



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108884148 B

(45) 授权公告日 2022.06.03

(21) 申请号 201780020998.3
 (22) 申请日 2017.03.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108884148 A
 (43) 申请公布日 2018.11.23
 (30) 优先权数据
 2016-063157 2016.03.28 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.09.28
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2017/012623 2017.03.28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/170541 JA 2017.10.05
 (73) 专利权人 国立研究开发法人水产研究教育
 机构
 地址 日本神奈川县

专利权人 和兴滤清器科技株式会社
 (72) 发明人 臼井将胜 宫崎泰幸 齐藤章
 (74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
 有限责任公司 11290
 专利代理师 王玉玲 李雪春

(51) Int.Cl.
 C07K 14/78 (2006.01)
 A23L 33/10 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 107118267 A, 2017.09.01
 CN 106072071 A, 2016.11.09
 CN 112142836 A, 2020.12.29
 张自业. 基于糖基化修饰消减秀丽白虾原肌
 球蛋白致敏性及免疫脱敏机理研究.《道客巴
 巴》.2020,

审查员 梁艳莉

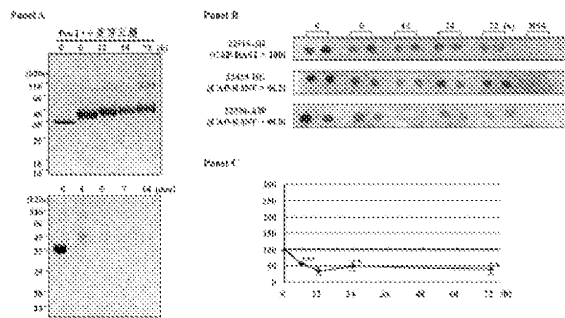
权利要求书1页 说明书4页 附图6页

(54) 发明名称

覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物及其制造方法

(57) 摘要

本发明为一种覆盖了纤维状蛋白的抗原性的新型组合物,其含有将例如源自虾的原肌球蛋白等纤维状蛋白和例如麦芽五糖或麦芽七糖等麦芽低聚糖通过美拉德反应而结合得到的复合体。



1. 一种覆盖了源自虾的原肌球蛋白的抗原性的组合物,其中,含有使源自虾的原肌球蛋白和麦芽五糖或麦芽七糖通过美拉德反应结合得到的复合体。

2. 一种覆盖了源自虾的原肌球蛋白的抗原性的组合物的制造方法,其特征在于,其使源自虾的原肌球蛋白和麦芽五糖或麦芽七糖发生美拉德反应。

3. 根据权利要求2所述的覆盖了源自虾的原肌球蛋白的抗原性的组合物的制造方法,其中,将所述原肌球蛋白及麦芽五糖或麦芽七糖的混合物干燥加热6小时以上而使其发生美拉德反应。

覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及覆盖了纤维状蛋白的抗原性的新型组合物及其制造方法。

背景技术

[0002] 以往,认为使例如杉树花粉变应原等球状蛋白与例如半乳甘露聚糖等多糖类发生美拉德反应来掩蔽球状蛋白的方法(例如专利文献1)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特开2006-340658号公报

发明内容

[0006] 发明要解决的课题

[0007] 然而,对于不具有复杂高级次结构的例如源自虾的原肌球蛋白等纤维状蛋白,其有效性并不明确。实际上,本申请发明人即使使半乳甘露聚糖与原肌球蛋白发生美拉德反应,也未能发现其抗原结构的降低化。

[0008] 另一方面,本申请发明人为了实现纤维状蛋白的抗原性的降低化而进行了各种研究。其中,发现了能够降低纤维状蛋白的抗原性的糖类。

[0009] 本发明是基于本申请发明人的上述见解而完成的发明,其主要课题在于提供覆盖了纤维状蛋白的抗原性的新型组合物。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 即本发明的覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物,其特征在于,其含有使纤维状蛋白和麦芽低聚糖结合得到的复合体。

[0012] 在此,理想的是:上述纤维状蛋白为例如源自虾的原肌球蛋白。

[0013] 另外,理想的是:上述麦芽低聚糖的分子尺寸为五糖(由5分子的单糖生成的寡糖)的麦芽五糖(分子量约829)~七糖的麦芽七糖(分子量约1153)之间。

[0014] 进而,本发明涉及的覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物的制造方法,其特征在于,其使纤维状蛋白与麦芽低聚糖发生美拉德反应。

