

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109077.2

[51] Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月1日

[11] 公开号 CN 1742019A

[22] 申请日 2003.12.18

[21] 申请号 200380109077.2

[30] 优先权

[32] 2003.1.21 [33] EP [31] 03001242.1

[86] 国际申请 PCT/EP2003/014507 2003.12.18

[87] 国际公布 WO2004/065414 英 2004.8.5

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.21

[71] 申请人 比奥梅产品及贸易股份公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 内丁·莫蒂斯 萨拜因·斯图沃尔

玛吉特·福克 伯吉特·林哈特

玛丽亚-特里萨·克劳斯

彼得·瓦伦特 迪特里希·克拉夫特

鲁道夫·瓦伦塔

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 10 页 序列表 5 页
附图 12 页

[54] 发明名称

低过敏原性嵌合抗原的制备方法

[57] 摘要

本申请公开了一种过敏原衍生的低过敏原性嵌合抗原的制备方法，通过 a) 第一步将过敏原分裂成至少两部分并测定每一部分的 IgE 反应性，b) 第二步将未测到 IgE 反应性的那些过敏原部分组合成包含过敏原氨基酸的嵌合抗原，但嵌合抗原氨基酸顺序不同于天然存在的过敏原。

- 1、一种过敏原衍生的低过敏原性嵌合抗原的制备方法，其中
 - a) 第一步将过敏原分裂成至少两部分并测定每一部分的 IgE 反应性，
 - b) 第二步将不具有可检测的 IgE 反应的那些过敏原部分组合成包含过敏原氨基酸的嵌合抗原，但嵌合抗原氨基酸的顺序不同于天然存在的过敏原。
- 5 2、权利要求 1 所述的方法，其中，第一步中过敏原的至少两部分是通过化学合成或采用聚合酶链反应制备的，且过敏原的每一部分分别与变应性个体中获得的血清反应，并且测定这种血清所含 IgE 抗体与过敏原每一部分
- 10 的反应性。
- 3、权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，在通常在 N-末端存在的部分和通常在 C-末端存在的部分相互替换的意义上，和变应性个体中获得的 IgE 抗体无实质性反应性的过敏原部分的顺序与天然存在的过敏原中的那些部分的顺序不一致。
- 15 4、前述任何一项权利要求所述的方法，其中，过敏原是第 2 组过敏原。
- 5、前述任何一项权利要求所述的方法，其中过敏原是梯牧草花粉过敏原 Phl p 2。
- 6、权利要求 5 所述的方法，其中，过敏原 Phl p 2 被分裂成三个肽，即具有天然存在的 Phl p 2 氨基酸序列的第 1-33 氨基酸的肽 1，第 34-64 氨基酸
- 20 的肽 2，第 65-96 氨基酸的肽 3，并且嵌合抗原是通过以肽 1、肽 3 和肽 2 的顺序连接肽段而制备的。
- 7、具有氨基酸序列为 SEQ ID NO :1 的嵌合过敏原。
- 8、编码权利要求 7 所述的嵌合过敏原的具有 SEQ ID NO :2 的 DNA 序列，或其互补序列。
- 25 9、通过权利要求 1-6 中任何一项权利要求所述的方法可获得的嵌合过敏原在制备治疗变应性反应药物中的用途。
- 10、权利要求 9 所述嵌合过敏原的用途，其中的变应性反应是由草花粉引起的。
- 11、权利要求 10 所述嵌合过敏原的用途，其中的变应性反应是由梯牧
- 30 草花粉引起的。
- 12、权利要求 11 所述嵌合过敏原的用途，其中的变应性反应是由梯牧

草花粉 Phl p 2 引起的。

13、治疗变应性患者的疫苗，其特征在于包含通过权利要求 1-6 中任何一项的方法可获得的嵌合过敏原，或权利要求 7 的嵌合过敏原。

14、治疗草花粉变应性患者的疫苗，其特征在于包含一种 DNA 序列，
5 所述 DNA 序列编码权利要求 1-6 中任何一项的方法可获得的嵌合抗原，或包含权利要求 8 中的 DNA，或与这些 DNA 序列中任一互补的序列。

低过敏原性嵌合抗原的制备方法

- 5 本发明涉及天然存在的过敏原(具体地说,为梯牧草花粉过敏原 Phl p 2)衍生的嵌合(mosaic)抗原。该嵌合抗原表现为过敏原活性降低,可用作过敏疫苗治疗致敏的变应性患者和接种。
- 10 一大部分人群患有 IgE 介导的过敏症。那些病人患有针对几种抗原的过敏反应。相当高比例的过敏反应是由植物花粉引起的。过敏症状如:过敏性鼻炎、哮喘、皮炎、过敏性休克是由于 IgE 对过敏原的识别。IgE 分子是造成过敏反应症状如枯草热、哮喘和荨麻疹的主要原因。
- 15 IgE 分子结合过敏原如:植物花粉。IgE 分子尾部 Fc 部分结合在 Fc 受体上,这些受体主要分布在组织中的肥大细胞和血液中的嗜碱性粒细胞上。抗原结合触发肥大细胞或嗜碱性粒细胞分泌多种细胞因子和生物活性化合物,特别是组胺。这些分子导致血管扩张和通透性增加,从而帮助白细胞、抗体和补体成分进入反应部位。另一方面,那些分子是造成过敏反应症状的主要原因。有不同程度的过敏反应,从眼睛轻微刺痒和轻微感冒症状到严重疼痛甚至到威胁生命的症状如过敏性休克,例如,蜜蜂叮咬后可能发生的过敏性休克。
- 20 为了防止这些过敏反应的发生,基于应用少量低过敏原性化合物制备了过敏疫苗。据认为通过低过敏原性疫苗的应用能使 IgG 抗体产生,在个体接触到过敏原后该抗体立即与过敏原反应。通过那些所谓的阻断性抗体(blocking antibody)大大地阻止了过敏原与患者体内存在的 IgE 分子之间的接触。因此,大大地阻止了 IgE 分子介导的过敏原和肥大细胞之间的反应。
- 25 已有各种各样的疫苗应用于过敏反应的治疗领域中。以前已将少量过敏原应用于患者。随着基因工程的发展,重组过敏原可用作疫苗接种。这种包含过敏原的疫苗的一个主要缺点是应用这种疫苗会引起患者不必要的副作用。例如给患者皮下应用其所过敏的过敏原,不必要的副作用如刺痒直到过敏性休克就可能发生,因为出现在病人体内的 IgE 抗体与过敏原发生了反应
- 30 并引起过敏反应。

为了克服不希望的副作用，由此公开一种制备过敏原衍生的低过敏性嵌合抗原的方法，

a) 第一步将过敏原分裂(split into)成至少两部分并测定每一部分的 IgE 反应性，

5 b) 第二步将没有可检测的 IgE 反应性的那些过敏原部分组合成包含过敏原氨基酸的嵌合抗原，但嵌合抗原氨基酸的顺序不同于天然存在的过敏原。

本方法提出的术语“低过敏性嵌合抗原”是指该抗原包含天然存在的过敏原实质上全部氨基酸。然而，与天然存在的过敏原的不同之处是在第一步过敏原被分裂成不同部分。当过敏原氨基酸序列已知时，从抗原中制备出
10 不同长度的肽段是本领域技术人员的基本常识。肽段既可以通过本领域熟知的化学合成方法制备，或者简单容易地通过聚合酶链反应制备，因为当序列已知时，就能容易地合成适当的引物。

