于纯化木瓜凝乳蛋白酶方法所必要的基本工具。

很明显，本发明的木瓜凝乳蛋白酶几乎是具有理想活性的木瓜凝乳蛋白酶。纯酶制剂对于那些企图充分表征酶，例如根据其催化特性和结构，来说是极为重要的。

本发明的另一方面是提供一种含有本发明木瓜凝乳蛋白酶的组合物，该组合物基本上是没有 P P I V。最好木瓜凝乳蛋白酶在 37℃ 和 pH 6.0 时，对 B A P N A (1 mM) 的比活性至少为 750 单位每毫克。组合物可以是按适当重量的分立单位形式，例如，在无水条件下（如在真空瓶或安瓿中）密封的木瓜凝乳蛋白酶等分立形式。这些组合物也可以含有还原剂如二硫苏糖醇，半胱氨酸自由基或酸的加成盐，以基本上防止因氧化而使酶失活。另外，组合物还可以含有

一种具有盐形式的可逆半胱氨酸蛋白酶抑制剂，例如，连四硫酸钠或氯化汞。这些可逆抑制剂屏蔽了酶的活性位点，从而阻止其因氧化而失活，直到有一种能再活化酶的还原剂置换为止。其它的惯用添加剂，例如，诸如亚硫酸氢钠的防腐剂，诸如EDTA的螯合剂，诸如氯化钠的载体，也可以根据需要而加入。

使用一种纯酶制剂在木瓜凝乳蛋白酶的临床应用方面极为重要。例如化学核溶解 (chemonucleolysis)，据报导，对这种治疗的过敏反应可以达到治疗病人的3%。粉状的番木瓜提取物是广泛地用于食品工业，因此，可以认为，许多对化学核溶解的过敏反应是由于对这些制剂的予敏化引起的。众所周知，对哺乳动物注射外来蛋白酶抗原往往会伴发过敏性反应的休克的危险，需要按照完善的医学实践以使用最纯和最具活性的任何这种蛋白酶，以利于获得最佳的作用效果以及降低变应性反应的危险至最小。

因此本发明的一个优选方面是提供一种含有本发明木瓜凝乳蛋白酶的藥物组合物，该组合物基本上没有PPIV。优选的木瓜凝乳蛋白酶在37℃和pH6.0时对BAPNA (1mM)的比活性至少是750单位每毫克。该藥物组合物最好还含有一种藥物上允许的无毒还原剂，如半胱氨酸游离碱或其酸的加成盐，如L-半胱氨酸盐酸一水合物。一般，还原剂的用量为每4000单位木瓜凝乳蛋白酶约0.5-3毫克，例如是木瓜凝乳蛋白酶重量的15-90%。然而本发明的藥物组合物还可以含有任何惯用的藥物上允许的稀释剂、赋形剂或载体，例如，如亚硫酸氢钠的防腐剂、如EDTA的螯合剂和如氯化钠的载体，根据需要，可以加入。

含有本发明木瓜凝乳蛋白酶的藥物组合物可用于眼科学，如眼损

伤的治疗，或焦痂组织的清创术，如烧伤、溃疡、压迫坏死、褥疮和其它有失活组织存在的损伤。该组合物一般适于局部使用，例如无菌溶液、凝胶、悬浮液或软膏，这些可直接用于伤口，也可以通过浸渍有该组合物的材料包裹伤口而施药。

本发明的木瓜凝乳蛋白酶最好是制成用于矫形外科学的剂型。这种药物组合物可以很容易地制成非肠道给药的单位剂量形式，如在适宜载体中的无菌、无热原的溶液或悬浮液形式，或用于在用前重新配制的浓缩剂型。适用于通过注射溶解或处置异常或损伤的椎间盘的髓核的药剂单位可以是 500—5000 BAPNA 单位（在 37℃ 和 pH 6.0 用 1 mM BAPNA 测定）的本发明木瓜凝乳蛋白酶和诸如半胱氨酸钠盐酸的还原剂，并包装在真空瓶中。优选的药剂单位形式是标称 2000 或 4000 BAPNA 单位（1 mM BAPNA, 37℃, pH 6.0）的木瓜凝乳酶。剂量单位大致可以包括：如 2—5 mg，最好 2.5—3.5 mg 的木瓜凝乳蛋白酶和 0.2—3 mg，最好是 1.0—2.0 mg 的半胱氨酸钠盐酸，包装在真空容器内，可以任选地混合有适宜的载体，如氯化钠。

在下文所述的实验中，发现有 26 个单独血清样品对商品的木瓜凝乳蛋白酶制剂 chymodiactin[®]（按 GB 2098997 所述方法生产）具有天然获得的 IGE 抗体。本文实验证明，这些血清含有对本发明木瓜凝乳蛋白酶和对其它三种发现于番木瓜胶乳的半胱氨酸蛋白酶，即木瓜蛋白酶、PPII、PPIV，的 IgE 抗体。然而，对木瓜凝乳蛋白酶、PPII、和 PPV 的平均 IgE 强度表明，PPII 和 PPV 的总计约为检出 IgE 的 75%。这些结果清楚地表明，这些蛋白酶具有基本免疫原的特征而且可以代表在至今易

于制得的木瓜凝乳蛋白酶中所含抗原决定子的主要部分，而且成为一种极大的潜在抗原危害性。因此本发明的药物组合物具有优于现有技术组合物的实质性优点。

本发明还涉及采用化学核溶解法治疗哺乳动物椎间盘的损伤、突出或其它异常，该方法包括向椎间盘注射一种本发明木瓜凝乳蛋白酶的药用溶液，其用量要足以有选择地溶解所述椎间盘部位。

本发明还涉及治疗哺乳动物主体的椎间盘异常的方法，该方法包括：

- i) 将针插入椎间盘；
- i i) 用X-射线确定所述针的位置；
- i i i) 向椎间盘注入本发明木瓜凝乳蛋白酶的药用溶液，其用量要足以有选择地溶解所述椎间盘部位。

本发明还提供了一种纯化木瓜凝乳蛋白酶的方法，该方法包括：

- a) 和一种直接亲合色谱基质的活性位点来保温粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液，该基质含有一种载体基质，任选地通过间隔段 (spacer arm) 而共价偶合到可逆的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽的N-端上，以使所述肽结合到木瓜凝乳蛋白酶分子的活性位点；
- b) 用一种适宜的洗脱液洗脱木瓜凝乳蛋白酶。

用作本发明纯化木瓜凝乳蛋白酶的原料的粗制木瓜凝乳蛋白酶，可以是鲜木瓜胶乳的提取物，一种由可商购的喷雾干燥胶乳制剂的溶液，木瓜蛋白酶的浓缩物，或部分纯化的木瓜凝乳蛋白酶，或者可以是一种所谓“纯”的木瓜凝乳蛋白酶的可商购的制剂。然而，专业人士应当明白，番木瓜的相当完全的提取物，如番木瓜胶乳，含有相当量的其它天然存在的组份，这些组份需要去除。在将粗制木瓜凝乳蛋

白酶溶液用亲合色谱法基质进行保温之前，最好将这些组份的大部分去除，例如，可通过过滤或离心除去不溶物。然而我们发现一种酸沉淀过程中大部分杂质都沉淀，这种酸沉淀步骤是特别有利。

在酸沉淀过程中，粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液的pH值降低到低于pH2，放置，然后分出木瓜凝乳蛋白酶，用这种方法纯化木瓜凝乳蛋白酶已近50年。申请人惊奇地认为，在这方法中所用pH值的精确性大大地影响所得木瓜凝乳蛋白酶溶液的PPIV污染。仔细地监测和控制这步骤（至今一直认为这是木瓜凝乳蛋白酶纯化粗制的基本步骤）可以显著地降低PPIV的污染，现在发现PPIV蛋白在使用通常方法时与木瓜凝乳蛋白酶共纯化。本发明提供一种纯化木瓜凝乳蛋白酶的方法，包括：

- 1、在pH值低于2.0的条件下，沉淀一种含有粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液混合物；
- 2、从所述混合物中分离粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液；
- 3、中和并任选地对所述粗制木瓜凝乳蛋白酶溶液进行脱盐。

最好从制剂中除去任何残留的蛋白污染物，通过在纯化过程中采用包括至少一个阳离子交换色谱步骤，如Buttle和Barrett所述的（1984，同上文）。最好是使用高性能色谱，例如在商品称为Mono-s或S-Sepharose[®] HP (Pharmacia)的阳离子交换树脂上的FPLC[®]作为最终步骤。

本发明的一个特别优选的方面是提供一个纯化木瓜凝乳蛋白酶的方法，该方法包括：

- i) 最好在pH低于2.0的条件下，酸沉淀一种含有粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液混合物；

- i i) 从所述混合物中分离粗制木瓜凝乳蛋白酶的水溶液；
- i i i) 中和和任选地对所述粗制木瓜凝乳蛋白酶进行脱盐；
- i v) 和一种有直接亲合色谱基质的活性位点保温由 i i i) 得到的溶液，该色谱基质包含一种载体基质，该基质，可任选地通过间隔段，共价偶合到一种可逆的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽的 N-端，以使所述肽结合到木瓜凝乳蛋白酶分子的活性位点上；
- v) 用适宜的洗脱剂洗脱木瓜凝乳蛋白酶。

对专业人员来说是显然的，优选的阳离子交换色谱步骤可以按要求，在亲合色谱步骤之前或之后，交换地或附加地直接使用。

含有粗制木瓜凝乳蛋白酶的混合水溶液可以是：例如，鲜番木瓜胶乳、喷雾干燥的番木瓜胶乳或木瓜蛋白酶浓缩物（例如，由英国的 Powell & Scholefield，或由美国的 Siebels 商购的喷雾干燥胶乳）悬浮在水中或在如磷酸盐或乙酸盐缓冲剂的缓冲水溶液中。在混合物酸沉淀之前最好用通常方式，如过滤或离心除去不溶物。通过逐渐加入有机或无机酸可以酸化混合物，最好是使用无机酸水溶液，如盐酸，将混合物的 pH 值降到 1.0 - 2.0，优选的是 1.2 - 1.8，最好是降到约 1.5 的 pH 值。所沉淀的物质可以用通常方式，如过滤或离心，去除。所得的酸性粗制木瓜凝乳蛋白酶溶液中，发现 P P I V 和木瓜蛋白酶已被除尽，而有很少量的 P P I I I。

在将酸性粗制木瓜凝乳蛋白酶进行任何进一步的色谱步骤之前，专业人员都知道，需要用碱性试剂如氢氧化钠水溶液中和溶液；并且最好按通常方式，如采用凝胶过滤或渗析，从溶液中除去过量的盐。通过过滤或离心可以除去任何其它沉淀物。

众所周知，在半胱氨酸蛋白酶的现有技术中，可以用还原剂，如

二硫苏糖醇或半胱氨酸，来活化并用如EDTA的螯合剂或如商品名为chelex(Bio-Rad,英国)的螯合树脂除去痕量重金属，如汞，通过这些途径都可以明显提高酶的活性。这些方法最好要有自由巯基存在，这是公知的，它是半胱氨酸蛋白酶活性位点的基本特征，是活性必要的。重金属的去除最好通过对含有EDTA的缓冲液进行透析来进行。另外，当采用阳离子交换色谱步骤时，重金属可以通过以还原剂活化木瓜凝乳蛋白酶而除去，因为重金属结合在阳离子交换柱上随后洗涤交换柱。

最好在中和之后，用还原剂，如半胱氨酸，处理粗制木瓜凝乳蛋白酶溶液，以保证活性位点的最大暴露，并将它稀释到适当的蛋白质含量，如 30 mg/ml 。然后和一种直接亲合色谱基质的活性位点保温中和过的粗制木瓜凝乳蛋白酶溶液，使之通过活性位点将木瓜凝乳蛋白酶特定地结合到与其结合的抑制肽上。木瓜凝乳蛋白酶可以按一定速率，如 $35 - 40\text{ ml/hr/cm}^2$ ，加到亲合色谱基质柱上。每升亲合色谱基质可以结合约 $1 - 4$ 克木瓜凝乳蛋白酶。

亲合色谱基质包括一种载体基质，如凝胶或膜基质，一种抑制肽是共价偶合到基质上而固定。优选的载体基质是琼脂糖凝胶，如商品名为Sepharose^R (Pharmacia)的，也可以使用衍生的纤维素质膜基质，如商品名为Zeta(Anachem)的那些，肽的N-端可以直接或通过一种间隔段而间接结合到载体基质上，间隔段是一种例如9个碳原子的间隔段，如商品名为ECH Sepharose^R 4B (Pharmacia)的一种优选的凝胶基质。这种凝胶基质上的游离羧基和抑制肽的游离氨基之间的偶合，导致肽键的形成，这过程可以按通常方式实现，如通过以一种水溶液的碳化二亚胺溶液促进的酸催化的缩合，碳化二亚胺可以是N

-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸(EDC)。一般的偶合是通过在EDC存在下,将凝胶基质与抑制肽溶液一起轻轻搅动,例如在室温下搅动2-4小时。肽与凝胶基质的适当偶合比是,例如,每升凝胶3-4克肽。

在使用前,可以将亲合色谱基质先装入色谱柱。然而,当所用的色谱基质是一种凝胶时,也可以采用不连续保温的步骤,然后,如有需要,将基质装入柱中以便以后酶的洗脱。最好在使用前用缓冲水溶液好好洗涤基质以除去痕量的未结合肽和缩合催化剂。为生产使用亲合色谱基质柱,最好要保持现场卫生,如使用乙醇水溶液并因而可重复使用。

可逆的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽,是指那些当它们固定在载体基质上时,能与木瓜凝乳蛋白酶的活性位点结合,这种结合比对在粗制木瓜凝乳蛋白酶制剂中所存在的其它半胱氨酸蛋白酶(特别是PP1V)的活性位点的结合要强得多,但是这些在以后可以置换的。在优选的抑制肽基团中,C-端氨基酸包括醛衍生物,如缩氨基脲,甲氧基亚胺或苯丙氨酸的肟或一种苯丙氨酸的类似物。更具体地说,C-端的氨基酸可以是一种苯丙氨酸的衍生物,如D或L-苯丙氨酸缩氨基脲(PheSc),甲氧基亚胺(PheMo)或肟(PheOx)或一种苯丙氨酸的类似衍生物,例如,D或L-丙氨酸缩氨基脲(AlaSc),D或L-环己基丙氨酸缩氨基脲(ChaSc)或D或L-亮氨酸缩氨基脲(LeuSe)。以下的C-端二肽认为是优良的木瓜凝乳蛋白酶抑制肽,即L-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc、L-Phe-D-PheSc、L-Phe-L-PheSc、L-Phe-L-PheMo、L-Phe-L-PheOx、L-Tyr-L-PheSc、L-Ala-L-ChaSc、和L-Ala-L-LeuSc。二肽L-Phe-L-PheSc已由Luaces和Barrett[(1988),250,903-909]所描

述。特别优选的肽是二肽，尤其是 L-Ala-L-PheSc、L-Ala-D-PheSc 和 L-Phe-D-PheSc。新的抑制肽本身和含有这些肽的新亲合色谱基质构成本发明的另一方面。

在将木瓜凝乳蛋白酶从亲合色谱基质上洗脱之前，最好先洗涤基质，以去除非特定结合的物质，例如，用诸如 pH 4 - 5 的柠檬酸盐或乙酸盐缓冲剂的缓冲水溶液。发现在洗涤缓冲液和洗脱缓冲液中添加试剂是十分有利的，这样可以降低疏水性的相互作用以及基质与粗制木瓜凝乳蛋白酶成份之间的其它非特定结合的反应。这些试剂包括，如 EDTA、异丙醇和乙二醇。

