

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/435

A61K 38/17

G01N 33/68

A61P 37/08



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00816534.3

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1205223C

[22] 申请日 2000.11.27 [21] 申请号 00816534.3

[30] 优先权

[32] 1999.12.1 [33] DE [31] 19957904.0

[86] 国际申请 PCT/EP2000/011776 2000.11.27

[87] 国际公布 WO2001/040266 德 2001.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.31

[71] 专利权人 默克专利有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 R·祖克 O·克伦威尔

H·菲比希

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 具有减弱 IgE 反应活性的昆虫毒性
过敏原及其生产方法

[57] 摘要

本发明涉及重组昆虫毒性过敏原和产生它们的特异方法。所说的过敏原按照它们是否以与天然一致或不同的折叠(构象)来产生而变化。具有不会在天然状态下出现的折叠的该蛋白具有减弱的 IgE 反应活性或过敏原性,并因此可在过敏的免疫治疗方面用作治疗试剂。

ISSN 1000-84274

1. 分离基本上纯的过敏原性或 IgE 反应活性减弱的重组黄蜂毒性过敏原抗原 5 的方法，其特征在于：

- 5 - 在细菌细胞内以不溶的包涵体形式产生所述过敏原蛋白，
 - 在不加入还原剂的情况下，将所说的不溶性聚集体变性，并且
 - 通过在酸性缓冲液中透析将该变性产物转化成可溶的、不同折叠构象的单体过敏原并得以分离。

2. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于该变性反应使用氯化胍盐进行。

- 10 3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于在透析步骤中使用 pH 在 3.5 和 6.5 之间的缓冲液。

4. 权利要求 1 到 3 中任何一项所述的方法，其特征在于使用黄胡蜂属 (*Vespula*) 的种和 *Paravespula* 种的过敏原。

- 15 5. 权利要求 4 所述的方法，其特征在于所述黄胡蜂属的种为常见黄胡蜂 (*Vespula vulgaris*) 或德国黄蜂。

6. 可通过权利要求 1 - 5 中任何一项所述方法获得的重组黄蜂毒性过敏原抗原 5。

7. 含有权利要求 6 所述的重组过敏原和相应的辅剂及赋形剂的药物制剂。

- 20 8. 可通过权利要求 1 - 3 中任何一项所述方法获得的黄蜂毒性过敏原抗原 5 在制备用于对黄蜂毒性过敏原过敏的患者进行特异性免疫治疗或脱敏的药物中的用途。

具有减弱 IgE 反应活性的昆虫毒性过敏原及其生产方法

本发明涉及重组昆虫毒性过敏原和其生产方法，此处所说的过敏原可根据所用的生产方法的不同通过与天然一致的或与天然相反的折叠(构象)来加以区分。

与天然分子一致的折叠形式的应用为对过敏者(尤其是昆虫毒性过敏者)进行单过敏原区分诊断(胞外或胞内)。

与天然相反的折叠形式可作为具有低副作用的特异性免疫治疗的治疗剂使用。因此，这些重组折叠突变体比天然产物有着更安全的治疗效果。该方法以可以在药物生产所必需的条件下(GMP)进行生物技术生产的方法进行设计。

昆虫叮咬过敏主要是由黄蜂和蜜蜂引起的，并可能导致严重的系统性症状或甚至是潜在的致命性过敏性反应(Müller, U.R., 昆虫叮咬过敏, Gustav Fischer Verlag; 1990)。引发1型过敏的物质是昆虫毒液的蛋白、糖蛋白或多肽。在毒液被注入之后，这些过敏原与结合在敏感人群柱状细胞表面的IgE分子反应。如果结合有Fc ϵ R1的该类型IgE分子通过过敏原彼此交联，就会导致效应细胞释放出介质(例如组胺、白三烯)和细胞素，并因此出现相应的临床症状。

除了该蜂毒肽以外，透明质酸酶和磷脂酶A2也是蜜蜂蜂毒的致敏要素(Habermann, E., 科学, 1972, 177: 314-322)。在黄蜂中，主要的酶活性过敏原同样也是透明质酸酶(其与蜜蜂蜂毒的透明质酸酶非常相似)(Hoffmann, D.R., 过敏临床免疫学杂志, 1986, 78: 337-343)和磷脂酶A1。最重要的黄蜂毒性主过敏原是抗原5，从中没有检测到酶活性(King等, 生物化学, 1978, 17: 5156-5174)。所有所说的过敏原都已经用分子生物学术语进行了鉴定并且相应的cDNA也已被克隆(Fang等, PNAS, 1988, 895-899; Soldatova等, FEBS, 1993, 145-149; Kuchler等, 欧洲生物化学杂志, 1989, 184: 249-254)。用这些cDNA序列，有可能生产出用于过