以肽或多肽存在的过敏原每一部分的反应性必须进行测定。这可通过将对天然存在的过敏原过敏患者的血清与肽反应而实现。若肽段上存在 IgE 表
15 位，则这种血清中的 IgE 抗体将与该肽反应。然而，如果不存在线性 IgE 表位或由于分裂完整天然过敏原时构象性 IgE 表位被破坏，将不存在 IgE 与肽的结合。随后可容易地通过能结合 IgE 抗体的特异性抗抗体反应来检测 IgE 抗体。那些抗抗体通常被标记用于探测。

本发明的一个重要方面是将过敏原分成不与 IgE 抗体发生反应的几部分。
20 如果过敏原部分仍以相当的量与 IgE 抗体反应，这些过敏原部分不应该用于嵌合抗原的制备中。建议用不同变应性患者血清测试用于嵌合抗原中的天然存在的过敏原的部分，因为考虑到每种血清中特异性和 IgE 浓度的量会有所变化。

当过敏原被分成几个没有可检测到的 IgE 反应性的部分时，重新排列这
25 些部分以制备嵌合抗原。过敏原的一部分无实质性 IgE 反应性是指最好用至少 5 种变应性患者的血清检测完整天然存在的过敏原的 IgE 反应性，并也检测其各个部分。定量测定 IgE 分子与过敏原及其部分的结合，各部分的 IgE 反应性必须降至不高于天然存在的过敏原获得值的 10%，最好不高于 5%。

所述天然存在的过敏原的部分重排为嵌合抗原从最简单意义上是指过
30 敏原被分裂成两部分，即具有 N-末端并以切割侧结尾的 A 部分，和始于切割侧并以多肽的 C 末端结尾的 B 部分。切割位点是指多肽上的一个部位，

该部位是一个部分的结尾和另一个部分的开始。如果天然存在的抗原的两部分均无实质性 IgE 反应性，则这两部分就以这种方式重排，即现在 B 部分代表 N-末端，A 部分代表 C-末端。

当天然存在的过敏原被分成具有天然存在顺序 A、B 和 C 的 3 个部分，就可能有一种嵌合抗原例如：即例如 C、B、A 或 A、C、B。组成部分越多，所提供的制备嵌合抗原的选择性也就越多。本发明的一个优选实施方案中避免组合位于天然存在的过敏原相邻位置上的部分，例如：C、A、B。之所以这样的原因是 IgE 的结合表位在嵌合抗原上可以再次形成。然而，嵌合抗原包含实质上天然存在抗原的全部氨基酸是十分必要的。当然某些明确无功能的氨基酸可以被删除或者由于制备原因某些氨基酸可被删除，但是，应该尽可能较多地保留氨基酸。此外，嵌合抗原也可以包含用于制备目的的氨基酸。优选的是，嵌合抗原中改组的天然存在的过敏原部分要尽可能大。优选选择切割位点以破坏 IgE 表位由此将 IgE 表位尽可能地保留在远处。

优选实施方案中的方法采用第 2 组过敏原，优选的第 2 组过敏原在下列文献中描述：

Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Grant JH, Meyers DA, Marsh DG. 对黑麦草 (Lolium perenne) (黑麦)花粉及其成分 Lol p I 和 Lol pII (黑麦 I 和黑麦 II)人类免疫应答的研究。I.对过敏原反应性的发病率及皮试、IgE 抗体和 IgG 抗体数据之间的关联性。J Allergy Clin Immunol 1986,78,1190-1201。

Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Meyers DA, Marsh DG. 对黑麦草(黑麦)花粉及其成分 Lol p I 和 Lol pII (黑麦 I 和黑麦 II)人类免疫应答的研究。II. 与症状学和花粉暴露有关的抗体水平纵向变化以及将季节性升高的抗体水平修正为正常值。J Allergy Clin Immunol 1987,80, 646-655。Ansari AA, Shenbagamurthi P, Marsh DG. 黑麦草(多年生黑麦草)花粉过敏原 Lol pII 的完整氨基酸序列。J Biol Chem 1989,264, 11181-11185。Dolecek C, Vrtala S, Laffer S, Steinberger P, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. 一种主要的梯牧草(Phleum pratense)花粉过敏原 Phl pII 的分子特性。FEBS Lett 1993,335, 299-304。

一个特别优选实施方案中用作嵌合抗原的过敏原是梯牧草花粉过敏原 Phl p 2。草花粉过敏原 Phl p 2 的序列在 WO 94/23035 中公开。De Marino et al., Structure (1999) Vol. 7, No. 8, p 943-952 中提供了来自梯牧草花粉的 Phl p 2 的

更详细描述。优选 Phl p 2 抗原的原因是 Phl p 2 能与大约 70% 的草花粉过敏患者血清中的 IgE 反应并引起致敏患者嗜碱性粒细胞释放组胺。

在本发明过程中已经发现 Phl p 2 过敏原最好分裂成 3 个肽，即具有氨基酸 1-33 的肽 1，具有氨基酸 34-64 的肽 2，和具有氨基酸 65-96 的肽 3。通过按 1、3 和 2 的顺序重排肽段制备嵌合抗原，所述嵌合抗原可用于低过敏性接种。这种嵌合抗原的优势是产生足够量的阻断性 IgE 抗体，但几乎完全避免了接种相关的不必要的副反应。

优选嵌合抗原的氨基酸序列具有 SEQ ID NO :1。编码这一优选嵌合过敏原的 DNA 为 SEQ ID NO :2。

10 优选本公开提出的嵌合过敏原用于治疗过敏反应药物的制备。优选的 Phl p 2 嵌合抗原可用于治疗草花粉过敏症药物的制备。由于 Phl p 2 是一种相当大部分变应性患者已针对其形成 IgE 抗体的抗原，因此该嵌合抗原十分有助于枯草热患者的治疗。

15 通过所描述的方法制备的嵌合过敏原可制备成治疗过敏反应的药物。主要成分为嵌合抗原，所述嵌合抗原优选与佐剂一起使用。有几种适合应用于人的佐剂如：氢氧化铝凝胶。在本发明的另一个实施方案中，也可能通过共价结合将嵌合抗原直接连接到另一个通常能增强机体免疫反应的成分上。

也有可能采用编码嵌合抗原的 DNA 或与其互补的 DNA 序列作为疫苗。对于核酸疫苗而言，是将适当的多核苷酸序列插入到靶细胞中。除了编码嵌合抗原的序列之外，这种 DNA 疫苗也可以包含调节元件如：启动子、核糖体结合点或终止序列。优选的是，这种 DNA 序列应该整合适宜载体中，所述载体能使 DNA 到达细胞的蛋白合成机制。