[0015] 在此,理想的是:将上述纤维状蛋白及麦芽低聚糖的混合物干燥加热6小时以上而使其发生美拉德反应。

[0016] 发明效果

[0017] 根据本发明,使纤维状蛋白和麦芽低聚糖通过美拉德反应而结合,由此可以降低纤维状蛋白的抗原性。

附图说明

[0018] 图1为基于干燥加热得到的Pen_{j1}的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0019] 图2为Pen j1及葡萄糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0020] 图3为Pen j1及D(+)-麦芽三糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0021] 图4为Pen j1及麦芽五糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0022] 图5为Pen j1及麦芽七糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0023] 图6为Pen j1及半乳甘露聚糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

具体实施方式

[0024] 以下,对本发明进行详细叙述。

[0025] 本实施方式的覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物含有使纤维状蛋白和麦芽低聚糖结合得到的复合体。

[0026] 作为纤维状蛋白,考虑使用源自虾的原肌球蛋白。该源自虾的原肌球蛋白是分子量约35kDa且富有 α -螺旋结构的纤维状蛋白。予以说明,原肌球蛋白在甲壳类、软体动物、昆虫等中具有高度的相同性,且高频率地显示交叉性。

[0027] 予以说明,作为其他的纤维状蛋白,还考虑胶原、肌球蛋白、角蛋白、弹性蛋白等。

[0028] 作为麦芽低聚糖,考虑使用麦芽五糖或麦芽七糖。

[0029] 本实施方式的覆盖了纤维状蛋白的抗原性的组合物,可以通过将作为纤维状蛋白的原肌球蛋白及作为麦芽低聚糖的麦芽五糖或麦芽七糖的混合物干燥加热6小时以上而使其美拉德反应来制造。

[0030] 具体的制造方法如下所示。

[0031] 将原肌球蛋白/麦芽五糖(麦芽七糖)的摩尔比达到虾原肌球蛋白:糖 \approx 约1:50的量的原肌球蛋白及麦芽五糖(麦芽七糖)混合溶解于水中,以使水溶液中的原肌球蛋白的合计含量达到0.1质量%的方式含有所需量的麦芽五糖(麦芽七糖)来制备。通过将所得的水溶液冻结干燥,从而进行粉末化。通过使所得的粉末在温度50~80 $^{\circ}$ C、更优选55~65 $^{\circ}$ C、相对湿度30~50%、更优选30~40%的条件下进行6小时以上的美拉德反应,由此可以制造本发明的复合体。

[0032] 在本实施方式中,调查了对蛋白1分子能结合最大几分子的糖(从氨基酸序列来预测),从两分子的结构、分子量预测反应效率,在此基础上设定摩尔比为几:几。虾原肌球蛋白及麦芽低聚糖由于分子量大致均匀,因此能够进行以上设定。在此次的虾原肌球蛋白的情况下,露出于分子表面的赖氨酸残基(可以与糖结合的氨基酸残基)有25个,考虑到寡糖的反应效率高而设为加入相对于虾原肌球蛋白1分子中的赖氨酸残基(25残基)为2倍的50分子的寡糖的设定。即设为原肌球蛋白1摩尔:寡糖50摩尔。如果在摩尔比或摩尔浓度下的溶液制备中物质(分子量)不同,则每1摩尔的质量也发生变化,因此溶液的质量%并不恒定。但是,考虑到与蛋白的溶解度或均匀性有关的溶液的粘性等,而使水溶液中的蛋白的合计含量适合为0.1%左右。

[0033] [实施例]

[0034] 对于有关对源自虾的原肌球蛋白的糖修饰的表位覆盖效果的实验结果进行说明。

[0035] 源自虾的原肌球蛋白从对虾的食用部分在非加热条件下进行提取并通过等电点沉淀法、硫酸铵分馏及离子交换色谱来纯化。

[0036] 在所生成的原肌球蛋白(Pen j1)的美拉德型糖修饰中,作为单糖,使用了葡萄糖,作为麦芽低聚糖,使用了D(+)-麦芽三糖、麦芽五糖、麦芽七糖,作为多糖,使用了半乳甘露聚糖。