敏诊断和治疗的重组过敏原(Scheiner 和 Kraft, 过敏, 1995, 50: 384-391)。

联系到本发明, 主过敏原抗原 5 尤其重要, 因为本发明使用该分子作为实施例。它是一个非糖基化的蛋白, 大小约 25 kDa。其主要序列包含 8 个半胱氨酸残基, 表明其有四个二硫键(Hoffman, D. R., 过敏临床免疫学杂志, 1993, 92: 707-716)。昆虫毒性过敏有效治疗的一个传统方法是特异性免疫治疗或脱敏作用(Müller, U. R., 昆虫叮咬过敏, Gustav Fischer Verlag; 1990)。在此, 天然过敏原提取物以逐渐增加的剂量对病人进行皮下注射。然而, 该方法需要承担过敏反应或甚至过敏性休克的风险。因为会有强烈的反应, 尤其是在昆虫叮咬脱敏作用时, 所以当前只对住院病人使用这种处理方法。

通过重组方法生产的过敏原会尤其适合对昆虫叮咬过敏的治疗。由通过重组方法产生的高纯度过敏原制成的特定鸡尾酒(优选与患者的具体过敏方式相匹配)可以代替天然过敏原来源的提取物(Scheiner 和 Kraft, 1995)。IgE 表位被特异性删除而不损伤对治疗至关重要的 T-细胞表位, 这样的变异重组过敏原给人们提供了这样一个现实的前景, 即用这种类型的重组过敏原可能会产生更安全的脱敏作用(Schramm 等, 免疫学杂志, 1999, 162: 2406-2414)。

从在大肠杆菌中进行的异源表达我们知道, 大部分真核蛋白并不采用'天然'的构象或仅有一小部分是。这些错误折叠的结果常常是这些蛋白的不溶。这尤其可在含半胱氨酸的蛋白中看到(Kuchler 等, 欧洲生物化学杂志, 1989, 184: 249-254)。已有关于抗原 5 的报道, 具体地说, 就是在细菌中的表达产生了不具有天然构象的不溶性聚集物(Monsalve 等, 蛋白质表达纯化, 1999, 16(3): 410-416)。这种类型的不溶性聚集物既不能用于诊断也不能用于治疗。

为了在真核表达系统, 例如酵母或昆虫细胞中进行研究, 经常会制备这种在大肠杆菌中不溶的蛋白(Monsalve 等, 蛋白质表达纯化, 1999, 16(3): 410-416; Soldatova 等, 过敏临床免疫学杂志, 1998, 101: 691-698)。然而, 真核表达系统的不利之处在于其特别有可能产生高糖基化(Grobe 等, 欧洲生物化学杂志, 1999, 263: 33-40)、蛋白水解降解过程和相对

少的产量 (Glover 和 Hames (主编), 1995, 表达系统, IRL 出版社, 牛津-纽约-东京)。因此这种类型的蛋白通常不适于医药诊断和治疗意义上的变态反应用途。

本发明所述方法的具天然构象的产物可优选用于过敏症 (尤其是昆虫叮咬过敏) 的胞外和胞内诊断。该与天然一致的折叠形式可以以已建立的方法用于 IgE 抗体的检测。

另一方面, 本发明所产生的突变体 (其特点为根本没有或仅部分具有 IgE 反应活性的构象) 可在特异性免疫治疗制剂中作为低变应原组分来进行使用。按本发明, 上、下文中所用的术语 “低变应原的” 是指, 由于减弱的 IgE 反应所引起的减弱至没有, 优选从 5 % 到 95 %, 尤其是从 20 % 到 85 % 的减弱过敏原性 (与天然过敏原相比)。

本发明是一种方法, 用此方法可在细菌 (大肠杆菌) 中产生重组过敏原。第一个纯化步骤是对不溶性蛋白聚集物进行相当可观的富集。然后在不添加还原剂的情况下对这些聚集物进行变性。根据接下来的透析条件的不同, 可以得到不同的折叠形式。至关重要的一点是, 这些分子是单体的且是可溶的。第一个可溶的折叠突变体具有可与天然过敏原相比的 IgE 反应活性并可因此用于诊断目的。各种类型的产品可通过用含半胱氨酸的溶液进行透析得到。

另一个替代的可溶性折叠突变体在结构上与天然过敏原不同, 并且可由 IgE 反应活性的减弱或缺乏来加以区别。为此, 这种类型的突变体适于推动改良的免疫治疗。按本发明所述, 用酸性缓冲液 (优选 pH 在 3.5 和 6.5 之间, 具体在 4.0 和 5.5 之间) 透析可得到这种类型的低变应原产品。

因此本发明也涉及具有减弱的 IgE 反应活性或过敏原性特征的重组昆虫过敏原。按本发明所述, 与天然过敏原相比这些蛋白的过敏原性可减少 95 %。

具体来说, 本发明涉及相应的重组黄蜂昆虫过敏原, 尤其是来自常见黄胡蜂 (*Vespula vulgaris*) 和德国黄蜂 (*Vespula germanica*) 的重组黄蜂昆虫过敏原。

