

---

**Octrooiraad**



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8900652**

**Nederland**

⑲ **NL**

---

- ⑤4 **Primair-toxische stoffen of allergenen, isoleerbaar uit plantaardig materiaal, alsmede werkwijzen ter bereiding ervan en de toepassing ervan.**
- ⑤1 Int.Cl<sup>8</sup>: A61K 39/36.
- ⑦1 Aanvrager: Laboratorios Leti, S.A. te Barcelona, Spanje.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.  
Nederlandsch Octrooibureau  
Scheveningseweg 82  
2517 KZ 's-Gravenhage.

- 
- ⑳ Aanvraag Nr. 8900652.
- ㉔ Ingediend 16 maart 1989.
- ㉓ --
- ㉒ --
- ㉑ --
- ㉐ --
- ㉏ --

- 
- ㉓ Ter inzage gelegd 16 oktober 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

Primair-toxische stoffen of allergenen, isoleerbaar uit plantaardig materiaal, alsmede werkwijzen ter bereiding ervan en de toepassing ervan.

5 De uitvinding heeft betrekking op primair-toxische stoffen of allergenen, isoleerbaar uit plantaardig materiaal, alsmede werkwijzen ter bereiding ervan en de toepassing ervan.

Hooikoorts is een bekende volksziekte waaraan 5% van de bevolking kan lijden. De ziekteverschijnselen kunnen zich voordoen vanaf het  
10 vroege voorjaar tot in de herfst, en zijn gekenmerkt door herhaaldelijk niezen, overvloedig waterig neus-secret, tranende ogen en opgezwollen oogleden, soms gepaard met galbulten over het lichaam, benauwdheid tot zelfs astma, en een algeheel gevoel van moeheid en malaise. Patienten die ieder jaar weer aan deze ziekte lijden zijn hiervoor genetisch ge-  
15 predisponeerd, ofwel "atopisch". Sedert de onderzoeken van Bostock en Blackley in de vorige eeuw is bekend dat dergelijke patienten allergisch zijn voor het stuifmeel ("het pollen") van bloeiende grassen, bomen of andere gewassen en dat de ziekteverschijnselen zich voordoen onder die klimatologische omstandigheden waarbij er tijdens de bloeitijd veel  
20 stuifmeelkorrels in de lucht zijn; als meer wetenschappelijke naam voor de ziekte wordt dan ook de benaming "pollinosis" gebruikt. De in deze stuifmeelkorrels voorkomende oorzakelijke verbindingen worden "allergenen" genoemd. Het is de laatste jaren duidelijk geworden dat patienten met een ernstige vorm van pollinosis veelal tevens een intolerantie  
25 vertonen tegen bepaalde voedingsmiddelen als vers fruit en bepaalde kruiden van plantaardige oorsprong.

Naar de chemische aard van de pollen-allergenen is sedert het begin van de twintigste eeuw onderzoek verricht. Als detectie-methode werd daarbij voornamelijk gebruik gemaakt van de waarneming dat waterige  
30 extracten van het pollen bij applicatie in of op de huid van hooikoortslidgers na 20-30 minuten een "erytheem-en-kwaddel" reactie opwekken, welke bij niet-allergische personen niet wordt waargenomen. Deze reactie wordt toegeschreven aan de aanwezigheid in bloed en weefsels van een bepaalde klasse van antistoffen, zgn. "reaginen", welke een reactie met de  
35 pollen-allergenen aangaan en daarmee uiteindelijk de oorzaak zijn van het lokaal vrijkomen van fysiologisch actieve biogene aminen en andere mediators. Deze antistoffen kunnen met het bloedserum van hooikoortspatienten worden overgedragen op de huid van normale proefpersonen; door de ontdekking van deze passieve overdrachtsreactie van reaginen kwam  
40 midden twintiger jaren een detectie-methode beschikbaar welke eveneens