20 这里详述的嵌合抗原优选应用于人类。不过也可能将该嵌合抗原用于有价值的动物如：宠物(例如狗或猫)或马。

25 图和表描述本发明的优选实施方案：

图 1 比较了合成的 Phl p 2 衍生的肽与完整 rPhl p 2(重组生成的野生型过敏原)的 IgE 反应性。硝基纤维素包含(A)点样的 Phl p 2 肽(P1、P2、P3)、人血清白蛋白(HSA)、对照肽(P)和一种无交叉反应的梯牧草花粉过敏原(rPhl p 5)和(B)Phl p 5 和 Phl p 2 暴露于 35 例草花粉过敏患者的血清(1-35)和一例非过敏个体(N)的血清中。

30 图 2 重组组氨酸标记的 Phl p 2 野生型和重组组氨酸标记的 Phl p 2 嵌合

体的示意图。标明了3个肽的位置。

图3 用于构建 Phl p 2 嵌合体的引物 DNA 序列和用于装配编码 rPhl p 2 嵌合体的 cDNA 的 PCR 程序示意图。在引物 P2/1 和 P2/6 中 Nde I 和 EcoRI 限制性位点用下划线分别标出。引物对应于 SEQ ID NO : 6 到 SEQ ID NO :11。

图4 组氨酸标记的 Phl p 2 嵌合体的 cDNA (SEQ ID NO : 2) 和导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 1)。氨基酸以单个字母码表示, 碱基对和氨基酸数目显示在右边缘。

图5 重组 rPhl p 2 嵌合体和重组 rPhl p 2 的纯度。考马斯染色的胶包含 Phl p 2 (P2 泳道)、Phl p 2 嵌合体 (P2M 泳道) 和分子量标准 (M 泳道)。

图6 纯化的 rPhl p 2 嵌合体 (A) 和 rPhl p 2 (B) 的质谱分析。X-轴显示质量/电荷比率, 信号强度表示为在所观测的质量范围内获得的最强信号的百分比。

图7 比较 rPhl p 2 (P2) 和 rPhl p 2 嵌合体 (P2M) 的 IgE 结合能力。用来自 12 个 Phl p 2 草花粉过敏患者的血清 (1-12) 探测硝基纤维素上点样的 rPhl p 2 (P2)、rPhl p 2 嵌合体 (P2M) 和人血清白蛋白 (HSA)。用 ^{125}I 标记的抗人 IgE 抗体检测被结合的 IgE 抗体并通过放射自显影显像。

图8 通过嗜碱性粒细胞组胺释放法测定 rPhl p 2 嵌合体降低了的过敏原活性。一例草花粉过敏患者的嗜碱性粒细胞暴露于浓度渐增的 rPhl p 2 和 rPhl p 2 嵌合体中 (X-轴)。组胺释放表示为 y-轴上总组胺释放的百分比。

图9 兔抗 rPhl p 2 嵌合抗体识别 rPhl p 2 野生型过敏原。针对 rPhl p 2 嵌合体 (α P2M)、KLH-耦联的嵌合体 (α P2M-KLH) 和 rPhl p 2 (α Phl p 2) 以及缓冲液 (C) 的兔抗血清暴露于点印迹的 KLH、人血清白蛋白 (HSA)、rPhl p 2 (P2) 和 rPhl p 2 嵌合体 (P2M)。用 ^{125}I 标记的驴抗兔 IgG 检测被结合的兔抗体并通过放射自显影显像。

表1 Phl p 2 衍生的合成肽的性质。显示肽的序列、氨基酸数目、在 Phl p 2 过敏原中的位置、分子量和等电点。肽1对应于 SEQ ID NO : 3, 肽3对应于 SEQ ID NO : 4, 肽2对应于 SEQ ID NO : 5。

表2 对完整 rPhl p 2 和 Phl p 2 嵌合体 (P2M) 的速发型皮肤反应。用 P2 和 P2 M 对两例梯牧草花粉过敏患者 (个体 1、2) 测试皮肤反应性。显示对 5 种不同浓度的 rPhl p 2 和 Phl p 2 嵌合体、以及梯牧草花粉提取物和组胺出现

的平均风疹块直径(mm)。

表3 兔 α P2 M和兔抗 α P2抗体对草花粉过敏患者IgE结合rPhl p 2的抑制作用。显示5例患者IgE结合的抑制百分率。

以下实施例进一步描述了本发明：

5

实施例1. 合成无过敏原活性的Phl p 2衍生肽

为了确定无过敏原活性的Phl p 2片段,化学合成每个包含约1/3的Phl p 2蛋白的肽段(表1)。肽段长度介于32-34个氨基酸,分子量约为3.7kDa,加起来覆盖整个Phl p 2氨基酸序列。

- 10 在433A型Applied Biosystems(Foster City, CA)肽合成仪上,采用Fmoc(9-芴基甲氧基羰基)策略,用HBTU(2-(1H-苯并三唑-1-基)1,1,3,3,四甲基脲六氟代磷酸酯)活化(0.1 mmol 小规模循环),合成这三种肽。预上样的PEG-PS(聚乙二醇聚苯乙烯)树脂(0.15-0.2mmol/g上样)(Septive Biosystems, Warrington, UK)被用作固相来构建肽。化学制品购自Applied Biosystems。通过在反馈控
- 15 制系统中的传导性监测证实氨基酸的接合。在每个肽的N-或C-末端上添加一个半胱氨酸残基以促使多肽与载体接合。用混合物(250 μ l 蒸馏水、250 μ l 三异丙硅烷(Flukan, Buchs, Switzerland)、9.5 ml TFA)作用2小时,以将肽从树脂上切下并在叔丁基甲基醚(Flukan, Buchs, Switzerland)中沉淀。用质谱检查肽的同一性并用制备性HPLC (PiChem,Graz, Austria)纯化至>90%纯。
- 20 (Focke M,Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valent P, Kraft D, Valenta R. 源自主要草花粉过敏原B细胞表位的非过敏性合成肽Phl p 1 B用于过敏反应接种。FASEB J. 2001, 15: 2042-2044。

- 通过用斑点印迹分析比较完整rPhl p 2与肽的IgE反应性,评价Phl p 2衍生肽的过敏原活性(图1)。将硝化纤维素印迹的Phl p 2衍生肽(P1-P3)、在
- 25 免疫上无关的主要草花粉过敏原rPhl p 5 (Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I, van Ree R, Laffer S, Miller WD, Valent P, Lechner K, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. 梯牧草(Phleum pratense)花粉主要过敏原的cDNA克隆;重组Phl p V过敏原的表征。J. Immunol. 1993,151: 4773-4781)、和用于对照目的的人血清白蛋白和对照肽暴露于来自草花粉变应性患者的血清和
- 30 来自非变应性个体的血清。

按先前描述地测定结合的IgE抗体(Valenta R, Duchene M, Ebner C,

Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D, Scheiner O. 抑制蛋白是功能性植物泛过敏原的新家族 J. Exp. Med. 1992,175 : 377-385)。来自所有 35 例草花粉变应性患者的血清显示对硝化纤维素印迹的 rPhl p 2 有 IgE 反应性,但没有血清与三种 Phl p 2 衍生肽中的任何一个发生反应(图 1)。非变应性个体的血清对所述肽或蛋白的任一种均不显示 IgE 反应性。