用适当的洗脱剂将木瓜凝乳蛋白酶由基质上洗脱。适当的洗脱剂能够破坏固定的抑制肽与其结合的木瓜凝乳蛋白酶之间的结合，或者通过降低活性位点对抑制肽的亲合性，或者通过选择地从活性位点置换肽。木瓜凝乳蛋白酶对抑制肽的亲合性可以降低，如，通过用一种改性剂（如异丙醇）或用一种具有高于或低于木瓜凝乳蛋白酶的活性 pH 值范围的 pH 值的洗脱剂，以改变活性位点的特性。然而，专业人员很清楚，这些洗脱剂必须是那些不能引起所洗脱的酶产生不可逆的失活。另外，通过洗脱剂，可以将木瓜凝乳蛋白酶从固定抑制肽上选择性地置换出来，该洗脱剂含有一种过量的与抑制肽紧密结合的组份，例如，另一种半胱氨酸蛋白酶。

本发明的一个较佳方面中，洗脱剂含有一种可逆的半胱氨酸蛋白酶抑制剂，它与木瓜凝乳蛋白酶的活性位点优先结合，从而从固定的抑制肽上将它置换出来。常用的抑制剂包括，如，低分子量的二硫化物，如 2,2'-二联吡啶二硫化物，羟乙基二硫化物，甲基-2-吡啶基二硫化物和联四硫酸钠；以及汞化合物试剂，如氯化汞、对一氯汞

苯甲酸盐和汞撒利。专业人员都清楚，木瓜凝乳蛋白酶和固定抑制肽之间的亲和性是随着所使用的肽的种类、pH值、离子强度和洗脱缓冲液的组成以及所用的温度而改变的。因此用于洗脱木瓜凝乳蛋白酶必要的蛋白酶抑制剂的确切性质和浓度也有变化。再者，汞化合物试剂与木瓜凝乳蛋白酶之间的平衡比二硫化物试剂更快，而且可以使用这些抑制剂连续进行洗脱。只有与结合的木瓜凝乳蛋白酶慢平衡的那些抑制剂，在木瓜凝乳酶洗脱之前，可能需要用抑制剂保温基质，如1—2小时或更长时间。洗脱馏份的蛋白质含量或蛋白酶活性可以按常规方法监测，离子强度或洗脱剂性质以及基质与抑制剂的保温时间可以变化，以便有效地并有选择地从基质中置换木瓜凝乳蛋白酶。将含有少量蛋白质或少量木瓜凝乳蛋白酶的洗脱馏分排出。

洗脱剂的pH值最好要足够的低，以减弱木瓜凝乳蛋白酶与抑制肽之间的相互作用，例如，pH 4—5，更具体的是pH 4.5。适宜的洗脱剂包括，例如，在pH 4.5的含有柠檬酸钠（50 mM）和EDTA（1 mM）的乙二醇水溶液（33%）中的羟乙基二硫化物（100 mM），在pH 4.5的含有柠檬酸钠（50 mM）和EDTA（1 mM）的乙二醇水溶液（33%）中的二联吡啶二硫化物（30 mM），在pH 4.5的含有柠檬酸钠（50 mM）和EDTA（1 mM）的乙二醇水溶液（33%）中的甲基吡啶二硫化物（30 mM），在含有氢氧化钠（50 mM）和EDTA（25 mM）的乙二醇水溶液（33%）中的汞撒利酸（10 mM）并用乙酸调节至pH 4.5，和在pH 4.5的含有乙酸钠（50 mM）的乙二醇水溶液（33%）的氯化汞（10 mM）。氯化汞是特别优选的可逆半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

在本发明的优选方法中，亲合色谱步骤明显地增加了所纯化的木瓜凝乳蛋白酶的比活性，正如根据对BAPNA的活性测定或通过用E-64或碘乙酸进行活性位点滴定的结果所示。活性形式的木瓜凝乳蛋白酶优先结合并洗脱，因此不同于失活形式的木瓜凝乳蛋白酶和粗制剂中所存在的一些其它半胱氨酸蛋白酶。按本发明采用亲合色谱纯化的新制备的木瓜凝乳蛋白酶一般至少含有70%、优选的至少80%，最好的至少90%活性酶。

一般在储存或使用之前，从洗脱液中回收纯化的木瓜凝乳蛋白酶。最好将洗脱的木瓜凝乳蛋白酶进行进一步的纯化，以便从酶的活性位点置换半胱氨酸蛋白酶抑制剂。可以通过加入过量的还原剂，如半胱氨酸，置换抑制剂，如有必要，可任选地使用常规技术如凝胶过滤或透析以除去置换的抑制剂。另外，可以通过吸附在特定的树脂上去除抑制剂，例如，低分子量的二硫化物可以吸附在谷胱甘肽亲合柱上而汞化合物试剂可以吸附在螯合树脂上。当抑制剂结合在阴离子交换柱上时，最好通过用还原剂，如半胱氨酸，活化酶而除去抑制剂，然后再将抑制剂从柱上洗掉。在储存之前最好冻干，例如冷冻-干燥，回收 纯化木瓜凝乳蛋白酶。

本发明的木瓜凝乳蛋白酶可以通过现有技术的已知方法进一步进行表征。这些方法包括，如N-端氨基酸分析、用E-64或碘乙酸滴定活性位点和同时失活速率，十二烷基硫酸钠或多区域阴极聚丙烯酰胺凝胶电泳以及对不同蛋白酶基质的活性。

本发明的新的抑制肽可以按现有技术中公知的类似方法进行制备。例如，二肽衍生物可以按以下系列步骤合成：

a) 可以对要形成抑制肽C-端的氨基酸(第一个氨基酸)的C-端

在本发明的优选方法中，亲合色谱步骤明显地增加了所纯化的木瓜凝乳蛋白酶的比活性，正如根据对 B A P N A 的活性测定或通过用 E - 6 4 或碘乙酸进行活性位点滴定的结果所示。活性形式的木瓜凝乳蛋白酶优先结合并洗脱，因此不同于失活形式的木瓜凝乳蛋白酶和粗制剂中所存在的一些其它半胱氨酸蛋白酶。按本发明采用亲合色谱纯化的新制备的木瓜凝乳蛋白酶一般至少含有 7 0 %、优选的至少 8 0 %，最好的至少 9 0 % 活性酶。

一般在储存或使用之前，从洗脱液中回收纯化的木瓜凝乳蛋白酶。最好将洗脱的木瓜凝乳蛋白酶进行进一步的纯化，以便从酶的活性位点置换半胱氨酸蛋白酶抑制剂。可以通过加入过量的还原剂，如半胱氨酸，置换抑制剂，如有必要，可任选地使用常规技术如凝胶过滤或渗析以除去置换的抑制剂。另外，可以通过吸附在特定的树脂上去去除抑制剂，例如，低分子量的二硫化物可以吸附在谷胱甘肽亲合柱上而汞化合物试剂可以吸附在螯合树脂上。当抑制剂结合在阳离子交换柱上时，最好通过用还原剂，如半胱氨酸，活化酶而除去抑制剂，然后再将抑制剂从柱上洗掉。在储存之前最好冻干，例如冷冻-干燥，回收 纯化木瓜凝乳蛋白酶。

本发明的木瓜凝乳蛋白酶可以通过现有技术的已知方法进一步进行表征。这些方法包括，如 N - 端氨基酸分析、用 E - 6 4 或碘乙酸滴定活性位点和同时失活速率，十二烷基硫酸钠或多区域阴极聚丙烯酰胺凝胶电泳以及对不同蛋白酶基质的活性。

本发明的新的抑制肽可以按现有技术中公知的类似方法进行制备。例如，二肽衍生物可以按以下系列步骤合成：

a) 可以对要形成抑制肽 C - 端的氨基酸 (第一个氨基酸) 的 C - 端

进行保护,例如,在有异丁基氯甲酸盐和N-甲基吗啉存在的条件下与O,N-二甲基羟胺盐酸反应,得到二甲基羟基酰胺衍生物。最好将第一氨基酸的N-端用,例如叔丁氧基羰基,进行最初保护。

b) 已保护的第一氨基酸,例如二甲基羟基酰胺衍生物可以和强酸,如三氟乙酸,反应而形成季铵盐。

c) 然后已保护的第一氨基酸的季铵盐可以与第二个氨基酸衍生物,例如N-苄酯基衍生物,反应以生成一种二肽衍生物。

d) 上面所形成的二肽衍生物可以用一种适度还原剂,如二异丁基铝的氢化物或锂铝氢化物,还原,而在二肽的C-端产生一个游离醛基。

e) 上面所形成的醛可以衍生,例如,与氨基脲反应得到缩氨基脲,与甲氧基胺盐酸反应得到甲氧基亚胺或与羟胺反应得到一种肟。

f) 最后,可以将保护的N-端去保护,例如,通过使用活性炭上的10%的钯催化还原可以除去N-苄酯基基团。

蛋白质的测定

如有可能,通过 A_{280} 测定蛋白浓度,对番木瓜胶乳制剂使用 $A_{280,1\%} = 20.0$,而对纯化或部分纯化的木瓜凝乳蛋白酶制剂使用 $A_{280,1\%} = 218.3$ (Robinson, 1975, *Biochemistry* 14, 3695-3700)。某些含硫醇的试剂和二硫化物会在280 nm吸收。当有这些物质存在时,使用Bio-Rad染色结合测定法(dye-binding assay, (Bio-Rad Laboratories, U.K.))以测定蛋白浓度。使用过滤的喷雾干燥番木瓜胶乳溶液($A_{280,1\%} = 20.0$)作为标准。这方法比 A_{280} 有更少的干扰。在纯化的酶制剂中蛋白质是按产品的总干重量计算的。

木瓜凝乳蛋白酶活性的测定

a) 对BAPNA的活性(测定方法1)——Smith测定法

将各样品加到“缓冲液1”，pH 6.0含有EDTA (1 mM)和半胱氨酸盐酸-水合物 (10 mM)的磷酸钠缓冲液 (0.1 M)，使最终体积为1.0 ml。在37℃在反应开始之前通过加入预先加热至37℃的4 ml N- α -苯甲酰基-DL-精氨酸对-硝基酰苯胺 (BAPNA) (1.25 mM)的基质溶液，将酶活化5分钟。

将300 mg BAPNA溶解在温热的二甲基亚砜中，慢慢加到予热到37℃的450 ml缓冲液1中，然后再用缓冲液1加到500 ml而制成N.B.基质溶液。将基质溶液保持在30℃以防止BAPNA沉淀。

在37℃连续保温30分钟后，加入1 ml乙酸 (4 N)以中止反应。通过测量 ΔA_{410} 而测定所释放的4-硝基苯胺。在这条件下，一个单位的活性相当于每秒钟释放1皮摩尔4-硝基苯胺 ($\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

这些测定条件相当于在以Smith Laboratories Inc 名义申请的GB 2098997中所述的条件，并在全世界用于测定销售的木瓜凝乳蛋白酶药物制剂，如英国The Boots Company PLC生产的商品名为Chymodiatin的木瓜凝乳蛋白酶、~~南朝鲜~~ Sinpoong生产的商品名为Disken 的木瓜凝乳蛋白酶。这种活性单位是国际认可的，通常是指：“Smith BAPNA测定单位”。

b) 对BAPNA的活性 (测定方法2)

将各样品加到pH 6.8的含有EDTA (1 mM)和二硫苏糖醇 (2 mM)或半胱氨酸 (4 mM)的磷酸钠缓冲水溶液 (0.1 M)中，使最终体积为0.975 ml。在40℃在反应开始以前，通过加入25 μ l的N- α -苯甲酰基-DL-精氨酸P-硝基酰苯胺

(BAPNA) (100 mM) 的二甲亚砷溶液将酶 (存在于样品中) 活化 5 分钟。在 40 °C 连续保温 10 分钟, 然后加入 1 ml pH 4.3 的氯乙酸钠 (0.10 M) / 乙酸钠 (0.20 M) 缓冲液以中止反应。用测量 ΔA_{410} 测定释放的 4-硝基苯胺。在此条件下一活性单位相当于每秒钟释放 1 皮摩尔的 4-硝基苯胺 ($\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

这些测定条件正好与Buttle和Barrett((1984), 同上文)所描述的一样, 并用于实施例 2.1、2.3 和 2.6 所描述的预备实验中。

使用 BAPNA 测定方法 1 和 2 所得到的木瓜凝乳蛋白酶活性的绝对值是不同的, 用方法 2 得到的值比用方法 1 得到的值高约 2 至 3 倍 (见实施例 3.1)。

c) 用碘乙酸滴定活性位点。

按照Zucker等人 (Biochim. Biophys. Acta 828(1985), 196-204) 所描述的用 E-64 滴定活性位点的类似方法, 使用碘乙酸进行木瓜凝乳蛋白酶的活性位点滴定。将木瓜凝乳蛋白酶溶液, 按上面 (a) 中所述, 稀释到缓冲液 1 中, 得到含 60 μM 蛋白的溶液 (由 $A_{280} 1\% = 18.3$ 计算 $\epsilon_{280} = 4.3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Robinson(1975), 同上文, 以及由Jacquet等人的氨基酸顺序计算 $MW = 23656$, (May 1989), Biochem. Hoppe-Seyler, 370, 425-434) 将 20 μl 等分的木瓜凝乳蛋白酶溶液加到滴定管中, 并在 37 °C 和 20 μl 缓冲液 1 (对照中为 40 μl) 保温 5 分钟。在每个滴定管中加入 20 μl 的碘乙酸水溶液 (分别为 10、20、30、40、50 和 60 μM) 并在 37 °C 将混合物予保温 10 - 20 分钟。按前面 (a) 中所述, 通过加入 4 ml 予热到 37 °C 的 BAPNA 基质溶液而开始反应。在 37 °C 连续保

温 30 分钟后，按 (a) 中所述，中止反应，通过 ΔA_{410} 测定所释放的 4-硝基苯胺。将这样得到的活性木瓜凝乳蛋白酶的摩尔浓度，与对木瓜凝乳蛋白酶以 $4.3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 摩尔消光系数为基础的蛋白摩尔浓度相比较。然后将活性蛋白的量以总蛋白的百分含量表示。

d) 对偶氮酪蛋白的活性

对偶氮酪蛋白的活性是按上面Rowan等人(1988, Arch. Biochem. Biophys. 267:262-270)所描述的方法测定的，使用少于 $1 \mu\text{M}$ 的酶(基于分子量 24000)，并如有需要，使用 $1 \mu\text{M}$ 鸡胰素。所有酶和抑制剂的浓度是指活性分子的浓度。

使用单一散射免疫扩散进行免疫测定

单一散射免疫扩散测定是基于Mancini等人(1965, Immunochem 2, 235-254)的方法，方法如下：将在 pH7.3 含 NaCl (0.14M) 的磷酸钠水溶液 (10mM) 中的含有单一特异 IgG 制剂的琼脂糖 (1 % w/v) 倒在 Gel Bond^R (FMC Corporation, Maine, 美国) 上，切割成矩形孔 ($r=1\text{mm}$) 并相隔 1.5 cm。将参照和未知样品任意地分布在孔中以减少由于边缘效应而引起误差。接着在孔中加入抗原，将平板放置 24 小时以展开沉淀素环。然后洗涤、干燥和染色。使用纯的适度羧甲基化的抗原以产生标准曲线，该曲线是按抗原对环直径的平方绘制。有效的测定范围是每孔 25 - 300 ng。