voor de isolatie en identificatie van de pollen-allergenen kon worden toegepast. Nadat het tenslotte in 1966 gelukt was om deze "reaginen" te identificeren en te kwantificeren als het IgE isotype van immunoglobuline-antistoffen kwamen tenslotte methoden beschikbaar om allergenen ook te meten met behulp van relatief eenvoudige laboratorium-methodieken als 5 bijv. de radio-allergo-sorbent test (RAST). Laatstgenoemde methodiek is sedertdien op grote schaal toegepast voor de isolatie en identificatie van allergenen uit extracten van stuifmeel, alsmede voor de laboratorium-diagnostiek van allergische ziekten. Deze toepassing gaat uit van 10 een universeel mechanisme van allergische reacties, in alle gevallen gemedieerd door allergeen-specifieke IgE-antistoffen, doch gaat voorbij aan het feit dat in welhaast 40% van de gevallen van allergie bij de mens een interventie door IgE-antistoffen niet is aan te tonen.

Het is een algemeen aanvaarde opvatting dat de oorzakelijke allergenen in pollen en voedingsmiddelen in chemisch opzicht te karakteriseren 15 zijn als eiwitten, in het algemeen met een molecuulgewicht van 25000-65000 Dalton. Deze allergene eiwitten passeren niet door de gebruikelijke dialyse-membranen met een cut-off van 6000-12000 Dalton en zijn derhalve relatief gemakkelijk te scheiden van de grote overmaat aan 20 laagmoleculaire (minder dan 5000 Dalton) en naar algemene opvatting niet-allergene bestanddelen in waterige extracten van stuifmeel. Bij onderzoek van het niet-dialyzeerbare allergene gedeelte van zulke extracten met behulp van o.a. electroforetische scheidings- en analyse-technieken is vervolgens gebleken dat dergelijke allergeen-oplossingen 25 in feite multipel zijn. Wanneer na electroforetische scheiding en fixatie van de samenstellende eiwitten van pollen-extracten het bindingspatroon wordt nagegaan voor IgE-antistoffen uit het bloedserum van hooikoortspatienten, dan blijken er per individuele stuifmeelsoort tot meer dan 30 verschillende IgE-bindende allergenen te bestaan die, al 30 naar gelang de concentratie-verhouding, worden onderverdeeld in zgn "major" en "minor" allergenen. Niettemin blijken de bindingspatronen - of "allergogrammen" - voor iedere hooikoorts-patient in kwalitatief en kwantitatief opzicht verschillend te zijn.

Er zijn in het verleden enkele wetenschappelijke rapporten gepubliceerd welke zich hebben beziggehouden met het mogelijk allergene 35 karakter van de laagmoleculaire bestanddelen van waterige extracten van stuifmeel, d.w.z. van dialyzeerbare stoffen tot een moleculairgewicht van maximaal 10 000 Dalton (Moore MB and Moore EE. J Am Chem Soc 1931; 53: 2744-6; Unger L, Cromwell HW, Moore MB. J Allergy 1932; 3: 253-6; 40 Johnson MC, Hampton SF, Schiele AW, Frankel S. J Allergy 1954; 25: 82-3;

8900052.

Malley A, Campbell DH, Heimlich EM. J Immunol 1964; 93: 420; Attalah NA, Sehon AH. Immunochemistry 1969; 6: 609-19; Girard JP, Berger F, Hampai A. Int Arch Allergy 1973; 45:40-2; Lapkoff CB, Goodfriend L. Int Arch Allergy 1974; 46: 215-29; Vik H, Elsayed S, et al. Int Archs Allergy appl Immun 1982; 68: 70). Uit deze onderzoeken is naar voren gekomen dat genoemde laagmoleculaire componenten in allergologisch-immunologisch opzicht irrelevant zijn. Voor het overige hebben deze stoffen tot dusver slechts aandacht gekregen vanuit de volkse opvatting van de mogelijke gezondheids - bevorderende aspecten van pollen en daaruit gewonnen stoffen, bijvoorbeeld als tumor-remmende middelen (Europees octrooischrift 220 453; Duits octrooischrift 1.467.750; Amerikaans octrooischrift 3,360,437; Oostenrijks octrooischrift 255.643).