实施例 2. 重组 Phl p 2 嵌合蛋白的表征

按不同顺序重组三种 Phl p 2 衍生肽,获得重组 Phl p 2 嵌合蛋白。这种嵌合蛋白的产生基于一种设想,即:按不同顺序重组三种非变应性 Phl p 2 片段将得到一种嵌合蛋白,其具有破坏的三维结构,并因此变应性活性降低的。此外,预期嵌合蛋白与单个的较小肽单位相比将展示更好的免疫原性,且保留了 Phl p 2 整个一级氨基酸序列,也就包含 Phl p 2 相关的 T 细胞表位。

图 2 显示了天然 Phl p 2 过敏原与 Phl p 2 嵌合蛋白中三种肽段装配的比较。为了比较这两种蛋白,制备包含 C-末端六个组氨酸的尾巴的重组 Phl p 2,和重组 Phl p 2 嵌合蛋白,后者也包含 C-末端六个组氨酸的尾巴(图 2),目的是通过镍亲和层析(Quiagen, Hilden, Germany)纯化这两种蛋白。

构建重组 Phl p 2 嵌合体,采用如下方式:对编码三种多肽的 cDNA 通过图 2 所示顺序、采用图 3 所示的引物、进行以 PCR 为基础的基因扩增,编码 Phl p 2 的 cDNA (Dolecek C, Vrtala S, Laffer S, Steinberger P, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. 一种主要的梯牧草(Phleum pratense)花粉过敏原 Phl p II 的分子表征。FEBS Lett. 1993,335 : 299-304) 作为文献所描述的模板(Linhart B, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Ebner C, Kraft D, Valenta R. 用于治疗草花粉过敏组合疫苗,由免疫原性增强的基因工程化杂交分子组成。FASEB J. 2002,16 : 1301-1303)。

图 4 显示重组 Phl p 2 嵌合蛋白的 DNA 及推导的氨基酸序列。组氨酸标记的嵌合蛋白由 309bp 的 DNA 编码,编码计算出的分子量为 11769 Da 的蛋白质,几乎与组氨酸标记的重组 Phl p 2 过敏原的分子量相同(11784 Da)。

通过 PCR 获得编码组氨酸标记的 rPhl p 2 过敏原的 cDNA,联合采用 5' 引物 P2/1 (SEQ ID NO : 6)和 3'引物 P2/7 (SEQ ID NO : 12): CGC GAA TTC TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CTC TTC TGG CGC GTA GGT GGC,

及编码 Phl p 2 的 cDNA 作为模板。

将编码组氨酸标记的 Phl p 2 嵌合体和组氨酸标记的 Phl p 2 过敏原的 cDNAs 分别连接在 Nde I/Eco RI 酶切的质粒 pET17b (Novagen) 中。通过序列分析确定这两种质粒构建物的 DNA 序列并在大肠杆菌 BL21 (DE3) (Novagen) 5 中通过诱导表达重组蛋白, 诱导用 0.5mM 异丙基- β -硫代半乳糖苷以 OD_{600nm} 为 0.4 在液体培养物(含 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 培养基)中 37℃ 再孵育 4 小时来进行。从 500 ml 培养物中离心收集大肠杆菌细胞, 并根据厂家建议(Quiagen, Hilden, Germany)在自然(rPhl p 2)或变性条件(rPhl p 2 嵌合体)下制备用于纯化。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 10 和蛋白染色(Fling SP, Gregerson DS.采用无尿素的高摩尔浓度 Tris 缓冲液系统电泳测定肽和蛋白的分子量。Anal. Biochem. 1986, 155: 83-88)分析蛋白样品纯度 (图 4)。

图 5 显示组氨酸标记的重组蛋白(rPhl p 2: P2、rPhl p 2 嵌合体: P2M)的纯度。虽然这两种蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移行为不完全相同, 但文献 15 “Niederberger V, Hayek B, Vrtala S, Laffer S, Twardosz A, Vangelista L, Sperr WR, Valent P, Rumpold H, Kraft D, Ehrenberger K, Valenta R, Spitzauer S. 脂蛋白和钙结合形式的交叉反应性两 EF 臂的梯牧草花粉过敏原 Phl p 7 的钙依赖性 IgE 识别 FASEB J. 1999, 13 : 843-856” 所描述而进行的质谱分析显示这两种蛋白的分子量几乎相同(rPhl p 2: 11775 Da、rPhl p 2 嵌合体: 11770 Da), 这 20 与所导出的包含 N-末端甲硫氨酸的分子量非常一致(图 6)。

实施例 3. rPhl p 2 嵌合体缺乏 IgE 反应性和变应性特性

用 12 例梯牧草花粉变应性患者血清如所描述地进行肽的斑点印迹试验, 比较纯化 Phl p 2 嵌合体(P2M)和 Phl p 2 野生型的 IgE 结合能力(图 7)。所有 25 12 例草花粉变应性患者血清包含抗 rPhl p 2 的 IgE 抗体, 但没有血清表现出对 rPhl p 2 嵌合体或作为阴性对照的人血清白蛋白的 IgE 反应性(图 7)。用嗜碱性粒细胞组胺释放和皮试实验进一步证实 rPhl p 2 嵌合体大大减少的过敏原活性。用右旋糖酐沉淀法富集一例草花粉过敏患者的嗜碱性粒细胞并将其暴露于浓度渐增的纯化的 rPhl p 2 或 rPhl p 2 嵌合体, 如文献所述 (Valent P, 30 Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelhei P. IL-3 通过高亲和力结合位点激活人血中嗜碱性粒细胞。Proc.Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86 :

5542-5546)。

通过放免分析一式三份测定释放到无细胞上清中的组胺并表示为细胞总组胺含量的平均百分比, 正如 Valent 等所述。

图 8 显示 rPhl p 2 嵌合体(最大释放介于 1-10 μ g/ml)与 rPhl p 2 过敏原(最大释放为 10^{-3} μ g/ml)相比显示过敏原活性减少 1000 倍以上。

通过草花粉过敏患者皮试实验证实了 rPhl p 2 嵌合体明显降低的过敏原活性(表 2)。在患者前臂进行 SPT (皮肤点刺测试)。应用含 5 个浓度(1 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、8 μ g/ml、16 μ g/ml)的 rPhl p 2 和 Phl p 2 衍生的嵌合体 P2M 的 20 μ l 等分试样。此外, 测试标准化的皮肤点刺溶液(梯牧草花粉提取物和组胺)(Allergopharma, Reinbeck, Germany)。SPT 后 20 分钟, 采用摄影或将圆珠笔圈的疹块区用透明胶带转移到纸上的方法记录反应。通过测量最大纵向和横向直径, 二者之和除以 2 来计算平均疹块直径(Dm), 如 Focke 等(2001)所述。

rPhl p 2 已在所测试的最低浓度即 1 μ g/ml 诱导强烈的疹块反应, 而 rPhl p 2 嵌合体在所测试的最大浓度(即 8-16 μ g/ml)只诱导轻微的疹块反应, 因此证实了嵌合蛋白降低的过敏原活性。

实施例 4. 用 rPhl p 2 嵌合体免疫诱导识别 rPhl p 2 的野生型 IgG 抗体并抑制变应性患者 IgE 结合 Phl p 2

为了测试用 Phl p 2 嵌合体和 Phl p 2 嵌合体免疫是否诱导与天然 Phl p 2 反应的 IgG 抗体, 采用弗氏佐剂用 rPhl p 2 嵌合体、KLH-耦联的 rPhl p 2 嵌合体或 rPhl p 2 免疫兔, 如 Focke 等所述。