PPIV 及其抗体的制备

a) 亲和柱的制备

将丁氧基羰基-L-Phe-P-硝基苯酯 (10mM) 加到 $\alpha\text{-NH}_2\text{CH}_2\text{CN.HCl}$ (20mM) 和二异丙基乙胺 (20mM) 在二甲基甲酰胺 (20ml)

中的搅拌混合物中。混合物在 20℃ 搅拌 2 小时，然后用乙酸乙酯（100 ml）稀释，用水（2 X），三乙胺水溶液（5X）、水（3X）、硫酸氢钾水溶液（2 X）、水（3 X）洗涤，干燥并蒸发。

将残留物由乙酸乙酯：己烷的溶液中结晶，得到 Boc-L-Phe-NHCH₂CN，熔点为 134.5-135℃。

将冰冷却的三氟乙酸水溶液（10 ml）加到 BOC-L-Phe-NHCH₂-CN (5mmol) 的二氯甲烷（10 ml）溶液中。反应混合物在 20℃ 保温 30 分钟，然后在 40℃ 蒸发除去溶剂。将残留物溶于氯仿，蒸发并将该步骤重复二次。所得粗制三氟乙酸盐溶于二异丙基乙胺（7.5 mmol）的二甲基甲酰胺（10 ml）溶液中，并加入 Boc-Gly-p-硝基苯基酯（6.25 mmol）和 N-羟基苯并三唑-水合物（6.25 mmol）。然后滴加足量的二异丙基乙胺以生成 p-硝基苯酚（金黄色），并将此混合物在室温搅拌 2 小时。加入 N,N-二乙基乙二胺（1.5 ml）、15 分钟后加入乙酸乙酯，然后将混合物用水、三乙胺水溶液、水、硫酸氢钾水溶液、水洗涤，干燥并蒸发。残留物在硅胶上色谱法用乙酸乙酯：己烷（20：1）洗脱纯化而得到泡沫状 Boc-Gly-L-Phe-NHCH₂CN。

将 Boc-Gly-L-Phe-NHCH₂CN (30mg) 溶于三氟乙酸：二氯甲烷：茴香醚（25：65：10，1 ml）中，在 0℃ 保温 30 分钟。将混合物在 34℃ 旋转蒸发干燥，残余物溶于甲醇（1.5 ml）和 NaHCO₃ 水溶液（0.1 M，pH 8.0，1.5 ml）而得到配位体溶液。

将活化的 CH-Sepharose[®] 4B (Pharmacia; 3克干重) 在 4℃ 在盐酸水溶液 (1mM, 75ml) 中水合过夜，然后用盐酸（1 mM，600 ml），接着用 NaHCO₃ 水溶液 (0.1M, pH 8.0, 300ml) 进行洗涤。凝胶悬浮在 NaHCO₃ 水

溶液 (0.1 M, pH 8, 30 ml) 中, 加入配位体溶液 (上述), 在 20 °C 将混合物轻轻搅动过夜。在烧结玻璃过滤器上收集凝胶, 用甲醇水溶液 (50% V/V, 180 ml) 然后水 (180 ml) 洗涤并悬浮在用 HCl 调至 pH 9.0 的乙醇胺水溶液 (0.1 M, 30 ml) 中。悬浮液在 20 °C 摇动 4 小时, 然后收集凝胶, 并用水 (500 ml) 洗涤而在 4 °C 贮存于“使用”缓冲液 (磷酸钠 (50 mM), EDTA (1 mM), 乙二醇 (33%), pH 6.8) 中。

b) P P I V 的纯化

Sepharose^R-AHx-Gly-L-Phe-NHCH₂CN 柱 (柱床体积 4 ml) 用“洗脱”缓冲液 (柠檬酸钠 (50 mM), 乙二醇 (33%), pH 4.5; 12 ml) 然后用使用缓冲液 (见上述, 12 ml) 洗涤。

将喷雾干燥的番木瓜胶乳 (0.5 克) 溶于使用缓冲液 (10 ml) 中并过滤 (0.22 μm 孔径)。使用 Bio-Rad 染色结合测定法 (Bio-Rad Laboratories, 英国) 测定滤液中的蛋白浓度。在混合物中加入二硫苏糖醇, 使其最终浓度为 2 mM, 并将混合物在 0 °C 保温 20 分钟。在 20 °C 下将 80 mg 胶乳蛋白加到柱 (38 ml/hr/cm²) 上, 接着加入使用缓冲液 (8 ml), 然后加入洗脱缓冲液 (8 ml)。随后加入含有羟乙基二硫化物 (50 mM) 的洗脱缓冲液 (4 ml), 停止流动并在 20 °C 将柱子放置过夜。然后用含有洗脱缓冲液的羟乙基二硫化物再开始洗脱 (10 ml) 并收集洗脱馏分 (1 ml)。合并呈现有对 B A P N A 活性的馏分并直接加到用 pH 5.0, 含 EDTA (1 mM) 的乙酸钠/乙酸 (50 mM) 水溶液予平衡的 Mono S HR 5/5^R (阳离子交换) 柱上, 然后用相同的缓冲液洗涤交换柱 (1 ml/min), 直到 A_{280 nm} 回到零。然后将梯度

(21.5 mM Na^+ /ml)至1 M的乙酸钠加到柱(Buttle和Barrett, 1984, 同上文)上并收集馏分(1 ml)。洗脱两个主要蛋白峰, 在约0.17 M Na^+ 处洗脱的第一峰相当于木瓜蛋白酶, 在约0.38 M Na^+ 处洗脱的第二峰相于PPIV。合并PPIV峰的馏分并对EDTA水溶液(1mM)渗析, 冷冻干燥并在 -20°C 贮存。纯化的PPIV中没有可检出量的对BAPNA的活性, 但与消化偶氮酪蛋白的活性有关, 这种活性是不能被 $1\ \mu\text{M}$ 浓度的鸡胰素所抑制。

c) PPIV特异抗体的制备

使用前按zucker等人描述的方法(1985, Biochim, Biophys. Acta, 828, 196-204)将纯化的PPIV抗原适度羧甲基化。然后将对PPIV的抗血清在兔体内培养, 通过肌肉注射在弗罗因德的完全助剂(Freund's complete adjuvant)中的360 μg 羧甲基化的蛋白, 二周后接着皮下注射在不完全助剂中的100 μg 。按Heide和Schnick (1978. Hand book of Experimental Immunology(Weir, DM, ed)vol 1, 7.1-7.11. Blackwell, Oxford)所描述的方法, 通过硫酸胺分馏, 从抗血清中部分纯化IgG, 接着渗析到含NaCl(0.14 M)的pH 7.3的磷酸钠(10 mM)水溶液中。

可以使用PPIV-特异IgG制剂, 通过上述单一散射免疫扩散法测定PPIV。

下面的实施例只是通过实施例更详细地说明本发明的各方面, 而不是用以限制本发明的范围。

本文所用的缩写包括: ABTS, 2, 2'-连氨基双(3-乙基苯噻唑啉磺酸); Ahx, 6-氨基己酰基; Ala, 丙氨酸; BAPNA, N- α -苯甲酰基-DL-精氨酸p-硝基苯酰胺; Boc, 丁氧基

羧基；C B Z，苄酯基；C h a，环己基丙氨酸；D M F，N，N-二甲基甲酰胺；E-64，L-3-羧基-2，3-反-环氧-丙酰基亮氨酸酰氨基-(4-胍基)丁烷；E D C，N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸；E D T A，乙二胺四乙酸(二钠盐)；G l y，甘氨酸；L e u，亮氨酸；M o，甲氧基亚胺；O B Z，氧苄基；O x，肟；P h e，苯丙氨酸；S c，缩氨基脲；T H F，四氢呋喃；以及T y r 酪氨酸。

Bio-Rad、Chelex、Chymodiactin、CH-Sepharose 4B、Chymofast、Disken、ECH-Sepharose、Enzfitter，FPLC、Gel-Bond，Mono.SHR、S-Sepharose HP、Tween、Zeta 和 Zetaffinity都是商品名。

除非另外注明，所有步骤都是在室温下进行的。

实施例1 L-丙氨酰基-L-苯丙氨酰基缩氨基脲

步骤 a

A) 将O，N-二甲基羟胺H C l (1 0 . 2 3 g) 在室温下搅拌加到无水的N，N-二甲基甲酰胺(D M F) (1 0 0 m l) 中。在温度保持低于3 0 ℃时，用5分钟时间加入N-甲基吗啉(1 0 . 6 g)。产生白色沉淀并将混合物冷却至0 ℃。

B) 将N-t-B o c-L-P h e (2 6 . 5 g) 溶于无水四氢呋喃(T H F) (2 0 0 m l) 中并冷却至-1 0 ℃。在保持温度-1 0 ℃时，用5分钟时间加入异丁基氯甲酸酯(1 4 . 3 8) 于溶液中。在保持温度-1 0 ℃时，用1 0 分钟时间加入N-甲基吗啉(10.6g) 并连续搅拌1 0 分钟。

c) 在-1 0 ℃用1 5 分钟时间将悬浮液A 加到悬浮液B 中。将混合

物温热至室温后搅拌 3 小时。然后将所得混合物冷却至 0℃，并用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (10.2 g)。加入水 (200 ml) 和乙酸乙酯 (200 ml) 分离出上层有机相并依次用 (a) 水 (200 ml)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%，200 ml)、(c) HCl 水溶液 (0.5 N, 200 ml)、和 (d) 水 (3 × 200 ml) 洗涤。在保持温度低于 30℃ 时，在真空下旋转蒸发去除溶剂，得到 N-t-Boc-L-Phe-O ， N -二甲基羧肟酸酯。

步骤 b

将 N-t-Boc-L-Phe-O ， N -二甲基羧肟酸酯 (2.9 g) 与三氟乙酸 (8 ml) 在室温一起搅拌 4 小时。保持温度低于 30℃，在真空下旋转蒸发除去过量的三氟乙酸。在残留物中加入乙醚 (30 ml) 以形成溶液，然后真空除醚。重复用醚处理，直到产生结晶。过滤收集固体，用醚洗涤后在 P_2O_5 上真空干燥，得到 L-Phe-O ， N -二甲基羧肟酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 c

A) 在室温搅拌下，将 L-Phe-O ， N -二甲基羧肟酸酯的三氟乙酸盐 (7.15 g) 溶于无水 DMF (30 ml) 中。在温度保持低于 30℃ 时，用 5 分钟时间加入 N -甲基吗啉 (2.35 g)，并将所得混合物冷却到 0℃。

B) 在搅拌下，将 CBZ-L-Ala (4.96 g) 溶于无水 THF (55 ml) 中，并将混合物冷却至 -10℃。在 -10℃，用 5 分钟时间加入异丁基氯甲酸酯 (3.05 g)，用 10 分钟时间加入 N -甲基吗啉 (2.35 g)，并将反应混合物在 -10℃ 再搅拌 10

分钟。

C) 在 -10°C 用 15 分钟时间, 将溶液 A 加到溶液 B 中, 使混合物温度升至室温, 并连续搅拌 3 小时。混合物冷却至 0°C , 用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (2.27 g) 并再连续搅拌 5 分钟。然后加入水 (50 ml) 和乙酸乙酯, 分出上层有机相, 并依次用 (a) 水 (50 ml), 和饱和 NaCl 水溶液 (5 ml)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%, 50 ml)、(c) HCl 水溶液 (0.5 N, 50 ml) 和 (d) 水 ($3 \times 50 \text{ ml}$) 洗涤。在温度保持 30°C 以下, 在真空下, 旋转蒸发除去溶剂。加入新鲜的乙酸乙酯 (50 ml), 然后蒸发除去, 得到 CBZ-L-Ala-L-Phe-O, N-二甲基羧酸酯。

步骤 d

将 CBZ-L-Ala-L-Phe-O, N-二甲基羧酸酯 (27.8 g) 溶于无水 THF (280 ml) 中并在 N_2 气下冷却至 -70°C 。在 -70°C , 在 N_2 气下用 60 分钟时间加入二异丁基铝的氢化物的 THF (1 M, 372 ml) 溶液, 并在 -70°C 再连续搅拌 60 分钟。在 0°C , N_2 气中, 在搅拌下, 将反应物在饱和 NaCl (400 ml) 和罗谢尔盐溶液 (600 ml) 中急冷, 然后将混合物温热至室温。加入乙酸乙酯 (600 ml), 过滤混合物并分离水相, 用乙酸乙酯 (200 ml) 萃取。合并的有机相用水 (600 ml) / 饱和 NaCl 水溶液 (400 ml) (X3) 洗涤。保持温度低于 30°C , 在真空下旋转蒸发去除溶剂。残留物从甲苯中重结晶, 将固体在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 CBZ-L-Ala-L-Phe 醛。

步骤 e

A) 将 C B Z - L - A l a - L - P h e 醛 (3 g) 溶于工业甲基化酒精 (2 0 m l) 中。溶液加热到 5 0 °C, 过滤除去不溶物。

B) 将氨基脲盐酸 (1 . 3 g) 的水 (1 0 m l) 溶液加到 K H C O ₃ (1 . 1 g) 的水 (1 0 m l) 溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 并在 5 0 °C 将所得混合物搅拌 2 小时。加入乙酸乙酯 (5 0 m l) 和水 (1 0 0 m l), 分离出水相并用乙酸乙酯 (2 × 2 0 m l) 萃取, 合并的有机相依次用 (a) K H C O ₃ 水溶液 (5 %, 5 0 m l); (b) H C l 水溶液 (0 . 5 N, 5 0 m l) 和 (c) 水 / 饱和的 N a C l 水溶液 (5 0 m l / 2 0 m l × 3) 洗涤。保持温度低于 3 0 °C, 在真空下旋转蒸发除去溶剂, 得到 C B Z - L - A l a - L - P h e S c 。

步骤 f

将 C B Z - L - A l a - L - P h e S c (6 8 0 m g) 溶于甲醇 (9 0 m l) 中, 过滤除去不溶物。用 N₂ 清洗含有甲醇化的 C B Z - L - A l a - L - P h e S c 溶液的装置, 加入催化剂一含 1 0 % 钨的活性炭 (1 0 0 m g)。将 H₂ 通入封闭系统 7 5 分钟。过滤除去催化剂并保持温度低于 3 0 °C, 在真空下旋转蒸发除去甲醇。静止使残留物结晶, 将固体在 P₂O₅ 上真空干燥, 得到 L - 丙氨酰基 - L - 苯丙氨酰基缩氨基脲 (L - A l a - L - P h e S c)。

实施例 2 L - 苯丙氨酰基 - L - 苯丙氨酰基缩氨基脲

步骤 a 和 b

按实施例 1 的步骤 a 和 b 制备 L - P h e - O, N - 二甲基羟肟酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 C

A) 在室温搅拌下, 将 $L-Phe-O, N$ -二甲基羧酸酯的三氟乙酸盐 (1.932 g) 溶于无水 DMF (8 ml) 中。保持温度低于 30 °C, 用 5 分钟时间加入 N -甲基-吗啉 (0.606 g), 所得混合物冷却到 0 °C。