[0037] 低分子量的糖类(除半乳甘露聚糖以外)以使Pen j1:糖=1:50的方式来混合,半乳甘露聚糖以重量比达到Pen j1的10倍的方式来混合,在恒温恒湿器内且在60℃、相对湿度35%的条件下,进行了干燥加热。糖修饰的确认利用SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法)解析来进行,表位覆盖效果的评价是使用患者血清并利用Dot blot解析来进行,测定了与IgE抗体的结合度。

[0038] 予以说明,SDS-PAGE解析依照一般所采用的Laemmli方法来进行。在0.1%蛋白溶液中加入同量的样品处理液后,作为泳动用样品。泳动用凝胶使用了预制凝胶e-PAGEL(凝胶浓度12.5%、ATTO株式会社、东京)。电泳使用EzRun泳动用缓冲溶液(ATTO株式会社)并使之以20mA进行泳动。泳动后,将蛋白用Ez Stain Aqua(ATTO株式会社)进行了考马斯染色。

[0039] 另外,复合体的抗原性评价利用Dot blot解析来进行。将PVDF膜(PVDF membrane)(Hybond-p、GE HEALTH CARE JAPAN株式会社、东京)浸渍于甲醇中使其亲水化后,浸渍于1×PBS中,进行了清洗。将各样品各以10μl点样于干燥后的PVDF membrane。使PVDF membrane干燥后,浸渍于包含5%的ECL Prime Blocking Reagent的PBS-Tween20中,在室温下振荡1小时,发生了封闭。将封闭的PVDF membrane用PBS漂洗后,用PBS-Tween20进行了清洗。在清洗后的PVDF membrane上加入用PBS-Tween20稀释了50倍后的虾阳性患者血清(22515-JH)2ml,使其在室温下反应1小时。反应后用PBS-Tween20进行清洗,之后,加入用PBS-Tween20稀释了4000倍的anti-Human IgE Antibody(抗人IgE抗体)-HRP 2ml,使其反应1小时后,用PBS-Tween20进行清洗,将发光基质(ECL Prime Western Blotting Detection Reagent、GEHEALTH CARE JAPAN株式会社)加入到PVDF membrane上,使其反应5分钟。基于抗原抗体反应的化学发光使用ChemiDoc XRS+(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)来进行拍摄。变换虾阳性患者血清(22429-HL、22596-AW),同样地进行了该Dot blot解析。

[0040] 进而,关于与IgE抗体的结合度的测定,对用ChemiDoc XRS+拍摄到的Dot blot解析图像,进行密度测定解析,将各点的浓度数值化。求出各点内的8处的平均值,再算出该复合体间的平均值,设为各复合体的结合度。将各混合物的干燥加热0小时设为100%,将各个干燥加热时间的结合度绘制成图表,利用基于t检验的统计处理来判定增减的显著差异。予以说明,图4及图5中的“***”表示p值不足0.005,“**”表示p值不足0.01。“*”表示p值不足0.05。

[0041] 图1为基于干燥加热的Pen j1的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0042] 图2为Pen j1及葡萄糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)。

[0043] 图3为Pen j1及D(+)-麦芽三糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot

blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0044] 图4为Pen j1及麦芽五糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0045] 图5为Pen j1及麦芽七糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)及与IgE抗体的结合度的结果(panel C)。

[0046] 图6为Pen j1及半乳甘露聚糖的复合体的SDS-PAGE解析的结果(panel A)、Dot blot解析的结果(panel B)。

[0047] 如图2所示,在Pen j1及葡萄糖的复合体中,在干燥加热3小时后确认到Pen j1的分子量发生数kDa的增加,但是其以后的样品的不溶化剧烈,无法进行解析。同样,如图3所示,在Pen j1及D(+)-麦芽三糖的复合体中,在所有的干燥加热样品中发生不溶化。

[0048] 如图4及图5所示,在Pen j1及麦芽五糖的复合体、Pen j1及麦芽七糖的复合体中,从1天后到14天后确认到Pen j1的高分子化。如图6所示,在Pen j1及半乳甘露聚糖的复合体中,从3天后到14天后确认到涉及从35kDa附近到超过约200kDa的广范围的Pen j1的高分子化。