采用斑点印迹实验研究兔 IgG 抗体与 rPhl p 2 的反应性(图 9)。Phl p 2 野生型(P2)和相应的免疫原 Phl p 2 嵌合体(P2M)点样于硝化纤维素条上(1 μ g/点)。硝化纤维素条暴露于兔预免疫或免疫血清(1: 500), 用 1: 1000 稀释的 125 I 标记的驴抗兔抗血清(Amersham Pharmacia Biotech)检测结合的兔抗体, 如 Valenta 等(1992)所述。

兔抗 rPhl p 2 嵌合体抗血清与免疫原(rPhl p 2 嵌合体)以及 rPhl p 2 过敏原发生强烈反应(图 9)。抗体反应性强度与 KLH-耦联的嵌合体免疫产生的抗血清所获得的近似, 强于 rPhl p 2 过敏原免疫诱导的反应性(图 9)。

实施例6 封闭抗体的测定

取5例草花粉变应性患者血清，用ELISA竞争法研究是否rPhl p 2嵌合体免疫诱导的IgG抗体抑制变应性患者血清IgE与完整rPhl p 2的结合(表3)。用rPhl p 2 (1 μg/ml)包被ELISA板(Nunc Maxisorp, Rokslide, Denmark)，并分别用1:100稀释的抗Phl p 2嵌合体和抗rPhl p 2抗血清预孵育，并用相应预免疫血清设立对照。ELISA板洗涤后用1:3稀释的来自5例Phl p 2致敏的花粉变应性患者血清孵育，用1:1000稀释的碱性磷酸酶偶联的单克隆大鼠抗人IgE抗体(Pharmingen, San Diego, CA)检测结合的IgE抗体。通过抗Phl p 2嵌合体和抗rPhl p 2预孵育获得的IgE结合抑制百分率可按如下计算：
$$\text{IgE结合抑制百分比(\%)} = 100 - \text{OD}_I / \text{OD}_P \times 100$$
。OD_I和OD_P分别代表用免疫和预免疫血清预先孵育后的消光，如Focke等(2001)所述。

抗Phl p 2嵌合体抗体抑制草花粉变应性患者IgE与Phl p 2的结合(平均抑制20.93%)，虽然稍低于用rPhl p 2过敏原免疫诱导的抗体预孵育所获得的程度(平均抑制54.73%)。

因此免疫研究的结果表明针对rPhl p 2嵌合体产生的抗体识别Phl p 2野生型过敏原并抑制过敏患者IgE对Phl p 2的识别。

<110> 比奥梅产品及贸易股份公司 (Biomay Produktions- und Handels-Aktiengesellschaft)

<120> 低过敏性嵌合抗原的制备方法

<130> mosaic

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 重排多肽序列

<400> 1

Met Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys

1 5 10 15

His Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val

20 25 30

Glu Leu Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp

35 40 45

Asp Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu

50 55 60

Glu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu

65 70 75 80

Gly Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe

85

90

95

Asn His His His His His His
100

<210> 2

<211> 309

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 重排核苷酸序列

<400> 2

```
atggtcccga aggtgacgtt cacggtggag aaggggtcca acgagaagca cctggcgggtg 60
ctggtgaagt acgaggggga caccatggcg gaggtggagc tcttccggtt cctcaccgag 120
aagggcatga agaacgtctt cgacgacgtc gtcccagaga agtacacat tggggccacc 180
tacgcgccag aagagcggga gcacggctcc gacgagtggg tcgcatgac caagggggag 240
ggcggcgtgt ggacgttcga cagcaggag cgcctccagg ggccttcaa ccaccaccac 300
caccaccac 309
```

<210> 3

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 多肽

<400> 3

```
Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
  1           5           10           15
```

```
Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
      20           25           30
```

Leu Cys

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 多肽

<400> 4

Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly
 1 5 10 15

Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
 20 25 30

Cys

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 多肽

<400> 5

Cys Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
 1 5 10 15

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
 20 25 30

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 6
ggatttccat atggtcccga aggtgacgtt cacg 34

<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 7
ggtgaggaac cggaagagct ccacctccgc catggt 36

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 8
gcggagggtgg agctcttccg gttcctcacc gagaag 36

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 9
ggagccgtgc tcccgtcttt ctggcgcgta ggtggc 36

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 10

tacgcgccag aagagcggga gcacggctcc gacgag

36

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 11

cgcgaaattct cagtgggtgt ggtgggtgtg gttgaagggc ccctggagcg g

51

<210> 12

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 12

cgcgaaattct cagtgggtgt ggtgggtgtg ctcttctggc gcgtaggtgg c

51

表 1

	aa位置	序列	aa 号数	分子量	等电点
肽 1	1-33	VPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKYE GDTMAEVELC	34	3765,02	4.87
肽 3	65-96	REHGSDEWVAMTKGEGGVWTFD SEELQGFNC	33	3696,8	4.03
肽 2	34-64	CFRFLTEKGMKNVFDVVP EKEYTIGATYAPEE	32	3698,91	4.45

表 2

用Ph1 p2和Ph1 p2嵌合体诱导即刻皮肤反应

个体1		个体2	
平均风疹块直径 (mm)		平均风疹块直径 (mm)	
P2	P2M	P2	P2M
1 $\mu\text{g/ml}$	0	5	0
2 $\mu\text{g/ml}$	0	5	0
4 $\mu\text{g/ml}$	0	6	0
8 $\mu\text{g/ml}$	5	7	0
16 $\mu\text{g/ml}$	4	9	3
梯牧草 组胺	15 8	10 8	

表 3

兔抗P2M抗体和兔抗rPh1 p2抗体对草花粉过敏患者IgE结合Ph1 p2的抑制作用

患者	抑制 %	
	抗P2M	抗rPh1 p2
1	39.54	76.93
2	9.25	63.97
3	23.20	52.91
4	14.38	40.86
5	18.27	38.97
平均	20.93	54.73