B) 在搅拌下将 CBZ-L-Phe (1.794 g) 溶于无水 THF (15 ml) 中并将混合物冷却到 -10 °C。在 -10 °C 用 5 分钟时间加入异丁基氯甲酸酯 (0.822 g), 用 10 分钟时间加入 N -甲基吗啉 (0.606 g), 在 -10 °C 将反应混合物再搅拌 10 分钟。

C) 在 -10 °C 用 15 分钟时间将溶液 A 加到溶液 B 中, 然后使混合物的温度升至室温并连续搅拌 3 小时。将混合物冷却至 0 °C, 用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (0.612 g), 再连续搅拌 5 分钟。加入水 (20 ml) 和乙酸乙酯 (30 ml), 分出有机相并依次用 (a) $KHCO_3$ 水溶液 (5%, 20 ml)、(b) HCl 水溶液 (0.5 N, 20 ml) 和 (c) 水 (2×30 ml) 洗涤。保持温度低于 35 °C, 在真空下旋转蒸发除去溶剂, 残留物从异丙醇中重结晶, 得到 CBZ-L-Phe-L-Phe-O, N -二甲基羧酸酯。

步骤 d

将 CBZ-L-Phe-L-Phe-O, N -二甲基羧酸酯。(4.89 g) 溶于无水 THF (40 ml) 中。将氢化锂铝 (0.493 g) 装入一干燥的烧瓶中, 在 N_2 气下加入无水 THF (20 ml), 并在冷却到 -50 °C 以前在室温搅拌 10 分钟。在 -50 °C, N_2 气下, 用

10分钟时间加入羧酸酐的无水THF溶液，在0-5℃再连续搅拌20分钟。

将反应混合物冷却到-50℃并在N₂气下加入饱和的罗谢尔盐溶液(60ml)。使混合物温热至室温，加入HCl(浓，10ml)使水相pH值为3，过滤除去不溶物。加入乙酸乙酯(50ml)、分出有机相并依次用(a)水(50ml)、(b)KHCO₃水溶液(5%，50ml)(c)HCl水溶液(0.5N，50ml)和(d)水(3×50ml)进行洗涤。保持温度低于30℃，在真空下旋转蒸发除去乙酸乙酯。残留物放置过夜，在P₂O₅上真空干燥，最后由甲苯中结晶而得到CBZ-L-Phe-L-Phe醛。

步骤e

A)在70℃将CBZ-L-Phe-L-Phe醛。(0.645g)溶于工业甲基化酒精(10ml)。

B)将三水乙酸钠(0.224g)加到氨基脲盐酸(0.183g)的水(3ml)溶液中，加入工业甲基化酒精(2ml)并将混合物加热到60℃。

C)将溶液A加到溶液B中，再用工业甲基化酒精(3ml)洗涤含A的烧瓶，并将洗液加到混合物中，混合物在60-70℃搅拌30分钟。将混合物慢慢冷却1小时，再在冰浴中放置1小时，最后在4℃放置过夜，过滤收集固体，用工业甲基化酒精：水(4：1，3ml)洗涤，在P₂O₅上真空干燥，得到CBZ-L-Phe-L-PheSc。

步骤f

在30℃将CBZ-L-Phe-L-PheSc(2.1g)

溶于甲醇 (3 1 5 m l) 中，过滤除去不溶物。用 N_2 气清洗含有缩氨基脲的甲醇化溶液的容器，加入含 1 0 % 钨的活性碳催化剂 (0.35 g) 并向封闭体系通入 H_2 3 0 分钟。过滤除去催化剂。保持温度低于 3 0 °C，在真空下，旋转蒸发去除溶剂。将残留物在 P_2O_5 上真空干燥，得到 L - 苯丙氨酰基 - L - 苯丙氨酰基缩氨基脲 (L - P h e - L - P h e S c)。

实施例 3 L - 苯基丙氨酰基 - L - 苯丙氨酰基甲氧基亚胺

步骤 a - d

按实施例 2，步骤 a - d 所述方法制备 C B Z - L - p h e - L - p h e 醛。

步骤 e

A) 在 6 0 - 6 5 °C，将 C B Z - L - p h e - L - p h e 醛 (0 . 6 4 5 g) 溶于工业甲基化酒精 (3 5 m l) 中，并过滤除去不溶物。

B) 在 6 0 °C，将三水乙酸钠 (0 . 2 2 4 g) 加到甲氧基胺盐酸 (0 . 1 3 8 g) 的水 (2 5 m l) 溶液中。

C) 在 6 0 °C，将溶液 B 加到溶液 A 中，用水 (1 0 m l) 洗涤含 B 的烧瓶，将洗液与混合物合并并在 6 0 °C 加热半小时，然后在室温冷却 2 小时。过滤收集固体，用工业甲基化酒精：水 (1 : 1，6 m l) 洗涤，并在 P_2O_5 上真空干燥，得到 C B Z - L - p h e - L - p h e - 甲氧基亚胺。

步骤 f

将 C B Z - L - p h e - L - p h e - 甲氧基亚胺 (5 5 0 m g) 溶于甲醇 (3 0 0 m l)，过滤除去不溶物。用 N_2 洗涤含甲醇的甲氧

基亚胺容器，然后加入10%钯的活性炭催化剂(100mg)。将H₂通入密封容器，如有必要，再通入4.5小时。过滤除去催化剂，保持温度低于30℃，在真空下旋转蒸发除去溶剂，得到L-苯基-丙氨酰基-L-苯丙氨酰基-甲氧基亚胺(L-Phe-L-Phe Mo)。

实施例4 L-苯丙氨酰基-D-苯丙氨酰基缩氨基脲

步骤a

A)在室温将O,N-二甲基羟胺盐酸(3.891g)悬浮在无水DMF(40ml)中。温度保持在30℃以下，用5分钟时间加入N-甲基吗啉(4.032g)，然后将混合物搅拌冷却到0℃。

B)将N-t-Boc-D-Phe(10.08克)溶解在无水THF(80ml)中，并冷却到-10℃。保持温度在-10℃，用5分钟时间将异丁基氯甲酸酯(5.47g)加到溶液中。保持温度低于-10℃，用10分钟时间加入N-甲基吗啉(4.032g)，再连续搅拌10分钟。

C)在-10℃用15分钟时间将悬浮液A加到悬浮液B，使混合物加温到室温，搅拌3小时。然后将混合物冷却到0℃，用5分钟时间加入3-二甲基氨基丙胺(3.88g)，再连续搅拌5分钟。加入水(60ml)和乙酸乙酯(60ml)，分离有机相，并依次用(a)水(60ml)，(b)KHCO₃水溶液(5%，60ml)，(c)HCl水溶液(0.5M，60ml)和(d)水(3×60ml)洗涤。保持温度低于30℃，在真空下，旋转蒸发除去溶剂，得到N-t-Boc-D-Phe-O,N-二甲基羟胺酸酯。

步骤b

将 $N-t-Boc-D-Phe-O, N$ -二甲基羧肟酸酯 (11.3 g) 在冰上冷却, 加入三氟乙酸 (30 ml) 并在室温将混合物搅拌 3 小时。保持温度低于 30°C , 在真空下, 旋转蒸发除去过量的三氟乙酸, 在残留物中加入乙醚 (100 ml) 以形成溶液。真空去除溶剂, 重复步骤直到产生结晶, 过滤收集固体, 用乙醚洗涤, 在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 $D-Phe-O, N$ -二甲基羧肟酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 C

A) 在室温搅拌下, 将 $D-Phe-O, N$ -二甲基羧肟酸酯的三氟乙酸盐 (10.1 g) 溶于无水 DMF (41 ml) 中。保持温度低于 30°C , 用 5 分钟时间加入 N -甲基吗啉 (3.155 g) 并将所得混合物冷却至 0°C 。

B) 搅拌下, 将 CBZ-L-Phe (9.4 克) 溶于无水 THF (80 ml) 中, 并将混合物冷却到 -10°C 。在 -10°C 用 5 分钟时间加入异丁基氯甲酸酯 (4.307 g), 用 10 分钟时间加入 N -甲基吗啉 (3.155 g), 在 -10°C 反应混合物再搅拌 10 分钟。

C) 在 -10°C 用 15 分钟时间将溶液 A 加到溶液 B 中, 然后使反应物温度升至室温并连续搅拌 3 小时。将混合物冷却到 0°C , 用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (3.20 g), 再连续搅拌 5 分钟。然后加入水 (60 ml) 和乙酸乙酯 (60 ml), 分离有机相, 并依次用 (a) 水 (60 ml) 和饱和 NaCl 水溶液 (60 ml), (b) $KHCO_3$ 水溶液 (5%, 60 ml), (c) HCl 水溶液 (0.5 N, 60 ml) 和 (d) 水 (3×60 ml) 洗涤。保持温度低于 30°C , 在真空下旋转蒸发除去溶剂。加入新鲜乙酸乙酯, 然后

蒸发除去。残留物由异丙醇中重结晶，得到 $\text{CBZ-L-Phe-D-Phe-O, N-二甲基羧酐酯}$ 。

步骤 d

将二异丁基氢化铝的二氯甲烷溶液 (1 M, 10 ml) 加到 N_2 -清洗过的烧瓶中。加热烧瓶至 50°C 直到全部二氯甲烷都蒸发掉，将系统再用 N_2 清洗。加入无水 THF (10 ml)，混合物冷却到 -70°C 。将 $\text{CBZ-L-Phe-D-Phe-O, N-二甲基羧酐酯}$ (0.978 g) 溶于无水 THF (10 ml) 中，并在 -70°C ，用 10 分钟时间加到二异丁基氢化铝溶液中，在 -70°C 再连续搅拌 10 分钟。将反应混合物在 -60°C 时急冷至甲醇 (30 ml) 和饱和罗谢尔盐溶液 (30 ml) 中；使混合物加温至室温。加入水 (50 ml) 和乙酸乙酯 (50 ml)，分离有机相，水相用乙酸乙酯 (50 ml) 萃取。合并的有机相用水 ($2 \times 200\text{ ml}$) 洗涤并过滤。分离有机相，保持温度低于 30°C ，在真空下旋转蒸发除去溶剂。加入新鲜的乙酸乙酯，然后除去而得到 CBZ-L-Phe-D-Phe 醛 。

步骤 e

A) 在 60°C 将 CBZ-L-Phe-D-Phe 醛 (400 mg) 溶于工业甲基化酒精 (10 ml) 中。

B) 在 60°C 将三水乙酸钠 (0.298 g) 的水 (3 ml) 溶液加到 60°C 的氨基脲盐酸 (0.244 g) 的水 (3 ml) 溶液中。

C) 合并溶液 A 和 B，将所得混合物在 4°C 放置过夜以前在 60°C 时搅拌 5 小时。过滤收集固体，并在 P_2O_5 上真空干燥而得到 CBZ-L-Phe-Phe Sc 。

步骤 f

将 CBZ-L-Phe-D-PheSc (600 mg) 溶于甲醇 (90 ml) 中, 过滤除去不溶物。用 N_2 清洗含有甲醇的缩氨基脲溶液的容器, 加入 10% 钨的活性炭催化剂 (100 mg), 向密闭容器通入 H_2 2 小时。过滤除去催化剂, 保持温度低于 30°C , 在真空下旋转蒸发除去甲醇, 得到 $\text{L-苯基丙氨酰基-D-苯基丙氨酰基缩氨基脲}$ (L-Phe-D-PheSc)。

实施例 5 L-苯丙氨酰基-L-苯丙氨酰基脲

步骤 a - d

按实施例 2 的步骤 a - d 所述方法制备 CBZ-L-Phe-L-Phe 醛。

步骤 e

A) 将上述所制备的 CBZ-L-Phe-L-Phe 醛 (0.645g) 在 $60-65^\circ\text{C}$ 下溶于工业甲基化酒精 (35 ml) 中过滤溶液去除不溶物。

B) 在 60°C 将三水乙酸钠 (0.224 g) 加到盐酸羟胺 (0.114) 的水 (25 ml) 溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 用水 (10 ml) 洗涤盛 B 的容器, 将洗液加入混合物, 然后在 $60-65^\circ\text{C}$ 搅拌 3 / 4 小时后在 4°C 冷却 2 - 3 小时。滤去固体, 用工业甲基化酒精 / 水 (1 : 1, 5 ml) 洗涤, 在 P_2O_5 上真空干燥, 得到顺式和反式异构体 CBZ-L-Phe-L-PheOx 的混合物。

步骤 f

将 CBZ-L-Phe-L-PheOx (500 mg) 溶解在

甲醇 (1 3 0 m l) , 过滤除去不溶物。用 N_2 清洗盛有甲醇的肼的容器, 加入 1 0 % 钯的活性炭催化剂 (8 3 m g) 。向封闭容器通入 H_2 3 0 分钟。过滤除去催化剂, 保持温度低于 3 0 $^{\circ}C$, 在真空下旋转蒸发除去溶剂。用高真空泵进一步除溶剂, 残留物在 P_2O_5 上真空干燥得到 L - 苯丙氨酰基 - L - 苯丙氨酰基肼 (L - P h e - L - P h e O x) 。

实施例 6 L - 丙氨酰基 - D - 苯丙氨酰基缩氨基脲

步骤 a 和 b

按实施例 4 的步骤 a 和 b 的方法制备 D - P h e - O , N - 二甲基羟肼酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 C

A) 将 D - P h e - O , N - 二甲基羟肼酸酯的三氟乙酸盐 (5.000g) 溶于无水 T H F (2 0 m l) 中。保持温度低于 3 0 $^{\circ}C$ 慢慢加入 N - 甲基吗啉 (1 . 5 7 8 g) , 并将所得混合物冷却至 0 $^{\circ}C$ 。

B) 在搅拌下, 将 C B Z - L - A l a (3 , 4 6 3 g) 溶解在无水 T H F (4 0 m l) 中, 混合物冷却至 - 1 0 $^{\circ}C$ 。在 - 1 0 $^{\circ}C$ 用 5 分钟时间, 加入异丁基氯甲酸酯 (2 , 1 5 8 g) , 用 1 0 分钟时间加 N - 甲基吗啉 (1 , 5 7 8 g) , 将反应混合物在 - 1 0 $^{\circ}C$ 再搅拌 1 0 分钟。

C) 将两种溶液 A 和 B , 在 - 1 0 $^{\circ}C$, 用 1 0 分钟时间混合, 然后将混合物的温度升至室温, 连续搅拌 3 小时。混合物冷却至 0 $^{\circ}C$, 加入 3 - 二甲基氨基丙胺 (1 , 5 8 5 g) , 反应物用水 (5 0 m l) 急冷。加入乙酸乙酯 (5 0 m l) , 分离有机相, 水相用乙酸乙酯萃取 (2 $\times$ 3 0 m l) 。合并有机相, 依次用 (a) 水 (5 0 m l) 和饱和 N a C l 水溶液

(1 0 m l) , (b) KHCO_3 水溶液 (5 % , 5 0 m l) 、 (c) HCl 水溶液 (0.5N , 5 0 m l) 和 (d) 水 ($3 \times 5 0 \text{ m l}$) 洗涤。保持温度低于 $3 0^\circ\text{C}$, 真空下, 旋转蒸发除去溶剂。固体由乙酸乙酯重结晶, 得到 $\text{CBZ-L-Ala-D-Phe-O, N-二甲$ 基羧酸酯。