[0049] 另外,如图4及图5所示,在Pen j1及麦芽五糖的复合体、Pen j1及麦芽七糖的复合体中,从干燥加热后经过6小时起,与anti-Pen j1IgE抗体的结合率显著降低,相对于未修饰虾原肌球蛋白(100%),可以降低至约40%。

[0050] 产业上的可利用性

[0051] 根据本发明,使纤维状蛋白和麦芽低聚糖通过美拉德反应而结合,由此可以降低纤维状蛋白的抗原性。

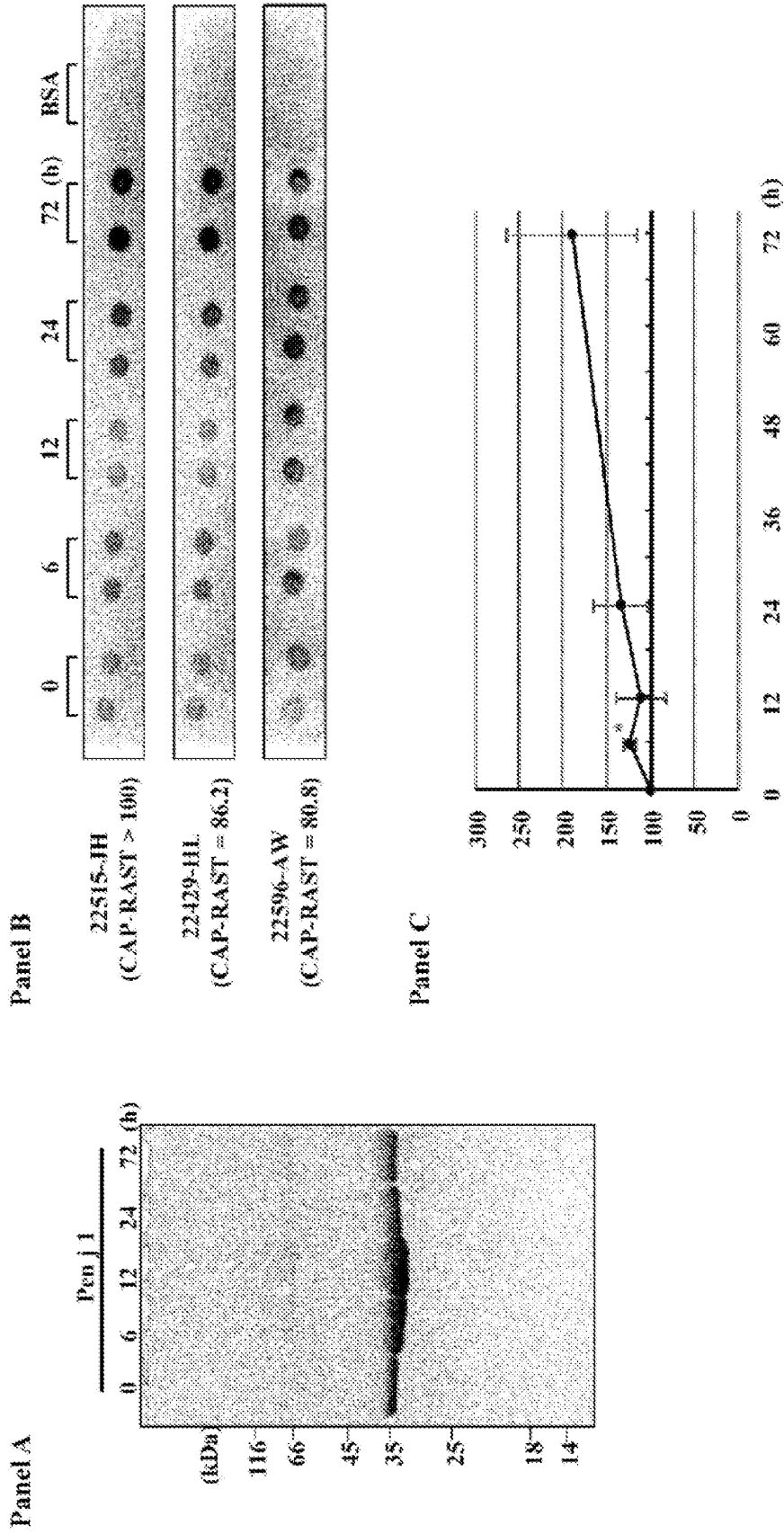


图1

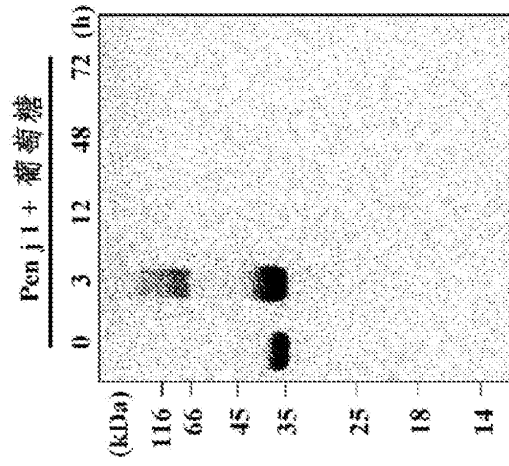