本发明涉及分离基本上纯的重组昆虫毒性过敏原的方法, 其特征为该

过敏原蛋白在细菌细胞内以不溶的“包涵体”形式产生，所说的不溶性聚集体被变性，并且该变性产物通过透析转化成可溶的、不同折叠构象的单体过敏原并得以分离。所说的变性反应优选使用不添加还原剂的氯化胍盐(guanidinium chloride)进行。

具体来说，本发明涉及分离具有减弱过敏原性或 IgE 反应活性的重组昆虫毒性过敏原的方法，其中透析使用酸性缓冲液，优选 pH 在 4.5 和 5.0 之间的醋酸钠缓冲液，进行。

然而，本发明也涉及分离具有正常过敏原性或 IgE 反应活性的重组昆虫毒性过敏原的方法，其中透析使用含半胱氨酸的溶液进行。

本发明也涉及可由上述或下述相应方法获得的重组黄蜂毒性过敏原。

本发明又涉及含有具有减弱或消除 IgE 反应活性的相应重组过敏原和相应辅剂和赋形剂的药物制剂。

最后，本发明涉及可由上述或下述相应方法获得的昆虫毒性过敏原在胞内和胞外昆虫叮咬过敏诊断上的用途。

本方法详述如下：

作为实施例，*Vespula vulgaris* 黄蜂毒性过敏原抗原 5 (Ves v 5) 和德国黄蜂黄蜂毒性过敏原抗原 5 (Ves g 5) 被克隆至表达载体 pSE420 并被转入 K12 细菌菌株 M15 pREP4。图 1 为该方法的流程图。

该重组过敏原使用该菌株的预培养物接种表达培养液来进行生产。表达以 IPTG 诱导，在 LB 培养基中以有限供氧 (90 rpm/min) 在三角瓶中 37°C 进行。表达 5 小时以后，离心 (5000 x g, 10 分钟, 20°C) 收获该细菌。将此细胞重悬于缓冲液 (50 mM tris/HCl, 25% (w/v) 蔗糖, pH 8.0) 中，添加溶菌酶 (10 µg/g 湿重) 进行细菌消化。然后添加同样体积的去污剂溶液 (0.2 M NaCl, 1% (w/v) DDC, 1% (w/v) 诺乃洗涤剂 P40)。随后，该消化液以超声波处理 (置冰上 3 分钟, 130 瓦, 脉冲 0.5 秒)。既然该表达产物基本上是不溶性聚集体的形式 (包涵体)，因此可由其高密度通过离心 (3000 x g) 将它们从大部分剩余的组份 (细胞壁片段、核糖体等) 中分离出来。用含去污剂的溶液 (1% Triton X-100) 通过三个连续的洗涤

步骤进行进一步的纯化。随后，添加变性缓冲液（6 M 氯化胍盐，20 mM tris/HCl, pH 8.0）并于室温振荡 2 小时对纯化的包涵体进行消化。

为了分离 IgE 反应活性的折叠形式，该变性批次被转入透析管（消化限度 12-14 kDa）并于室温对 100 倍体积的半胱氨酸溶液（5 mM 半胱氨酸）搅动透析 12 小时。然后再对蒸馏水透析以除去半胱氨酸。

为获得具有减弱 IgE 反应活性的构象，第一次要对 20 mM 醋酸钠缓冲液（pH 5.0）透析。然后再对蒸馏水进行透析。在去除以后，通过离心，该水溶的过敏原从沉淀的聚集物中分离出来。该上清含有所要的可溶性重组过敏原。也可以使用其它的缓冲能力从 3.5 到 6.5，优选从 4.0 到 5.5 的酸性缓冲液代替醋酸钠缓冲液。这种类型的缓冲系统的例子在文献中有充分的描述。

用两种方法产生的沉淀下来的重组过敏原可按同样的方案进行再变性及处理。这可明显地增加产量。

在透析步骤之后，产物纯度约为 95%。此基本的昆虫毒性过敏原进一步的纯化步骤是用例如 Source S（Pharmacia, Freiburg, 德国）的阳离子交换层析（缓冲液 pH 7.2）和凝胶过滤。除了除去极少的高分子量和低分子量的杂质以外，凝胶过滤也用来进行脱盐。

基于下面的特性对产品的质量进行控制，其以抗原 5 概括于下表：

n-抗原 = 天然抗原

特性	具有天然 IgE 反应活性的折叠	具有减弱 IgE 反应活性的折叠
SDS-PAGE(非还原条件)中的表观分子量	25kDa	26-27kDa
Source S 的洗脱盐浓度	320mM NaCl	400mM NaCl
蛋白酶 V8 剪切	15kDa 片段+肽	肽<10kDa
抗原 5 特异性的单克隆抗体	可用 8E3, 1E11 检测	仅可用 8E3 检测
与过敏反应患者血清的 IgE 反应频率	>95%	<10%
致敏能力	与 n-抗原 5 相似	>10x 小于 nAg5

本发明所述的方法适于所有类型的昆虫毒性过敏原。所使用的纯化技术和重组克隆及表达技术是本领域技术人员所知的和可用的，并且可用已知的相似方法替换之。

图 1: 本方法流程图

rAg5 = 重组抗原 5