步骤 d

将 $\text{CBZ-L-Ala-D-Phe-O, N-二甲}$ 基羧酸酯 (2 . 9 克) 溶于无水 THF (2 . 5 m l) 中。在氮气下将溶液冷却至 $-7 0^\circ\text{C}$ 。在 $-7 0^\circ\text{C}$, 用 1 . 0 分钟时间加入二异丁基氢化铝的 THF 溶液 (1 M , 3 7 m l) , 并再连续搅拌 1 0 分钟。

在 $-3 0^\circ\text{C}$, N_2 清洗的条件下, 将反应物在搅拌下急冷到饱和的罗谢尔盐溶液 (1 2 5 m l) 和 THF (1 2 5 m l) 中, 然后将混合物加温至室温。加入乙酸乙酯 (1 0 0 m l) , 分离有机相。用乙酸乙酯 ($2 \times 3 0 \text{ m l}$) 萃取水相, 合并有机相并用水 ($3 \times 1 0 0 \text{ m l}$) 洗涤。过滤反应混合物, 保持温度低于 $3 0^\circ\text{C}$, 在真空下, 旋转蒸发除去溶剂。加入新鲜乙酸乙酯, 然后除去而得到 CBZ-L-Ala-D-Phe 醛。

步骤 e

A) 将 CBZ-L-Ala-D-Phe 醛 (1 . 2 g) 溶于 THF (2 0 m l) 和工业甲基化酒精 (2 0 m l) 中并加热至 $5 0^\circ\text{C}$ 。

B) 将热的氨基脲盐酸 (1 . 8 g) 的水 (1 5 m l) 溶液加到热的 KHCO_3 (1 . 5 g) 的水 (1 5 m l) 溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 所得混合物在 $5 0^\circ\text{C}$ 搅拌 4 小时。保持温度低于 $3 0^\circ\text{C}$, 在真空下旋转蒸发除去溶剂。在残留物中加入水 (

50 ml)，过滤收集固体，用水：工业甲基化酒精（1：1）洗涤，在 P_2O_5 上真空干燥，得到CBZ-L-Ala-D-PheSc。

步骤 f

将CBZ-L-Ala-D-PheSc（750 mg）溶于甲醇（50 ml）中，过滤除去不纯物。用 N_2 清洗盛甲醇溶液的容器，加入10%钨的活性炭（100 mg）催化剂。向封闭系统通入 H_2 90分钟。过滤除去催化剂，保持温度低于30℃，在真空下，旋转蒸发除去溶剂，在 P_2O_5 上真空干燥，得到L-丙氨酰基-D-苯丙氨酰基缩氨基脲（L-Ala-D-PheSc）。

实施例7 L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基缩氨基脲

步骤 a 和 b

按实施例4的步骤a和b的方法制备L-Phe-O，N-二甲基羟肟酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 c

A) 在室温搅拌下，将L-Phe-O，N-二甲基羟肟酸酯的三氟乙酸盐（7.95 g）溶于无水DMF（30 ml）中。保持温度低于30℃，用5分钟时间加入N-甲基吗啉（2.49克），所得混合物冷却至0℃。

B) 在搅拌下，将CBZ-OBZ-L-Tyr（10 g）溶解在无水DMF（60 ml）中，混合物冷却至-10℃。在-10℃，用5分钟时间加入异丁基氯甲酸酯（3.39 g）。用10分钟时间加入N-二甲基吗啉（2.49克），将反应混合物在-10℃再搅拌10分钟。

c) 在-10℃，用15分钟时间将溶液A加到溶液B中，然后将混

合物温度升至室温，并连续搅拌3小时。混合物冷却至0℃，用5分钟时间加入3-二甲基氨基丙胺(2.52g)。然后加入水(50ml)和乙酸乙酯(50ml)，分离上层有机相，并依次用(a)水(50ml)，(b)KHCO₃水溶液(5%，50ml)，(c)HCl水溶液(0.5M，50ml)和(d)水(3×50ml)洗涤。保持温度低于30℃，真空下旋转蒸发除去溶剂。残留物由异丙醇中重结晶，得到CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe-O，N-二甲基羧肟酸酯。

步骤 d

将CBZ-OBZ-L-tyr-L-Phe-O，N二甲基羧肟酸酯(1.012g)溶于无水THF(10ml)中。在-70℃,N₂的条件下用10分钟时间加入二异丁基氢化铝的THF溶液(1M，8.5ml)，再连续搅拌10分钟。

在-60℃N₂下，将反应物搅拌急冷到甲醇(20ml)和罗谢尔盐溶液(30ml)中，然后使混合物加温至室温。加入水(50ml)和乙酸乙酯(50ml)，分离有机相并用水(200ml)洗涤。过滤反应混合物，保持温度低于30℃，在真空下，旋转蒸发除去溶剂，然后加入新鲜乙酸乙酯，旋转蒸发除去，在P₂O₅上真空干燥所得固体，得到CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe醛。

步骤 e

A)将CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe醛(400mg)溶于工业甲基化酒精(20ml)和THF(10ml)中，并加热至60℃。

B)将氨基脲盐酸(600mg)在水(5ml)中的热溶液加到

KHCO_3 (500mg) 在水 (5 ml) 中的热溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 在 60°C 将所得混合物搅拌 2 小时。保持温度低于 30°C , 在真空下旋转蒸发除去溶剂, 残渣用水急冷。过滤收集固体, 用水和工业甲基化酒精洗涤, 在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 $\text{CBZ}-\text{OBZ}-\text{L}-\text{Tyr}-\text{L}-\text{PheSc}$ 。

步骤 f

将 $\text{CBZ}-\text{OBZ}-\text{L}-\text{Tyr}-\text{L}-\text{PheSc}$ (770 mg) 溶于无水 THF (70 ml) 中, 过滤并将甲醇 (20 ml) 加入滤液中。用 N_2 清洗盛缩氨基脲的容器, 加入 10% 钯的活性炭催化剂 (100 mg)。在封闭系统中通入 H_2 几小时。过滤除去催化剂, 蒸发除去溶剂, 得到 $\text{L}-\text{酪氨酰基}-\text{L}-\text{苯丙氨酰基缩氨基脲}$ ($\text{L}-\text{Tyr}-\text{L}-\text{PheSc}$)。

实施例 8 $\text{L}-\text{丙氨酰基}-\text{L}-\text{环己基丙氨酰基缩氨基脲}$

步骤 a

A) 搅拌下, 将 O, N-二甲基羟胺盐酸 (8.51 g) 加到无水 DMF (75 ml) 中, 保持温度低于 30°C 用 5 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (8.8 g)。产生一种白色沉淀, 将混合物冷却至 0°C 。

B) 将 $\text{N}-t-\text{Boc}-\text{L}-\text{Cha}$ (22.5 g) 溶于无水 THF (200 ml) 中并冷却至 -10°C 。保持温度在 -10°C , 用 5 分钟时间加入异丁基氟甲酸酯 (11.94 g)。保持温度在 -10°C , 用 10 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (8.8 g) 并再连续搅拌 10 分钟。

C) 在 -10°C 用 15 分钟时间将悬浮液 A 加到悬浮液 B 中, 使混合物加温至室温并搅拌 4 小时。将混合物冷却到 0°C , 用 5 分钟时间加

入3-二甲基氨基丙胺(8.6 g),再连续搅拌5分钟。加入水(200 ml)和乙酸乙酯(100 ml),分离水相,用乙酸乙酯(2×100 ml)萃取。合并的有机相依次用(a)水(100 ml)和饱和NaCl水溶液(20 ml)、(b)KHCO₃水溶液(5%, 100 ml), (c)HCl水溶液(0.5 N, 100 ml)和(d)水(3×100 ml)洗涤。保持温度低于30℃,在真空下旋转蒸发除去溶剂,得到N-t-Boc-L-Cha-O, N-二甲基羟肟酸酯。

步骤 b

在0℃下将N-t-Boc-L-Cha-O, N-二甲基羟肟酸酯(26 g)和三氟乙酸(65 ml)搅拌5分钟,然后使混合物的温度升至室温,连续搅拌3小时。保持温度低于30℃,真空下旋转蒸发除去过量的三氟乙酸。将乙醚加入残留物以生成溶液,真空下除去乙醚。重复用醚处理以得到黄色油状的L-Cha-O, N-二甲基羟肟酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 c

a)将L-Cha-O, N-二甲基羟肟酸酯的三氟乙酸盐(17 g)溶于无水THF(50 ml)中。保持温度低于30℃,用5分钟时间加入N-甲基吗啉(3.95 g),将混合物冷却至0℃。

B)搅拌下将CBZ-L-Ala(9.25 g)溶于无水THF(100 ml)中,将混合物冷却到-10℃。在-10℃,用5分钟时间加入异丁基氯甲酸酯(5.35 g),用10分钟时间加入N-甲基吗啉(3.95 g),反应混合物在-10℃再搅拌10分钟。

C) 在-10℃用15分钟时间将溶液A加到溶液B,然后使混合

物温度升至室温，连续搅拌 3 小时。将混合物冷却到 0℃，用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (3.98 g) 并再连续搅拌 5 分钟。然后加入水 (150 ml) 和乙酸乙酯 (150 ml)，分离水相并用乙酸乙酯 (2×75 ml) 萃取。合并的有机相依次用 (a) 水 (125 ml)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%、125 ml)，(c) HCl 水溶液 (0.5 N, 125 ml) 和 (d) 水 (3×125 ml) 洗涤。保持温度低于 30℃，旋转蒸发除去溶剂。加入新鲜乙酸乙酯并蒸发除去，得到 $\text{CBZ-L-Ala-L-Cha-O, N-二甲基羧酸酯}$ 。

步骤 d

将 $\text{CBZ-L-Ala-L-Cha-O, N-二甲基羧酸酯}$ (7.22 g) 溶于无水 THF (160 ml) 中并在 N_2 下冷却到 -70℃。在 -70℃， N_2 条件下，用 20 分钟加入二异丁基氢化铝的 THF 溶液 (1 M, 86 ml)，再连续搅拌 20 分钟。

在 0℃， N_2 条件下将反应物搅拌急冷到罗谢尔盐溶液 (400 ml) 中，然后使混合物加温至室温。加入乙酸乙酯 (150 ml)，搅拌混合物 5 分钟。过滤反应混合物，分离有机相并用乙酸乙酯 (2×50 ml) 萃取水相。合并的有机相用水 (3×200 ml) 洗涤，并在最后的洗液中加入饱和 NaCl 溶液。保持温度低于 30℃ 旋转蒸发除去溶剂，得到油状的 CBZ-L-Ala-L-Cha 醛 。

步骤 e

A) 将 CBZ-L-Ala-L-Cha 醛 (8 g) 溶于工业甲基化酒精 (50 ml) 并加热至 50℃。

B) 将氨基脲盐酸 (3.0 g) 在水 (25 ml) 中的热溶液加到

KHCO_3 (2.67 g) 在水 (25 ml) 中的热溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 在 50°C 搅拌所得混合物 3 小时。使混合物冷却并在 4°C 放置过夜。保持温度低于 30°C , 旋转蒸发除去大部分工业甲基化酒精, 在残留物中加入乙酸乙酯 (50 ml)。分离有机相, 并依次用 (a) 水 (30 ml)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%, 30 ml), (c) HCl 水溶液 (0.5 N, 30 ml) 和 (d) 水 ($2 \times 50 \text{ ml}$), 如有必要加入饱和 NaCl 水溶液以助分离。保持温度低于 30°C 旋转蒸发除去溶剂, 固体由异丙醇和乙醚中重结晶, 得到 CBZ-L-Ala-L-ChaSc 。

步骤 f

将 CBZ-L-Ala-L-ChaSc (900 mg) 溶于甲醇 (30 ml), 在 N_2 条件下, 加入 10% 钯的活性炭催化剂 (100 mg)。在封闭系统中通入 H_2 6 小时, 过滤除去催化剂。保持温度低于 30°C 旋转蒸发除去溶剂。固体用乙醚洗涤并在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 $\text{L-丙氨酰基-L-环己基丙氨酰基缩氨基脒}$ 。

实施例 9 L-丙氨酰基-L-亮氨酰基缩氨基脒

步骤 a

A) 在室温, 搅拌下, 将 O, N-二甲基羟胺盐酸 (9.17 克) 溶于无水 DMF (110 ml) 中。保持温度低于 30°C , 用 5 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (9.51 g)。产生沉淀, 将混合物冷却至 0°C 。

B) 将 N-t-Boc-L-Leu (23.3 g) 溶于无水 THF (220 ml) 并冷却到 -10°C 。保持温度在 -10°C , 用 5 分钟时间加入 异丁基氯甲酸酯 (12.90 g)。保持温度在 -10°C ,

用 10 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (9.51 g) 并再连续搅拌 10 分钟。

C) 在 -10°C 用 15 分钟时间, 将悬浮液 A 加到悬浮液 B 中。使混合物加温至室温并搅拌 3 小时。将混合物冷却到 0°C , 并用 5 分钟时间加入 3-二甲基氨基丙胺 (9.13 g), 再搅拌 5 分钟。加入乙酸乙酯 (110 ml) 和水 (110 ml), 分离有机相并依次用 (a) 水 ($2 \times 100 \text{ ml}$)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%, 100 ml)、(c) HCl 水溶液 (0.5 N, 100 ml) 和 (d) 水 ($3 \times 100 \text{ ml}$) 洗涤。保持温度低于 30°C , 旋转蒸发除去溶剂, 得到 N-t-Boc-L-Leu-O, N-二甲基羧氨酸酯。

步骤 b

将 N-t-Boc-L-Leu-O, N-二甲基羧氨酸酯 (23.4 g) 和三氟乙酸 (165 ml, 冷却至 0°C) 在室温一起搅拌 18 小时。保持温度低于 30°C 旋转蒸发除去过量的三氟乙酸。在残留物中加入乙醚以生成溶液, 然而真空下除去醚。重复这步骤直到在 4°C 产生结晶, 得到 L-Leu-O, N-二甲基羧氨酸酯的三氟乙酸盐。

步骤 C

A) 在室温, 搅拌下, 将 L-Leu-O, N-二甲基羧氨酸酯的三氟乙酸盐 (1.8 g) 溶于无水 THF (10 ml) 中。将混合物冷却至 0°C 并用 5 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (0.635 g)。

B) 将 CBZ-L-Ala (1.40 g) 溶于无水 THF (20 ml) 中并冷却到 -10°C 。在 -10°C 用 5 分钟时间加入异丁基氯甲酸酯 (0.869 g), 用 10 分钟时间加入 N-甲基吗啉 (0.635 g), 在 -10°C 再搅拌反应混合物 10 分钟。

C) 在 -10°C 用 15 分钟时间, 将溶液 A 加到溶液 B, 然后使混合物温度升至室温, 并连续搅拌 18 小时。将混合物冷却至 0°C , 加入 3-二甲基氨基丙胺 (0.64 g), 然后将反应混合物用水 (25 ml) 和乙酸乙酯 (25 ml) 骤冷。分离水相, 用乙酸乙酯 ($2 \times 25 \text{ ml}$) 萃取。合并的有机相依次用 (a) 水 (50 ml) 和饱和 NaCl (助分离)、(b) KHCO_3 水溶液 (5%, 30 ml), (c) HCl 水溶液 (0.5 N, 30 ml) 和 (d) 水 ($3 \times 30 \text{ ml}$) 洗涤。保持温度低于 30°C , 旋转蒸发除去溶剂, 固体在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 CBZ-L-Ala-L-Leu-O, N-二甲基羧酸酯。