图2

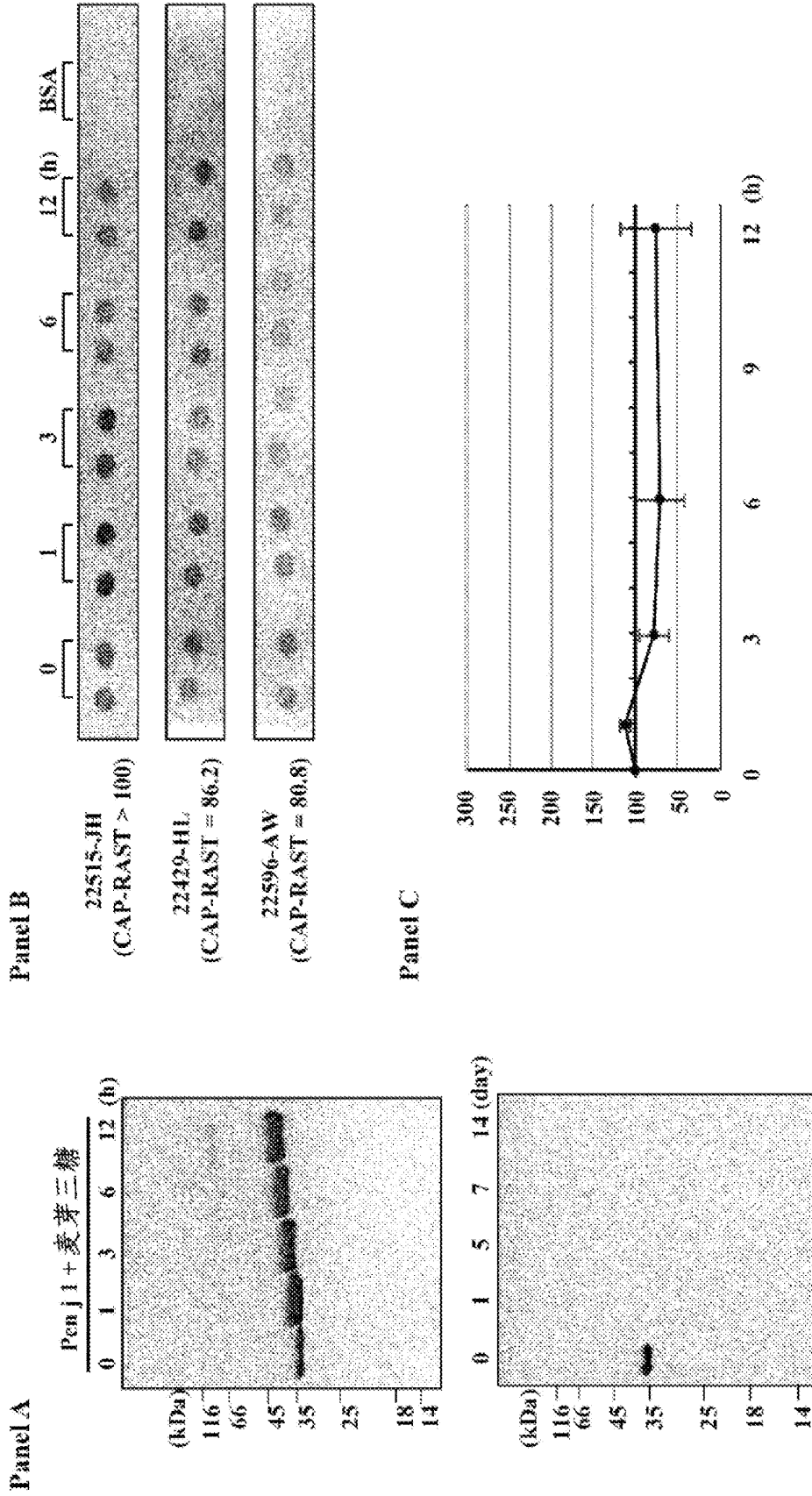


图3

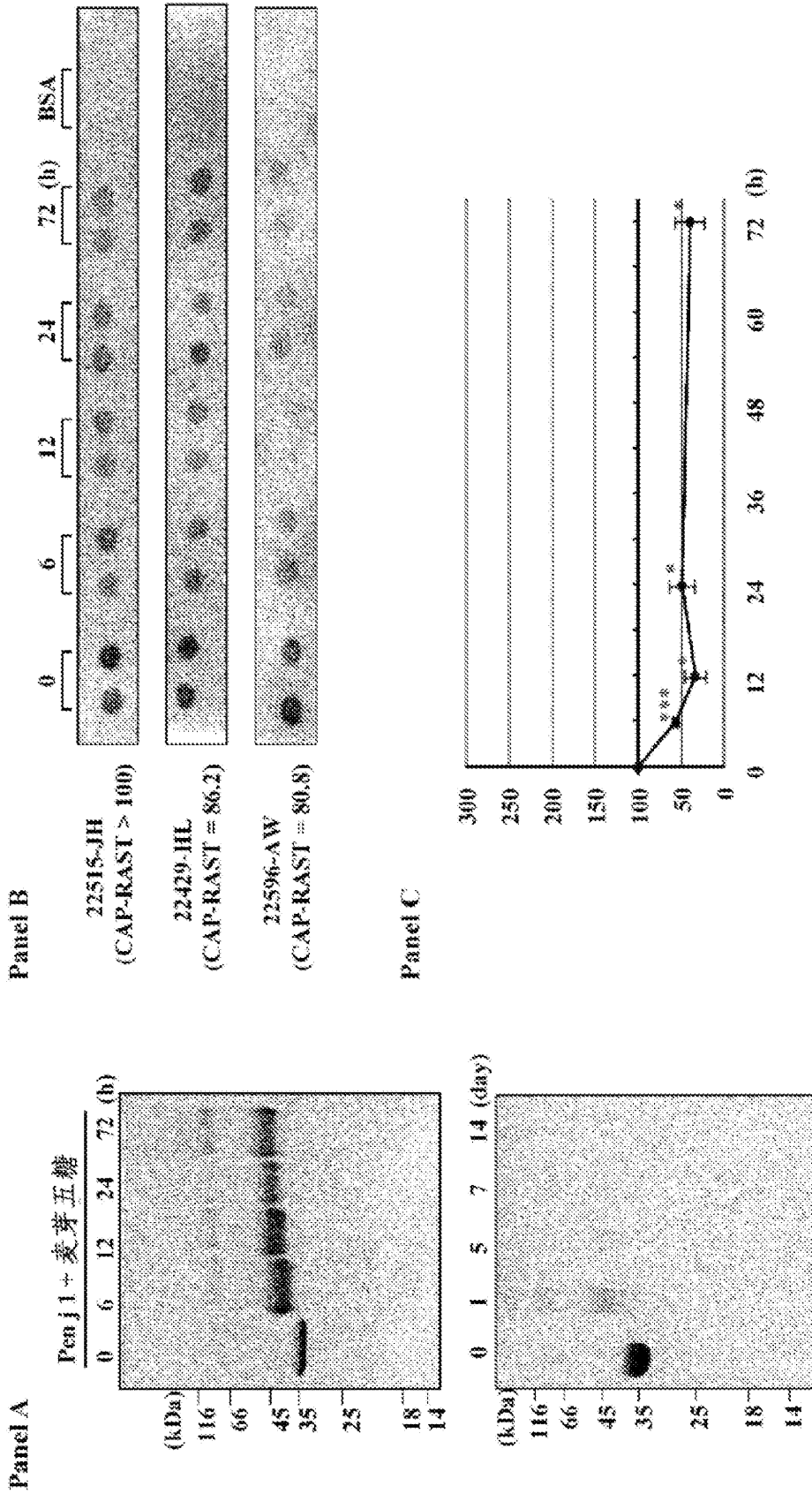