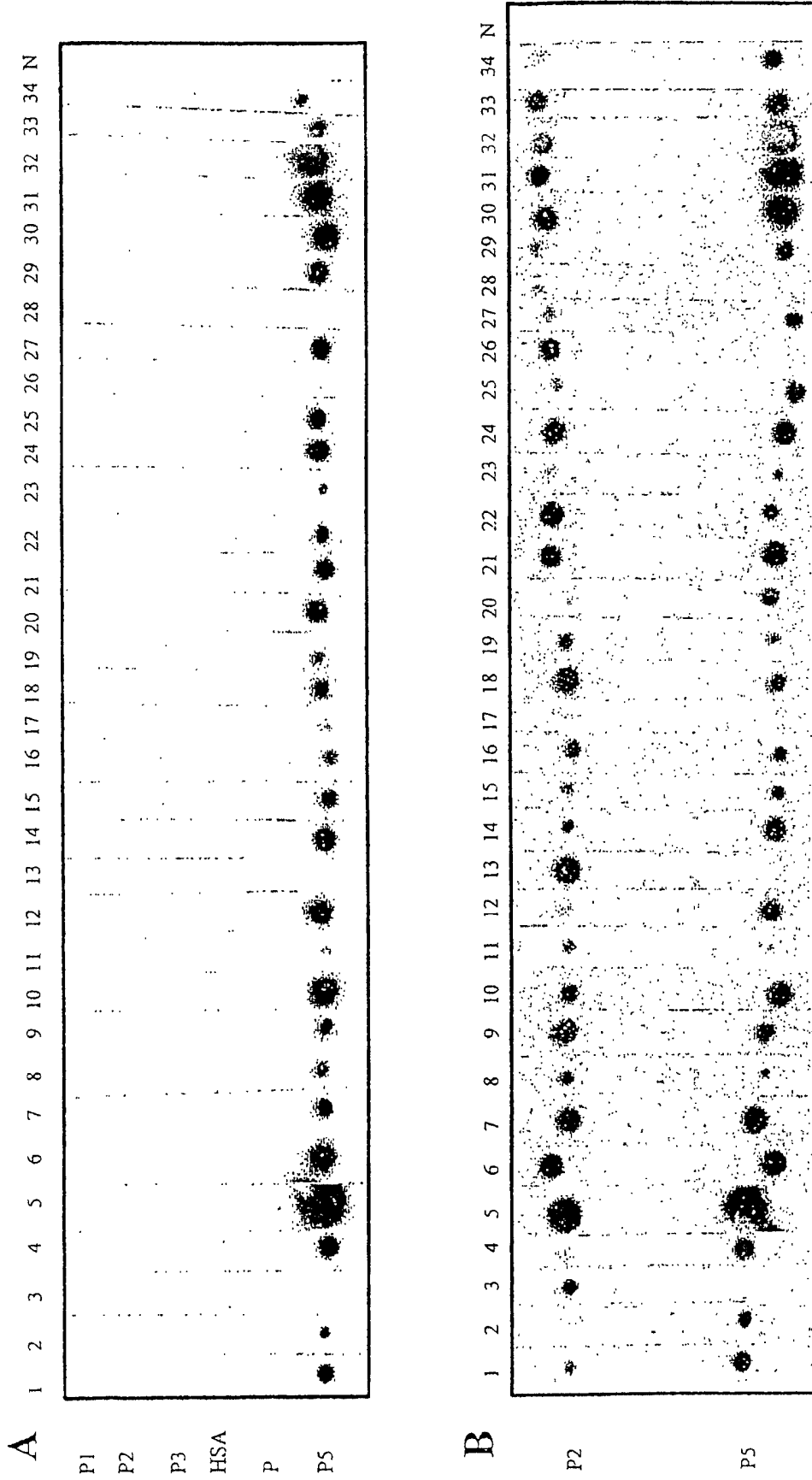
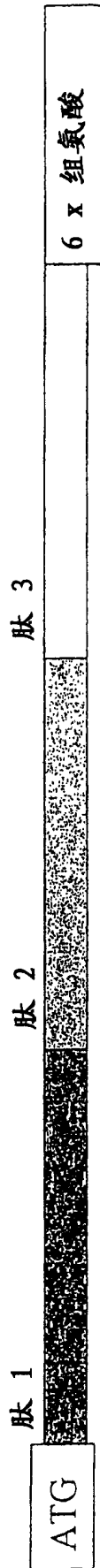


图 1

P2



P2嵌合体

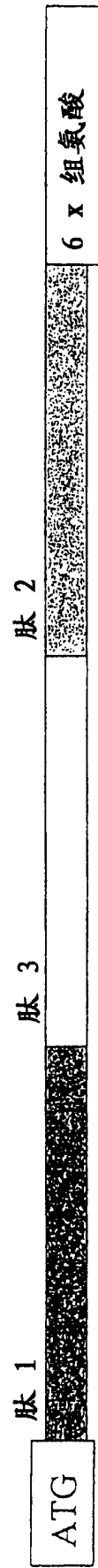


图 2

序列号:

6 P2/1: 5'-GGA TTT CCA TAT GGT CCC GAA GGT GAC GTT CAC G - 3'

7 P2/2: 5'-GGT GAG GAA CCG GAA GAG CTC CAC CTC CGC CAT GGT - 3'

8 P2/3: 5'-GCG GAG GTG GAG CTC TTC CCG TTC CTC ACC GAG AAG - 3'

9 P2/4: 5'-GGA GCC GTG CTC CCG CTC TTC TGG CGC GTA GGT GGC - 3'

10 P2/5: 5'-TAC GCG CCA GAA GAG CCG GAG CAC GGC TCC GAC GAG - 3'

11 P2/6: 5'-CGC GAA TTC TCA GTG GTG GTG GTG GTT GAA GGG CCC CTG GAG
CGG - 3'

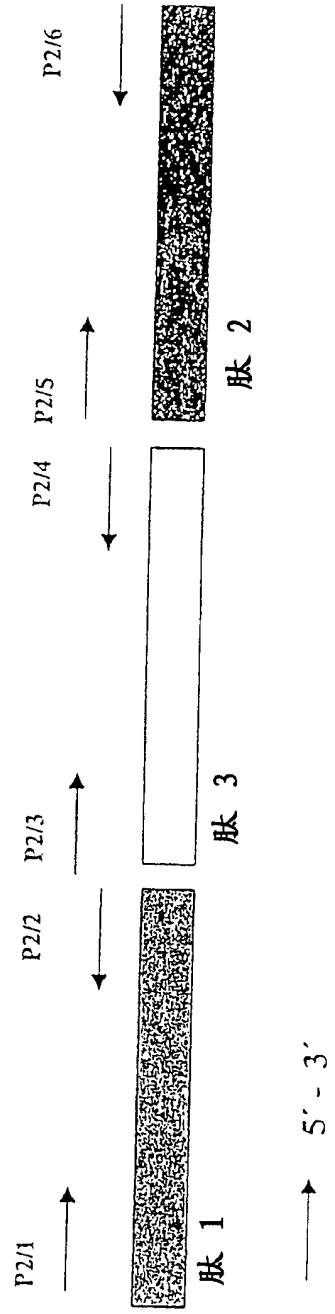


图 3

P2M序列

ATG GTC CCG AAG GTG ACG TTC ACG GTG GAG AAG GGG TCC AAC GAG AAG CAC 51
 M V P K V T F T V E K G S N E K H 17

 CTG GCG GTG CTG GTG AAG TAC GAG GGG GAC ACC ATG GCG GAG GTG GAG CTC 102
 L A V L V K Y E G D T M A E V E L 34

 TTC CGG TTC CTC ACC GAG AAG GGC ATG AAG AAC GTC TTC GAC GAC GTC GTC 153
 F R F L T E K G M K N V F D D V V 51

 CCA GAG AAG TAC ACC ATT GGG GCC ACC TAC GCG CCA GAA GAG CGG GAG CAC 204
 P E K Y T I G A T Y A P E E R E H 68

 GGC ICC GAC GAG TGG GTC GCC ATG ACC AAG GGG GAG GGC GGC GIG TGG ACG 255
 G S D E W V A M T K G E G G V W T 85

 TTC GAC AGC GAG GAG CCG CTC CAG GGG CCC TTC AAC CAC CAC CAC CAC CAC 306
 F D S E E P L Q G P F N H H H H H 102

 CAC 309
 H 103

图 4

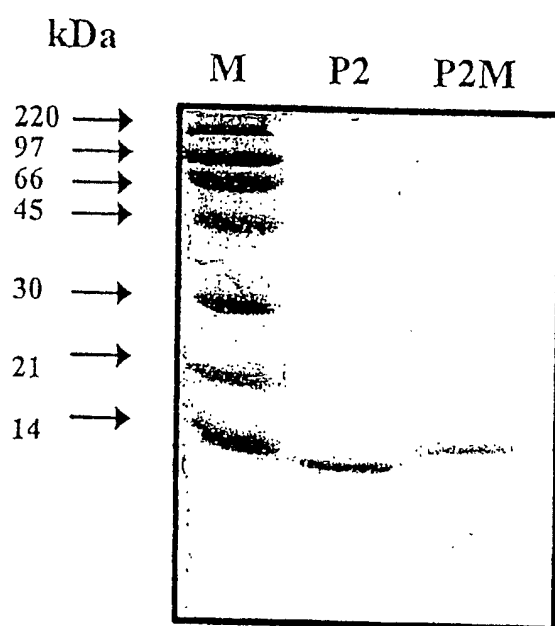
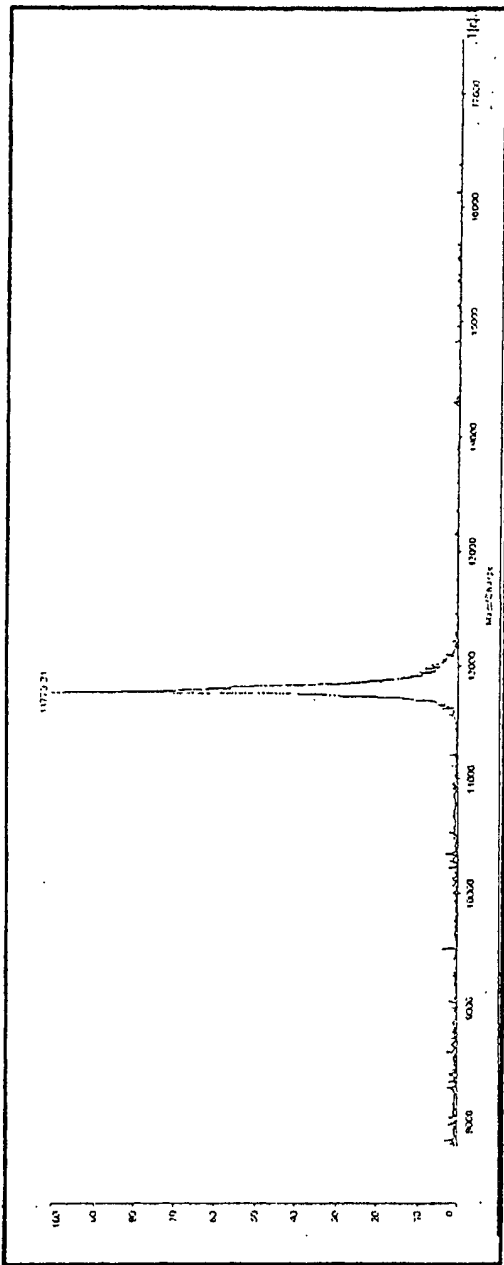
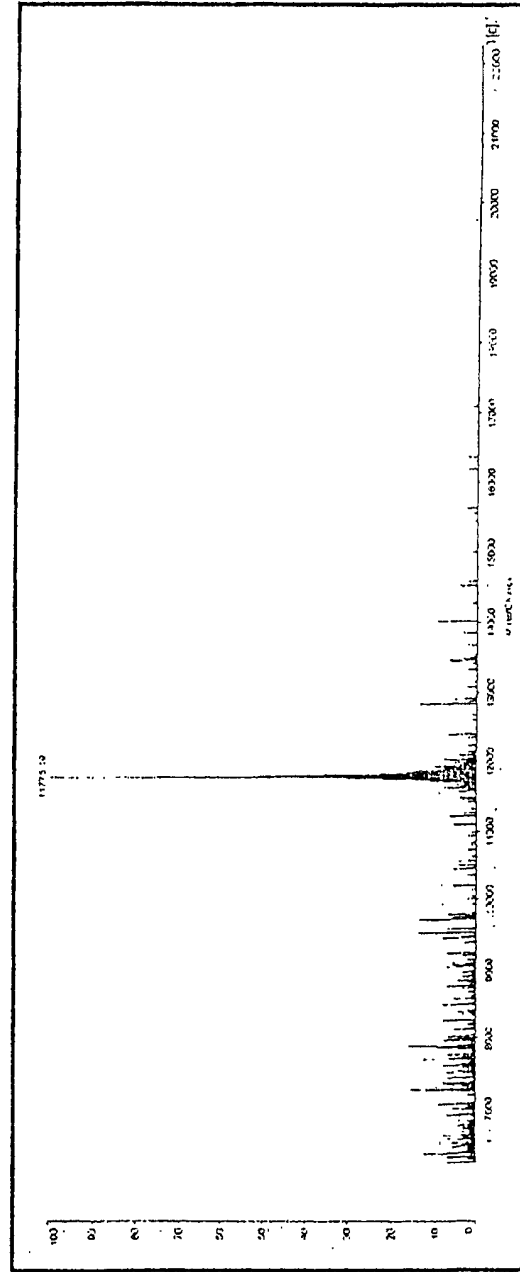