步骤 d

将 CBZ-L-Ala-L-Leu-O, N-二甲基羧酸酯 (1.9 g) 溶于无水 THF (40 ml) 并在 N_2 下冷却到 -70°C 。在 -70°C , N_2 条件下用 10 分钟时间加入二异丁基氢化铝的 THF 溶液 (1 M, 29.5 ml), 再连续搅拌 10 分钟。

在 -60°C N_2 条件下, 将反应混合物搅拌骤冷到甲醇 (50 ml) 和罗谢尔盐溶液 (50 ml) 中, 加入水 (50 ml) 和乙酸乙酯 (50 ml), 过滤混合物, 分离水相, 并用乙酸乙酯 ($2 \times 50 \text{ ml}$) 萃取。合并的有机相用水 ($3 \times 100 \text{ ml}$) 和助分离的饱和 NaCl 水溶液洗涤。保持温度低于 30°C , 旋转蒸发除去溶剂, 加入新鲜的乙酸乙酯, 然后旋转蒸发除去, 得到 CBZ-L-Ala-L-Leu 醛。

步骤 e

A) 将 CBZ-L-Ala-L-Leu 醛 (6.7 g) 溶于工业甲

基化酒精 (5 0 m l) 中, 并加热至 5 0 °C。

B) 将 KHCO_3 (9 g) 在水 (3 0 m l) 中的热溶液加到氨基脲盐酸 (1 0 . 8 g) 在水 (3 0 m l) 中的热溶液中。

C) 将溶液 B 加到溶液 A 中, 在 5 0 °C 将混合物搅拌 3 小时, 并在室温放置过夜。滤出固体, 用工业甲基化酒精: 水 (1 : 1 , 2 0 m l) 洗涤。在 P_2O_5 上真空干燥, 得到 C B Z - L - A l a - L - L e u S c 。

步骤 f

将 C B Z - L - A l a - L - L e u S c (9 5 0 m g) 溶于甲醇 (1 0 0 m l) 中, 过滤除去不溶物, 再加入甲醇 (5 0 m l) 并用 N_2 清洗容器。在 N_2 条件下加入 1 0 % 钯的活性炭催化剂 (1 0 0 m g), 然后在封闭容器中通入 H_2 1 3 5 分钟。过滤除去催化剂, 保持温度低于 3 0 °C 旋转蒸发除去溶剂。在 P_2O_5 上真空干燥固体, 得到 L - 丙氨酰基 - L - 亮氨酰基缩氨基脲 (L - A l a - L - L e u S c) 。

实施例 1 0 直接亲合色谱基质 - E C H - Sepharose 4B-L-Ala-PheSc 活性位点的制备

将 E C H - Sepharose^R 4B (3 g 湿重) 在烧结玻璃滤器上用 NaCl 水溶液 (0 . 5 M , 2 4 0 m l) 洗涤, 再用水 (1 2 0 m l) 洗涤。将 N - 乙基 - N' - (3 - 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺盐酸 (E D C) 溶于水中, 得到 0 . 1 M E D C 溶液, 通过加入盐酸或固体乙酸钠将 E D C 溶液的 p H 值稳定到 p H 4 . 5 。将按实施例 1 制备的 L - A l a - L - P h e S c (1 0 m g) 溶于甲醇 (4 0 0 μ l) 中, 并与 E D C 水溶液 (0 . 1 M , 2 . 4 m l) 一起加到洗涤过的凝胶中。在 2 0 °C 慢慢搅动混合物 1 小时, 如有需要, 再将 p H 值调到

pH 4.5, 在 20℃ 连续搅动 23 小时。然后加入 L-甘氨酸使最终浓度为 1 M, 再连续搅动 3 小时。亲合色谱凝胶依次用甲醇水溶液 (50%, 60 ml)、水 (60 ml) 和使用缓冲液 (60 ml) 洗涤并在 4℃ 贮存到需要时。

实施例 11-18 亲合色谱基质的制备

将按实施例 2-9 所描述的方法而制备的各种二肽衍生物偶合到类似于实施例 10 所述的凝胶基体上, 分别得到实施例 11 到 18 的亲合色谱凝胶。

实施例 19 亲合色谱

将从英国 Powell & Scholefield 得到的, 在“使用”缓冲液 (磷酸钠 (50 mM); EDTA (1 mM); 乙二醇 (33%), pH 6.8) 和二硫苏糖醇 (2 mM) 或半胱氨酸 (4 mM) (1.5 ml) 中的喷雾干燥番木瓜胶乳 (0.03 g 蛋白质) 加到实施例 10-18 的亲合色谱基质的每个 1 ml 柱上。至少使用以下五种不同洗脱液中的一种:

洗脱液 A: 在 pH 4.5, 含有柠檬酸钠 (50 mM) 和 EDTA (1 mM), 的乙二醇水溶液 (33%) 中的羟基乙基二硫化物 (100 mM); 洗脱前, 将柱平衡过夜。

洗脱液 B = 在含有柠檬酸钠 (50 mM) 和 EDTA (1 mM), pH 4.5 的乙二醇水溶液 (33%) 中的 2, 2'-二吡啶二硫化物 (30 mM); 洗脱前, 将柱平衡过夜。

洗脱液 C = 在含有柠檬酸钠 (50 mM) 和 EDTA (1 mM), pH 4.5 的乙二醇水溶液 (33%) 中的甲基吡啶二硫化物 (30 mM); 洗脱前, 将柱平衡过夜。

洗脱液 D = 在含有氢氧化钠 (5 0 m M) 和 E D T A (2 5 m M) ,
用乙酸调到 p H 4 . 5 的乙二醇水溶液 (3 3 %) 中的汞
撒利酸 (1 0 m M) ; 连续洗脱。

洗脱液 E = 在含有乙酸钠 (5 0 m M , p H 4 . 5 的乙二醇水溶液 (3 3 %) 中的 H g C l ₂ (1 0 m M) , 连续洗脱。

通过在标准 Mono S (pharmacia) 色谱后检测洗脱材料中 A₂₈₀ 痕量
来确定每种洗脱液的洗脱能力。结果综述于下表 1 :

表 1
木瓜凝乳蛋白酶的结合和洗脱

抑制肽	基质 实施例号	洗脱液				
		A	B	C	D	E
L-Ala-L-PheSc	10	-	ND	+	+	+
L-Phe-L-PheSc	11	-	+	+	+	+
L-Phe-L-PheMo	12	-	+	ND	ND	ND
L-Phe-D-PheSc	13	-	ND	+	+	+
L-Phe-L-PheOx	14	+	+	ND	ND	ND
L-Ala-D-PheSc	15	+	ND	ND	+	ND
L-Tyr-L-PheSc	16	+	ND	ND	+	ND
L-Ala-L-ChaSc	17	+	ND	ND	ND	+
L-Ala-L-LeuSc	18	+	ND	ND	ND	+

+ 结合并洗脱的木瓜凝乳蛋白酶

- 不结合和 / 或不洗脱的木瓜凝乳蛋白酶

N D 未测定

实施例 20 木瓜凝乳蛋白酶的纯化

(i) 将由英国 Powell & Scholefield 得到的市售番木瓜的喷雾干燥胶乳 (1 g) 与蒸馏水 (5 ml) 搅拌 1 小时, 在 4 °C 以 9000 × g 速率离心 30 分钟除去不溶物。去掉沉淀, 用 20 分钟时间以盐酸 (1 M) 调节上层清液的 pH 值到 1.8。在 4 °C 连续搅拌 60 分钟, 如有必要, 再将 pH 值调到 1.8。

(ii) 在 4 °C 以 9000 × g 的速率离心混合物 30 分钟, 去掉沉淀。

(iii) (a) 用 10 分钟时间滴加 NaOH (5 M) 将上清液的 pH 值调到 6.8。在溶液中呈现红紫—兰色。

(b) 将所得红紫—兰色溶液对 10 体积的“使用”缓冲液 (磷酸钠 (50 mM); EDTA (1 mM); 乙二醇 (33%, pH 6.8)) 彻底渗析, 更换 3 次缓冲液。将渗析液以 4000 × g 的速率离心 10 分钟, 将含木瓜凝乳蛋白酶滗析的上层清液中的蛋白含量调到约 30 mg/ml。通过加入半胱氨酸至最终浓度为 4 mM 以活化木瓜凝乳蛋白酶溶液, 并在 0 °C 放置 15 分钟。

(iv) 将活化的木瓜凝乳蛋白酶溶液, 加到偶合到 L-Ala-L-PheSc 的 ECH-Sepharose^R 的 8 ml 柱 (按实施例 10 所述制备) 上, 该柱预先以使用缓冲液, 按 36 ml / cm² / hr 的流速平衡过。柱依次用使用缓冲液 (2 柱床体积)、柠檬酸钠 (50 mM) 的乙二醇 (33%) 水溶液 pH 4.5 (2 柱床体积) 和乙酸钠水溶液 (50 mM)、EDTA (25 mM)、汞黧利 (10 mM) 的乙二醇 (33%) 水溶液, pH 4.5 (2 柱床体积) 洗涤, 然后在室温保温 2 小时。

(v) 用含汞黧利 (10 mM) 的乙酸钠 (50 mM) 水溶液 (3 柱

床体积)洗脱木瓜凝乳蛋白酶,并收集馏分(4 ml)。对洗脱馏份中的酶活性按上述测定其对BAPNA的比活性。

合并活性馏份,并通过在Mono-SHR[®] 10/10 (Pharmacia)柱上的阳离子交换色谱,使用“起始”磷酸盐缓冲液(Na^+ (50 mM)、EDTA (1 mM)、 NaN_3 (0.01%)、pH 7.2)和“极限”磷酸盐缓冲液(Na^+ (800 mM)、EDTA (1 mM)、 NaN_3 (0.01%) pH 7.2)进一步纯化。用2.7 mM/ml的盐梯度和2 ml/min的流速进行洗脱。收集馏份(4 ml),通过测量在280 nm的吸收度而确定蛋白浓度以及通过BAPNA水解测定酶活性。

合并含木瓜凝乳蛋白酶的馏份,并对蒸馏水和去离子水或EDTA水溶液(1 mM)进行彻底渗析并冷冻干燥以贮存。

实施例 2.1 木瓜凝乳蛋白酶的纯化——BAPNA测定结果

i) 将由英国Powell & Scholefield得到的市售番木瓜喷雾干燥乳胶(1 g)在20℃在水(5 ml)中搅拌60分钟。在4℃,以9000 × g速率离心30分钟除去不溶物。去掉沉淀,用20分钟时间滴加盐酸(1 M)将上清液的pH值调到1.8。在4℃搅拌混合物15分钟,5分钟后检测pH值,如有必要,重新调节。

ii) 在4℃以9000 × g的速率离心30分钟以除去沉淀。

iii) a) 搅拌下滴加氢氧化钠水溶液(5 M)将上清液调到pH 7.0。在4℃以9000 × g的速率离心30分钟以除去沉淀。

b) 将所得上清液加到Mono S HR 10/10 (Pharmacia)的阳离子交换柱上,该交换柱已用含EDTA (1 mM),的pH 7.2的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaHPO}_4$ (50 mM Na^+)水溶液(缓冲液A)予平衡过。样品使用后,用缓冲液A淋洗(2 ml/min)交换柱,

直到 A_{280} 回到零。然后将梯度 ($2.7 \text{ mM Na}^+/\text{ml}$) 到 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0.80 M Na^+) 的溶液加到柱上, 收集 4 ml 馏分。测定馏份中对 BAPNA 的活性。按免疫法测定, 大的木瓜凝乳蛋白酶的峰是在 $0.17 - 0.28 \text{ M Na}^+$ 之间洗脱。合并在这范围的对 BAPNA 的活性馏份, 并加入乙二醇到 $33\% (\text{v/v})$ 。全部其它的馏份, 包括在以后的洗脱 ($0.47 - 0.59 \text{ Na}^+$) 的木瓜蛋白酶 III 峰在内的对 BAPNA 活性的馏份都弃去。

(iv) 将偶合到 L-Ala-L-Phe-Ser 的 ECH-Sepharose^R 的柱 (按实施例 10 所述制备) (15 ml 柱床体积) 用 $\text{pH } 6.8$, 含 EDTA (1 mM) 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM Na^+) 的乙二醇 ($33\% \text{ v/v}$) 水溶液 (使用缓冲液) 洗涤 (39 ml/hr / cm^2)。通过加入半胱氨酸基 (最终浓度 4 mM) 活化木瓜凝乳蛋白酶 (如上), 在 0°C 放置 15 分钟。然后加到柱上接着加入 60 ml 使用缓冲液。

v. 然后加入 $\text{pH } 4.5$, 含 HgCl_2 (10 mM) 的乙酸钠 (50 mM) 缓冲液 (45 ml)。收集全部 5 ml 的馏份。分析馏份中对 BAPNA 的活性。

合并被柱滞留并通过含 HgCl_2 缓冲液洗脱的含活性峰的馏份并再加入到 Mono S 柱上。用缓冲液 A 洗涤柱, 然后用 7 柱床体积的含半胱氨酸基 (4 mM) 的缓冲液 A 加到柱上。停止流动 30 分钟以使汞由酶中置换。然后再开始流动, 在使用上述达 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0.80 M Na^+) 的梯度以前, 柱子再用缓冲液 A 洗涤。合并对 BAPNA 活性的馏份, 加入半胱氨酸基 (最终浓度为 4 mM)。合并液在 0°C 放置 15 分钟。

将Chelex树脂 (Bio Rad, UK 0.5g)装入柱中, 用缓冲液 A 洗涤。含木瓜凝乳蛋白酶的合并液流经Chelex柱, 然后彻底渗析入 E D T A (1-m M) 水溶液中并冷冻干燥。

木瓜凝乳蛋白酶的纯化过程综述于表 2

表 2
木瓜凝乳蛋白酶的纯化

	蛋白 (mg)	BAPNA 活性* (单位)	BAPNA 比活性* (单位mg ⁻¹)	产额 ^x (%)	纯化 (倍数)
喷雾干燥胶乳	441	493,712	1,120	100	1
酸处理	361	238,636	661	48	0.59
阳离子交换色谱	58	133,748	2,306	27	2.06
Sepharose-L- Ala-L-PheSc	27.5	112,475	4,090	23	3.65
阳离子交换色谱	11	44,687	4,062	9	3.63
Chelex	10.5	43,301	4,124	9	3.68

x 产率是按对BAPNA的活性 (也是对木瓜蛋白酶和番木瓜蛋白酶Ⅲ的基质)

* BAPNA测定方法2

实施例 2 2 木瓜凝乳蛋白酶的制备—在兔体内培养的特异 I g G 抗体
按实施例 2 1 所述制备的纯木瓜凝乳蛋白酶, 在用前, 按Zucker等 (1 9 8 5 , 同上文) 所述方法慢慢地进行羧甲基化。在兔体内培

养对木瓜凝乳蛋白酶的抗血清，通过肌肉注射 360μ 、
完全助剂中的羧甲基化蛋白，二周后，皮下注射在不完全助

100μ g 蛋白。按Heide和Schwick (1978, 同上文) 所述B₂
酸铵分馏将1 g G由血清中部分纯化。接着渗析到含NaCl (0.14
M), pH 7.3的磷酸钠水溶液 (10 mM) 中。

实施例 23 木瓜凝乳蛋白酶的纯化和木瓜凝乳蛋白酶和 P P I V 的 免疫定量

(i-iii) 按实施例 21 (i-iiia) 中所述，将由英国Powell & Schole-
field得到的市售番木瓜喷雾干燥胶乳进行制备并将pH值调到1.8。