图4

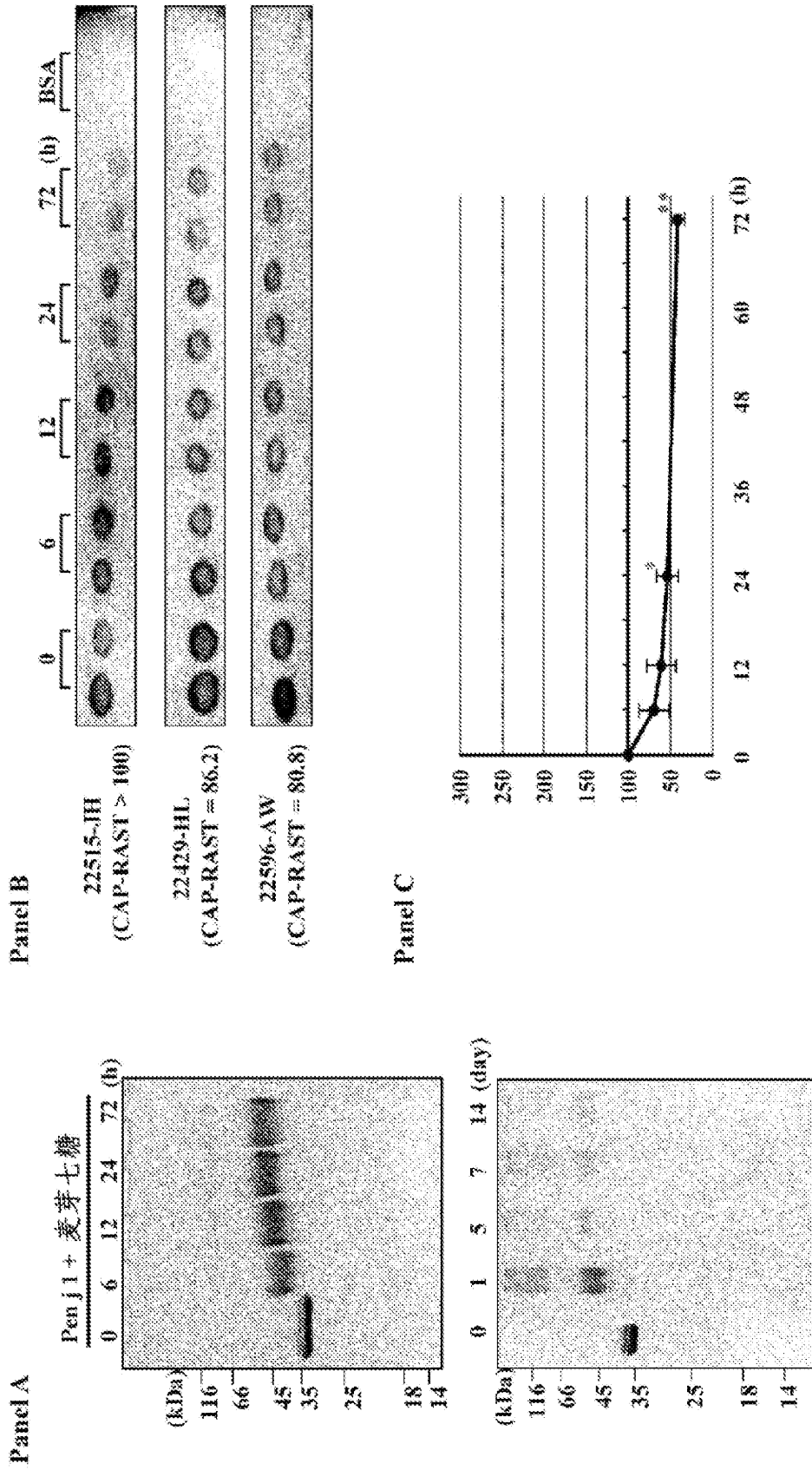


图5

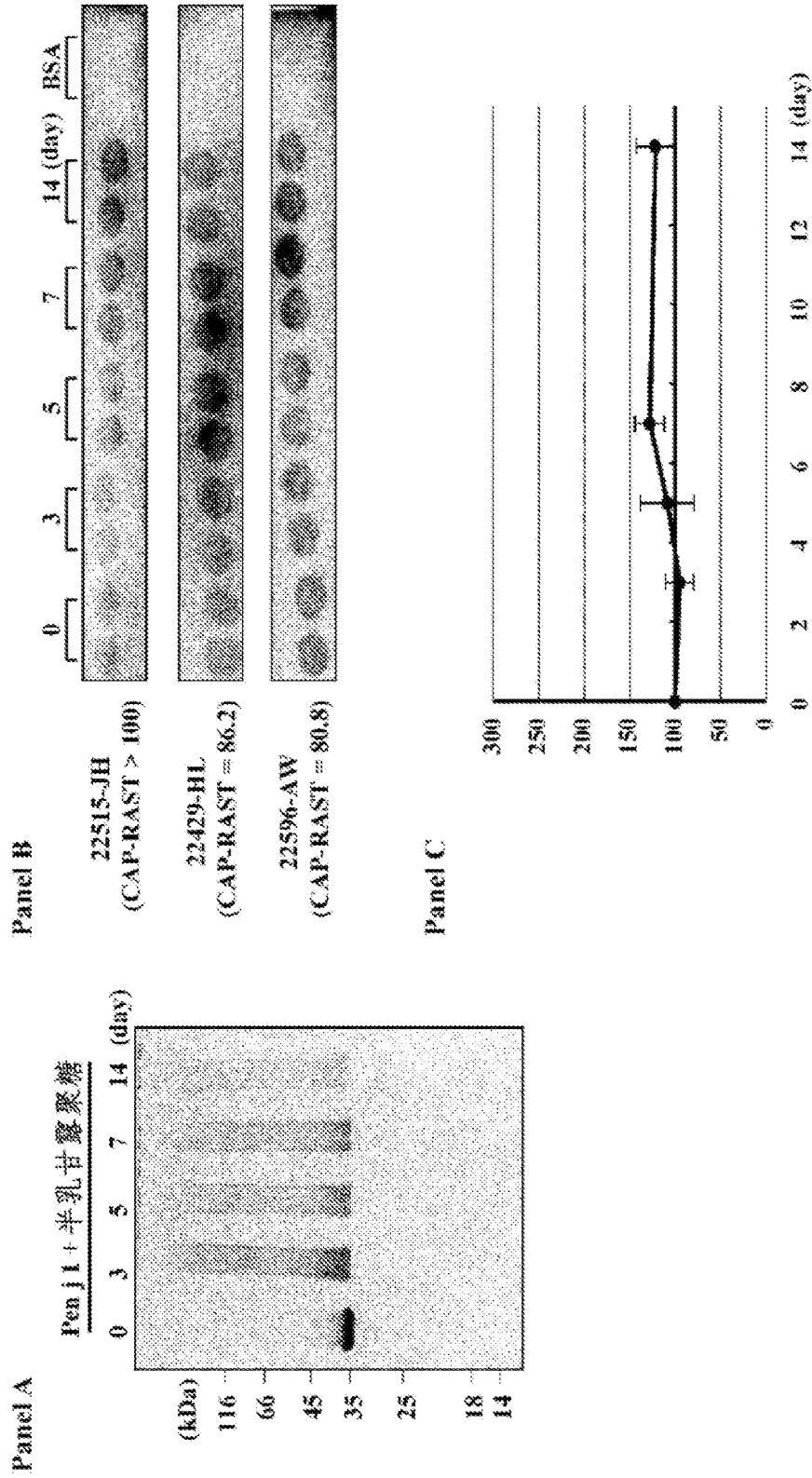


图6