图 5



A



B

图 6

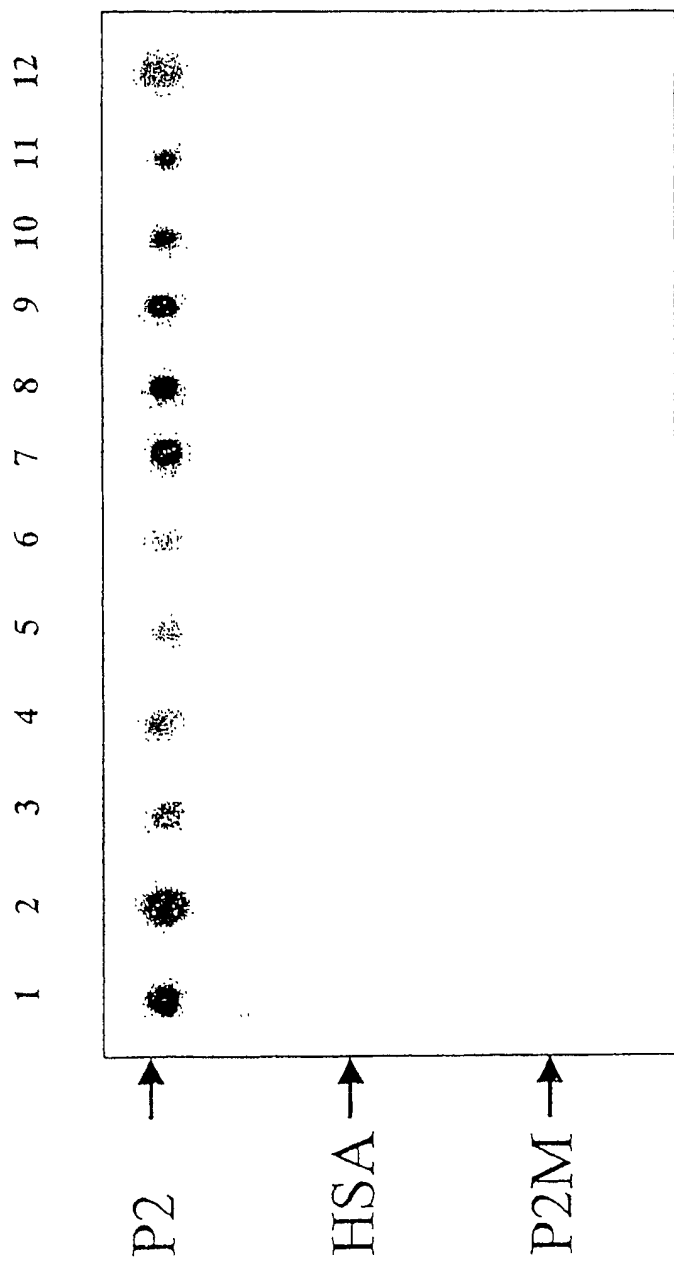


图 7

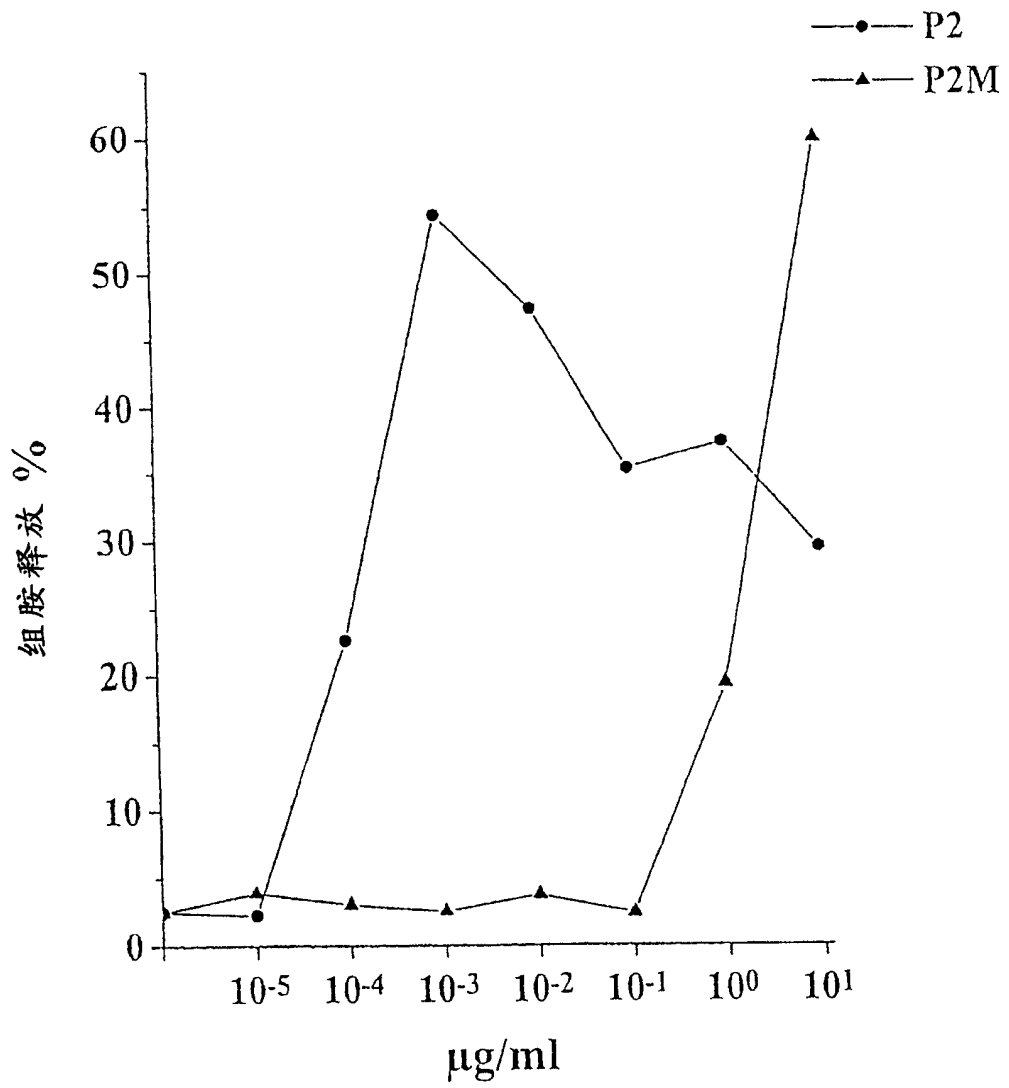


图 8

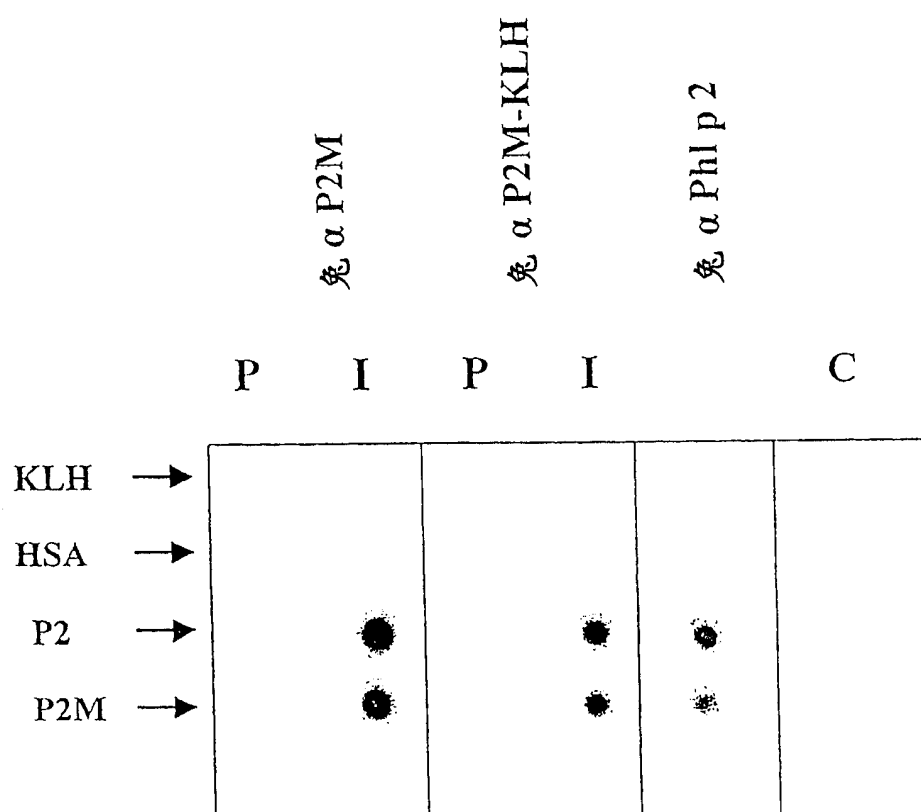


图 9