(iv) 将偶合到L-Ala-L-PheSc的ECH-Sepharose^R的
柱 (15 ml 柱床体积) (按实施例 10 所述制备) 按实施例 21 (i-
v) 进行洗涤。由pH 1.8处理的最后上清液渗析入含有EDTA
(1 mM) 的在乙二醇 (33% v/v) 中的NaH₂PO₄/Na₂HPO₄
(50mM Na⁺) 的水溶液 (pH = 6.8) (使用缓冲液) 中，以4000
xg的速率离心10分钟，加入二硫苏糖醇 (最终浓度为2 mM) 在20
℃下活化上层清液20分钟。然后加到亲合柱 (39 ml / hr /
cm²)，接着加入60 ml 使用缓冲液。将含有EDTA (1 mM)
和甲基吡啶二硫化物 (30 mM) 的，pH 4.5的柠檬酸钠缓冲液
(50 mM, 15 ml) (按Salih等人在Biochem J. (1987), 247,
181-193所述制备) 加到柱上。停止流动，将含有二硫化物的缓冲液在
20℃下在柱上放置过夜 (18小时)。

(v) 随着加入45 ml 的含甲基吡啶二硫化物的相同缓冲液，再开
始流动，接着加入30 ml 使用缓冲液。收集全部馏份 (5 ml)。

测定馏份中对BAPNA的活性。合并被柱滞留并在含甲基吡啶

二硫化物的缓冲液洗脱的含活性峰的馏份，并将它加到 ($40\text{ ml} / \text{hr} / \text{cm}^2$) Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia) 柱 (80ml 柱床体积) 上，该柱已用 EDTA (1 mM) 在乙二醇 ($33\% \text{ v} / \text{v}$) 中的水溶液平衡过。使用 300 ml 这种缓冲液继续进行色谱分析。通过 ΔA_{271} 监测馏份 (8 ml) 并测定对 BAPNA 的活性。

合并含有对 BAPNA 的活性峰的馏份 (接着有另一个 A_{271} 峰) 并加到 Mono S HR 10/10 阳离子交换柱上，并按实施例 21 中的 iiib 所述进行。合并对 BAPNA 的活性馏份。

将喷雾干燥胶乳和从 pH 1.8 处理，亲和色谱和阳离子交换色谱中回收的材料，通过上文所述的单一散射免疫扩散法分析存在的 PPIV 量。使用同样的方法定量木瓜凝乳蛋白酶，它是使用实施例 22 所述的方法制备的在兔体内培养的木瓜凝乳蛋白酶的单一特异抗体。使用本文所述方法纯化，并通过单一散射免疫扩散表明没有 PPIV 和 PPIII 的木瓜凝乳蛋白酶绘制木瓜凝乳蛋白酶的标准曲线。结果示于表 3 中。

表 3

木瓜凝乳蛋白酶的纯化和木瓜凝乳蛋白酶和PPIV的定量

	蛋白 (mg)	BAPNA 比活性* (单位mg ⁻¹)	木瓜凝乳蛋白酶 (mg)	PPIV (总 蛋白量的%)
喷雾干燥胶乳	468	1,000	144	18.7
酸处理	157	1,433	92	<0.1
Sepharose- L-Ala-L- PheSC	24	4,000	28	+
阳离子交换色 层柱	15	3,533	14	+

+ = 未检出

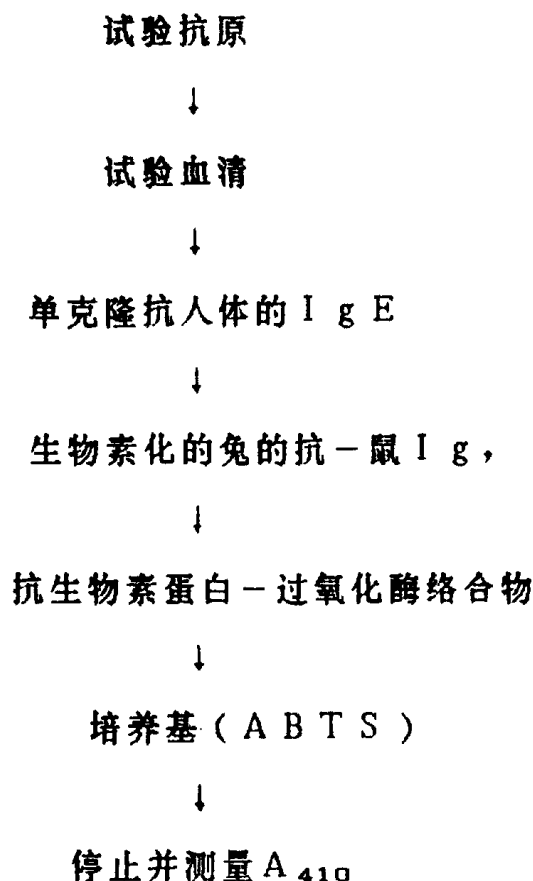
× B A P N A 测定方法 2

实施例 2 4 木瓜凝乳蛋白酶的变应性研究

由美国 3 M Diagnostic Systems 购得 4 0 个人体血清样品。这些样品已经过公知称为Chymofast的商用测试，测定其对商用木瓜凝乳蛋白酶，Chymodiactin[®]的IgE。其中 2 0 个样品定为Chymofast阳性而另外 2 0 个为阴性。4 0 个样品是“盲目”取来的，利用生物素-抗生物素蛋白体系，采用改性固相连接酶的免疫吸着测定法 (E L I S A)，进一步测试其对Chymodiactin[®]、PPIII、PPIV和对纯化木瓜凝乳蛋白酶（按本文所述方法纯化并通过单一免疫扩散表明没有 P P I V 和

P P I I I) 的天然获得的 I g E 抗体, 过程综述如下:

微滴定板用以下涂层:



在有效期 (expiry) 内使用 Chymodiactin^R, PPIV 是按本文所述纯化而 PPIII 是按 Buttle 和 Barrett (1984, 同上文) 纯化的。全部抗原在使用前, 按 Buttle 和 Barrett (1984, 同上文) 所述用碘乙酸 (10mM) 适度羧甲基化而使之失活。

通过用 100 μ l 在碳酸钠缓冲液 (0 . 0 5 M , p H 9 . 6) 中的试验抗原 (10 μ g / m l) 保温微滴板中的每个孔而使微滴板的孔以试验抗原涂层。然后在其后的步骤中使用马血清供体 (Donor horse serum) (4%) 以降低非特定的结合。将试验血清 (稀释至 1 / 20

) 在 P B S (0 . 1 % Tween, 2 % 马血清, 1 . 0 m M E D T A , 5 0 μ g / m l 肝素; p H 7 . 2) (1 0 0 μ l / 孔) 中, 在 3 7 $^{\circ}$ C 保温 4 小时, 接着用单克隆抗人体的 I g E (按 Kemeny & Richards 在 J. Immunol. Methods (1988), 108, 105 中所述制备的 - 1 μ g / m l , 1 0 0 μ l / 孔) 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 3 小时; 然后和生物素化的兔抗鼠免疫球蛋白 (由丹麦 Dakopatts 得到, 1 μ g / m l , 100 μ l / 孔) 在室温, 保温过夜。和抗生物素蛋白 - 过氧化酶 (10 μ l / m l , 100 μ l / 孔) 在 37 $^{\circ}$ C 将孔保温 3 0 分钟, 加入在缓冲液 (1 . 0 . 0 m M 柠檬酸, 2 0 0 m M N a ₂ H P O ₄ , p H 4 . 2 , 用 1 μ l / m l H ₂ O ₂ 活化) 中的基质 [2 , 2 ' - 连氨基双 (3 - 乙基苯噻唑磺酸)] 并将孔在室温保温 3 0 分钟。通过加入 1 0 0 μ l / 孔的 1 0 0 m M 柠檬酸 : 0 . 01 % N a N ₃ 而停止反应, 使用 Micro ELISA 读数机 (Dynatech) 测定每个孔在 4 1 0 n m 的吸收度。在 0 . 0 7 5 - 4 . 8 n g / m l (2 . 4 n g I g E = 1 国际单位 I g E) I g E 范围内测定 I g E 标准。使用 Enzfitter 程序 (Leather barrow, R. J. 1985, Enzfitter for IBM. PC, Elsevier-Biosoft, 68 Hills Road, Cambridge CB2 1LA, 英国) 计算直接对四种抗原制剂中每一种的 IgE 浓度, 这四种抗原是 Chymodiactin[®]、P P I I I、P P I V 和按实施例 2 3 所述制备的木瓜凝乳蛋白酶。

所测试的 4 0 个血清样品中有 2 6 个含有抗 Chymodiactin[®] 的 IgE 抗体, 由对 Chymodiactin[®] 最活性的 12 个样品, 得到的对 P P I I I、P P I V 和木瓜蛋白酶的值示于下面表 4 中。平均值和标准误差值都是由 9 个测定中得到的。

可以看到, 含抗 Chymodiactin 抗体的 1 2 个血清样品中, 只有 2

个抗木瓜蛋白酶有主要的 I g E 响应，而对 P P I I I 和 P P I V 的抗体估计约为检出的有关 I g E 的 7 5 %。

表 4

在含有对 chymodiactin^R 的 IgE 抗体的血清样品中的特异 IgE 浓度 (IU/ml)

样品	PPIV		PPIII		木瓜凝乳蛋白酶		木瓜凝乳	
	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	总量	蛋白酶(%)
1	19.9	1.7	18.8	1.7	8.2	1.3	46.9	18
2	5.1	0.3	4.0	0.1	3.2	0.4	12.3	26
3	5.9	0.4	2.7	0.3	1.2	0.3	9.8	12
4	1.8	0.1	2.3	0.2	1.7	0.1	5.8	29
5	3.4	0.2	2.0	0.2	1.6	0.3	7.0	23
6	3.1	0.2	0.3	0.01	0.3	0.03	3.7	8
7	2.6	0.2	1.6	0.2	0.9	0.2	5.1	18
8	2.0	0.1	1.1	0.1	1.3	0.2	4.4	30
9	1.5	0.2	0.3	0.07	1.7	0.2	3.5	49
10	1.0	0.1	0.3	0.09	0.5	0.1	1.8	28
11	3.6	0.4	1.4	0.2	0.7	0.07	5.7	12
12	0.6	0.1	0.4	0.09	2.3	0.2	3.3	70
总量	50.5		35.2		23.6		109.3	平均
								22

实施例 2 5 木瓜凝乳蛋白酶和 P P I V 的混合物对

鸡胰素的抑制

按实施例 2 3 所述纯化木瓜凝乳蛋白酶并用 B A P N A 作基质，通过以 E - 6 4 的活性位点滴定而进行标定 (Z u c k e r 等人， 1 9 8 5， Biochem. Biophys. Acta, 828, 196-204) 按上述提纯的 P P I V 也用 E - 6 4 滴定，为适应这方法而使用偶氮酪蛋白作基质。

按 Anastasi 等人所述 (1 9 8 3， Biochem.J.211, 129-138) 纯化鸡胰素型 2 并且用木瓜蛋白酶滴定来标定，该木瓜蛋白酶已先用 E - 6 4 滴定过。

按 Rowan 等人 (1988, 同上文) 的方法进行偶氮酪蛋白水解的测定，除了在加入基质以前，在 4 0 °C 予保温酶 1 5 分钟并加入抑制剂以外，其它都相同。

取两套 9 个试管，在每个试管中加入 1 2 5 μ l 含有 4 m M E D T A 和 1 6 m M 半胱氨酸，p H 6 . 8 的 0 . 4 M 磷酸钠缓冲液。加入木瓜凝乳蛋白酶和 P P I V，改变其比率，使其最后的蛋白酶浓度为 1 0 0 n M。在一套试管中加入鸡胰素到 1 μ M 最终浓度，而在另一套中加入同样体积的水。然后予保温试管并测定偶氮酪蛋白的水解活性。

酶混合物对鸡胰素在偶氮酪蛋白水解的影响是通过在没有鸡胰素存在时，同样酶混合物所产生的活性抑制百分数来表示，结果示于表 5。

表 5

木瓜凝乳蛋白酶和 P P I V 混合物对

鸡胰素的抑制百分率

PPIV (nM)	木瓜凝乳蛋白酶 (nM)	A ₃₆₆ -鸡朊素	A ₃₆₆ +鸡朊素	% 抑制
100	0	0.092	0.094	0
80	20	0.158	0.102	35.4
70	30	0.191	0.088	54.0
60	40	0	0.06	80.0
50	50	0.347	0.058	83.3
40	60	0.428	0.066	84.5
30	70	0.543	0.028	94.8
20	80	0.588	0.033	94.4
0	100	0.732	0.008	98.9

可以看出，鸡朊素的抑制程度与PPIV的浓度成反比。

实施例 26 在 pH 2.2 - 1.2 的酸沉淀纯化木瓜凝乳蛋白酶

(i) 将从英国 Powell & Scholefield 得到的市售喷雾干燥胶乳，用蒸馏水稀释到 20% (w/v) 并搅拌 1 小时。在 4℃，以 9000 × g 的速率离心 30 分钟除去不溶物。弃去沉淀，通过在 4℃ 搅拌下以 40 μl/min/ml 速度，滴加盐酸 1M 以降低上清液的 pH 值。使用一种连接电极的辐射计 (Radiometer) (Type GK 2401C) 连续监测混合物的 pH 值，该电极是用 pH 4.01 和 pH 1.09 的标准缓冲液 (Radiometer, 25℃) 校正过的。在 pH 2.2 处，以 0.2 pH 单元的间隔滴加酸，使达到 pH 1.2 时停止滴加，在 4℃ 睡

续搅拌时，pH保持恒定。然后取出等分部分（相当于原始溶液的10 ml）并贮存。对余下的溶液中继续加酸，直到达到下一个pH间隔。

i i)全部样品在4℃，以9000×g的速率离心30分钟并除去沉淀。

i i i)通过滴加(400 μl/min)NaOH(1M)而将每个上清液的pH值调到pH6.8。每个样品再次以9000×g的速率离心30分钟以除去任何另外的沉淀。

在另一个酸沉淀实验中，是在pH1.8，25℃条件下进行的。

按上述通过单一散射免疫扩散，测定每个最后上清液中的对BAPNA的活性以及PPIV和本发明的木瓜凝乳蛋白酶的存在量。结果示于表6，表明在4℃，pH1.8和1.8以下时，由酸沉淀得到的PPIV去除量达到<0.1%的总蛋白量。在25℃pH1.8时的沉淀，达到<0.5%。

表 6

条件*	温度 (°C)	蛋白 (mg)	BAPNA 活性 (单位×10 ⁵)	BAPNA 比活性* (单位mg ⁻¹)	木瓜凝乳蛋白酶 (mg)	PPIV(总蛋白 的%)
起始溶液	-	946	15.8	1670	208	20.30
pH 2.2	4	848	9.5	1120	231	7.56
pH 2.0	4	865	9.1	1052	230	1.20
pH 1.8	4	796	9.0	1131	199	0.09
pH 1.6	4	828	7.7	930	224	0.06
pH 1.4	4	869	7.8	898	225	0.05

续表 6

条件	温度 (°C)	蛋白 (mg)	BAPNA 活性 (单位×10 ⁵)	BAPNA 比活性* (单位mg ⁻¹)	木瓜凝乳蛋白酶 (mg)	PPIV(总蛋白 的%)
pH 1.2	4	784	7.1	906	166	0.03
pH 1.8	20	925	8.3	897	269	0.43

× B A P N A测定方法 2

实施例 2 7 在羊体内培养单一特异 I g G 抗体的制备

按实施例 2 1 制备的纯木瓜凝乳蛋白酶, 在使用前, 按Zucker等人((1985), 同上)所述方法, 缓慢地进行羧甲基化, 并将它渗析到含 NaCl(0.14M), pH7.3的磷酸钠水溶液(10 mM)中。通过肌肉注射 100 μg 的在Freund的完全助剂中的羧甲基化蛋白, 在羊体内培养对木瓜凝乳蛋白酶的抗血清, 一个月后, 以同样方式注射 50 μg。按Heide和Schwick(1978, 同上文)所述, 用硫酸铵分馏从抗血清中部分纯化 I g G。接着渗析到含 NaCl(0.14 M) pH 7.3 的磷酸钠水溶液(10 mM)中。

用类似方法制备对木瓜蛋白酶, 番木瓜蛋白酶Ⅲ和番木瓜蛋白酶Ⅳ的抗体 I g G 制剂。

将单个羧甲基化的抗原, 按照制造厂的指南, 分别偶合到商品名为Zetaffinity(Anachem)的柱上, 该柱用 pH 7.3, 含有 NaCl(0.14 M)的磷酸钠水溶液(10 mM)平衡过。可能污染或交

叉反应的抗体通过流经这些柱子都由 I g G 制剂中吸收掉，因此最终的 I g G 制剂与其各自的抗原进行沉淀素反应，但与不同的抗原没有交叉反应。使用 p H 11.5 的二乙胺水溶液 (0.05 M) 并迅速在磷酸盐缓冲液中再平衡，可以再生连结抗原的柱以便再次使用。

以这种方法制备对木瓜凝乳蛋白酶、P P III、P P I V 和木瓜蛋白酶的 I g G 抗体的单一特异制剂，它可以通过上文所述的单一散射免疫扩散而用于定量测定每一种抗原。

实施例 28 木瓜凝乳蛋白酶的纯化—在 p H 1.5 时的酸沉淀

i) 由美国 Siebels 得到的市售番木瓜喷雾干燥胶乳 (20 g) 在去离子水和蒸馏水 (预先冷却到 4℃, 250 ml) 中，在 0℃ 搅拌 60 分钟。在用 p H 4.01 和 1.09 的标准缓冲液 (Radiometer, 25℃) 校正的带电极的辐射计 (Type GK 2401C) 连续监测 p H 值期间，以 10 μl / min / ml 的速度滴加 HCl (1 N)，将混合物的 p H 值调到 p H 1.5。当达到 p H 1.5 时，使 p H 值稳定 10 分钟，在这期间，如有必要可再调节 p H 值。

ii) 将混合物在 4℃，以 12000 × g 的速率离心 30 分钟，并弃去沉淀。

iii) (a) 用 p H 7.01 的标准缓冲液 (Radio meter, 25℃) 校正的辐射计电极连续监测 p H 值期间，通过以 10 μl / min / ml 的速度滴加 NaOH (1 M)，将上清液的 p H 值调到 7.0。当 p H 值达到 7.0 时，使 p H 值稳定 10 分钟，在这期间如有必要可再调节。在 4℃，将该混合物以 12000 × g 的速率离心 30 分钟，弃去沉淀。

(b) 上清液在 4℃ 对 30 体积的去离子水和蒸馏水进行彻底渗析。

在 12 小时期间更换二次。

将渗析的溶液在 S - Sepharose 高性能 35 / 100 柱 (Pharmacia) 上通过阳离子交换色谱再纯化。对每一个实验使用的最大量为 3 g 蛋白质 (由 A_{280} 测定)。交换柱在 4℃ 用 EDTA 水溶液 (1 mM) 予平衡。在样品用过后, 柱用 EDTA 水溶液 (1 mM) 按 10 ml / min 流速洗涤交换柱直到 A_{280} 回到零。

将到 0.5 M K^+ 的梯度液 (0.175 mM K^+ / ml) 加到柱上, 收集全部的馏分 (25 ml)。测定峰馏分中对 BAPNA 的活性。

合并具有对 BAPNA 最高比活性 (在 0.17 和 0.22 M K^+ 之间洗脱) 的木瓜凝乳蛋白酶的馏份。合并的木瓜凝乳蛋白酶在 4℃ 对 30 体积的去离子水和蒸馏水进行彻底的渗析, 在 12 小时间隔内更换 5 次。渗析液冷冻干燥并在 -20℃ 贮存。

在许多情况下, 要重复整个纯化过程。使用上述单一散射免疫扩散和例 27 中所述的在羊体内培养的抗体测定本发明的木瓜凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、PPIII 和 PPV 的存在量。使用上述的 BAPNA 方法 1 确定对 BAPNA 的活性和用碘乙酸滴定活性位点。纯化进程由表 7 所示的平均值来总结。

表 7

	总蛋白量 (mg)	BAPNA 比活性 (单位·mg ⁻¹)	活性位点 (%)	木瓜凝乳 蛋白酶 (%总蛋白)	PPIV (%总蛋白)	PPIII (%总蛋白)	木瓜蛋白酶 (%总蛋白)
原始物质 pH 1.5 透析	10203 8168 4351	572 461 674	30 28 42	25 30 59	22 0.1 0.1	14 14 24	5 <0.1 <0.1
阳离子交换 色谱	948	1079	72	100	0.1	<0.1	<0.1
透析	767	1098	89	100	0.1	<0.1	0.1
冷冻干燥	ND	905 +	ND	ND	ND	ND	ND

ND 未测

+ 蛋白以总干重量计算

实施例29 木瓜凝乳蛋白酶的纯化—在pH 1.5时酸沉淀以及亲和色谱

i-iii) 将由美国Siebels得到的市售番木瓜喷雾干燥的胶乳(50g),按实施例28(i-iiia)中所述进行制备并调节到pH 1.5。上清液在4℃,对30体积的去离子水和蒸馏水彻底渗析,在12小时期间,更换2次。

iv) 将偶合到L-Ala-L-PheSc(按实施例10中所述制备)的E.C.H-Sephrose^R的柱(350ml柱床体积)用pH 4.5的含乙酸钠(50mM)的乙二醇(33%v/v)水溶液平衡过夜,然后用含EDTA(1mM),pH 6.8的在乙二醇(33%v/v)中的NaH₂PO₄/Na₂HPO₄(50mM Na⁺)水溶液(使用缓冲液)平衡。

使用0.2μm孔径的滤器过滤渗析的上清液(上面的),并加入乙二醇到33%(v/v)。检测溶液的pH值,如有必要,调到pH 7.0。加入新制备的L-半胱氨酸水溶液(200mM)到4mM的浓度。将溶液很好地混合并在4℃放置15分钟。然后将溶液在4℃,以最高达40ml/hr/cm²的流速加到亲和柱。用10个柱床体积的使用缓冲溶液洗涤该柱。

v) 用3个柱床体积的pH 4.5的在含有乙酸钠(50mM)的乙二醇(33%v/v)的HgCl₂(10mM)水溶液洗脱木瓜凝乳蛋白酶,并收集25ml的馏分。合并含有对BAPNA的活性的馏分并在-S-Sephrose的高性能的35/100柱(Pharmacia)上的阳离子交换色谱进一步纯化。柱在4℃用EDTA水溶液(1mM)予平衡。在样品使用后,将柱用EDTA水溶液(1mM)以10ml

／min 的流速洗涤直到 A_{280} 回到零。将 3 个柱床体积的 pH 7.2 的含 EDTA (1 mM) 和 L-半胱氨酸 (500 mM) 的 K_2HPO_4/KH_2PO_4 水溶液 (50 mM K^+) 加到柱上，停止流动 30 分钟。再将 3 个柱床体积的新制备的半胱氨酸缓冲液加到柱上并停止流动 30 分钟。再用 6 个柱床体积的半胱氨酸缓冲液洗涤该柱，然后将柱用 pH 7.2 的含 EDTA (1 mM) 的 K_2HPO_4/KH_2PO_4 水溶液 (50 mM K^+) 再平衡。

将梯度 (0.175 mM K^+ / ml) 到 0.5 M K^+ 的溶液加到柱上，并收集全部 25 ml 的馏分。测定峰馏分的对 BAPNA 的活性。在 0.2 - 0.25 M K^+ 之间洗脱的第一峰是木瓜凝乳蛋白酶。在约 0.45 M K^+ 洗脱的第二峰是番木瓜蛋白酶 III。

合并具有对 BAPNA 的最高比活性的木瓜凝乳蛋白酶的馏份。合并的木瓜凝乳蛋白酶在 4℃，对 30 体积的去离子水和蒸馏水彻底渗析，在 12 小时期间更换 5 次。

由阳离子交换柱上洗脱的木瓜凝乳蛋白酶用半胱氨酸缓冲液活化，因而对因氧化而失活是敏感的。为了基本上防止或减少因氧化而造成活性酶的失活，将馏份收集在含有连四硫酸钠 (200 mM) 的试管中，使得在每份馏份中最后的 $Na_2S_4O_6$ 的浓度为 5 mM。另外，将合并的木瓜凝乳蛋白酶在氮气的条件下对水渗析，该水已通过氮气条件下以 0.1 l / min 流速向密封的容器鼓泡通入氮气 30 分钟而去除氧气。

最后将渗析液冷冻干燥而在 -20℃ 贮存。

许多情况下要重复整个纯化步骤，纯化的进程 (如实施例 28 中所述测定) 由表 8 所示的平均值来总结。

表 8

	总蛋白量 (mg)	BAPNA 比活性 (单位·mg ⁻¹)	活性位点 (%)	木瓜凝乳 蛋白酶 (%总蛋白)	PPiV (%总蛋白)	PPiII (%总蛋白)	木瓜蛋白酶 (%总蛋白)
原始物质	25508	572	30	25	22	14	5
pH 1.5	20421	401	28	30	<0.1	14	<0.1
渗析	10877	674	42	59	<0.1	24	<0.1
Sepharose- L-Ala-L-							
PheSc	1673	1446	86	66	<0.1	13	<0.1
阳离子交换 色谱	951	1625	100	100	<0.1	<0.1	<0.1
渗析	828	1743	100	ND	ND	ND	ND
冷冻干燥	ND	1320 ⁺	ND	ND	ND	ND	ND

ND 未测定

⁺ 按总干重量计算的蛋白

实施例30 木瓜凝乳蛋白酶的纯化—在pH 1.5 酸沉淀和亲合色谱
i-iii) 将由美国, Siebels得到的市售番木瓜喷雾干燥的胶乳按实施例 28 中所述制备并调到 pH 1.5 的处理、渗析和在 S-Sepharose^R 上的阳离子交换色谱。

iv) 合并具有对 BAPNA 的最高比活性的木瓜凝乳蛋白酶的馏分加入乙二醇到 33% (v/v)。加入新鲜制备的 L-半胱氨酸水溶液 (200 mM) 到浓度为 4 mM, 按实施例 29 (iv) 中所述, 将溶液加到偶合到 L-Ala-L-Phe-Ser 的 ECH-Sepharose^R 柱上。

v) 用 3 个柱床体积的在 pH 4.5 含有乙酸钠 (50 mM) 的乙二醇 (33% v/v) 中的 HgCl₂ (10 mM) 水溶液洗脱木瓜凝乳蛋白酶, 并收集 25 ml 馏份。合并含有对 BAPNA 活性的馏份, 并在 4℃ 对 30 体积的去离子水和蒸馏水进行彻底渗析, 在 12 小时期间更换 5 次。将渗析液冷冻干燥并在 -20℃ 贮存。

纯化进程 (按实施例 28 中所述测定) 概述于表 9。

表 9

	总蛋白 (mg)	BAPNA 比活性 (单位·mg ⁻¹)	活性位点 (%)	木瓜凝乳 蛋白酶 (%总蛋白)	PIV (%总蛋白)	PIII (%总蛋白)	木瓜蛋白酶 (%总蛋白)
原始材料	28795	632	31	27	25	16	6
pH 1.5	23257	458	24	28	<0.1	13	<0.1
透析	8319	916	57	75	0.2	25	<0.1
阳离子交换 色谱	3102	1103	72	91	<0.1	<0.2	<0.1
Sephrose- L-Ala-L-							
PheSc	947	1245	89	ND	ND	ND	ND
透析	858	1587	88	100	ND	<0.1	<0.1
冷冻干燥	972	1265 +	69	ND	<0.1	ND	ND

ND 未测定

+ 按总干重量计算的蛋白

实施例 3 1

在同一天使用 B A P N A 测定方法 1 和 2 分析两个本发明的木瓜凝乳蛋白酶制剂。按总干重量计算蛋白。木瓜凝乳蛋白酶制剂 A 是按实施例 2 8 所述的纯化方法制备的。木瓜凝乳蛋白酶制剂 B 是按实施例 2 9 所述的纯化方法制备的。(最后的馏份收集在连四硫酸钠中)。重复三次的测定结果示于表 1 0。

表 1 0

木瓜凝乳蛋白酶 制剂	B A P N A 比活性 (单位 m g ⁻¹)	
	测定方法 1	测定方法 2
A	8 5 5	2 2 2 7
B	1 2 6 1	3 5 9 1

实施例 3 2

按实施例 2 9 所述纯化木瓜凝乳蛋白酶,并按该例所述在氮气下渗析的木瓜凝乳蛋白酶冷冻干燥并在 - 2 0 ℃ 贮存。冷冻干燥的木瓜凝乳蛋白酶在 3 7 ℃ 和 p H 6 . 0 时对 B A P N A (1 m M) 的比活性为每毫克 1 3 4 5 单位。

按下所述,制备 4 3 . 7 5 g 本体溶液,以制备 1 0 0 小玻璃瓶的含有纯化的木瓜凝乳蛋白酶的组合物。将本体溶液在整个过程中保持在 4 - 1 2 ℃。

将 L - (+) 的半胱氨酸盐酸的一水合物 (1 6 6 m g) 加到约 3 0 g 水中以便注射时在最后体积中具有 2 2 m M 的浓度。用 N a O H (1 M) 或 H C l (0 . 1 M) 调节溶液的 p H 调到 p H 5 . 0 - 5 . 5 。将半胱氨酸溶液加到纯化的木瓜凝乳蛋白酶 (3 5 8 m g) 中,使得在最后体积中具有 1 1 0 0 0 单位 / m l 的浓度。用 N a O H (1

M) 或 HCl (0.1 M) 调节搅拌溶液的 pH 值到 pH 5.9 - 6.1, 并用水配到 43.75 g 用于注射。将溶液通过二个串联的 0.2 微米孔径的滤器以进行消毒。将 0.4 g 等分的溶液装入 100 × 5 ml 的小玻璃瓶中, 塞紧玻璃瓶, 在减压下冷冻干燥除去水, 将装有冻干产品的小瓶在真空下密封。

每个小瓶装含有 3.27 mg 木瓜凝乳蛋白酶和 1.52 mg 半胱氨酸钠盐酸的白色非晶形粉末 (分别标定为 4000 单位和 8 微摩尔, 允许过量 10%)。组合物在使用前一般通过加入 2 ml 水而直接重新配制便于注射的注射溶液, 该溶液标称含有 4000 单位的木瓜凝乳蛋白酶和 4mM 的 L-半胱氨酸。