De algemeen aanvaarde opvatting dat allergenen in stuifmeel en in (de kruisreagerende) voedingsmiddelen volwaardige eiwitten zijn heeft niettemin een aantal klinische waarnemingen niet kunnen verklaren. Hooikoorts-patienten kunnen ernstige ziekteverschijnselen vertonen ook als er geen stuifmeel in de ademhalingslucht aantoonbaar is, bijv. in natte seizoenen of in het centrum van grote steden. In zeer ernstige gevallen beperken de klachten zich niet tot de reacties van het neusslijmvlies, maar ontwikkelt zich een zgn. "pollen-astma", ondanks het feit dat pollenkorrels te groot zijn om in de bronchiën te kunnen doordringen en daar ook nooit in zijn aangetoond. Recentelijk zijn er bovendien waarnemingen gedaan waaruit blijkt dat huidreactieve en IgE-bindende stoffen met de karakteristieken van pollen-allergenen in de omgevingslucht voorkomen welke een aanzienlijk kleinere deeltjesgrootte hebben dan voor de stuifmeelkorrels te verwachten (Busse WW, Reed CE, Hoehne JH. J Allergy Clin Immunol 1972; 50: 289-93; Solomon WR. J Allergy Clin Immunol 1984; 74: 674-7). Voor al deze waarnemingen is tot heden geen verklaring gevonden.

Dankzij de onderhavige uitvinding is het mogelijk alle bovengenoemde waarnemingen te verklaren. Gevonden werden primair-toxische laagmoleculaire verbindingen, die kunnen voorkomen in de vorm van stoffen met een hoge vluchtigheidsgraad (of dampspanning), dat wil zeggen als etherische olie, of in de vorm van in water oplosbare glycoside-derivaten van dergelijke vluchtige stoffen.

De uitdrukking "primair-toxische stoffen", die in de onderhavige beschrijving en conclusies wordt gebezigd, is een in de allergologie en dermatologie algemeen aanvaarde term, waarmee stoffen bedoeld worden met een intrinsieke eigenschap tot conjugatie, dat wil zeggen een hoge capaciteit tot het vormen van conjugaten met sulphydryl- of aminogroepen in

eiwitten of peptiden. Indien de primair-toxische stoffen op de menselijke huid worden aangebracht vindt bij iedereen een obligaat-toxische werking plaats, zoals kan worden opgemaakt uit blaarvorming, maar ook uit sensibilisatie, welke uiteindelijk leidt tot een contact-eczeem.

5 Opgemerkt wordt, dat in het laatste geval de stoffen, die een dergelijke reactie veroorzaken, ook wel als allergenen worden aangeduid.

De vluchtige verbindingen volgens de uitvinding geven door inhalatie een sensibilisatie langs de slijmvliezen. Door conjugatie geven zij aanleiding tot de vorming van eiwit-hapteenconjugaten, waartegen IgE  
10 gericht wordt en waarmee een zogenaamde immediate-type allergie wordt geïnduceerd.

De uitvinding betreft derhalve primair-toxische stoffen met een molecuulgewicht van minder dan 12000 Dalton, isoleerbaar uit plantaardig materiaal, die potentiële IgE-bindende allergenen zijn of kunnen worden  
15 voor daartoe gepredisponeerde individuen.

De IgE-bindende activiteit van de stoffen volgens de uitvinding is in het algemeen veel geringer dan de overeenkomstige activiteit van de stoffen, waarvan tot dusver werd aangenomen dat zij de oorzakelijke allergenen waren (dat wil zeggen eiwitten met een molecuulgewicht in de  
20 orde van grootte van 25000-65000 Dalton).

De uitvinding betreft in het bijzonder primair-toxische stoffen, die electrofiel zijn en gekenmerkt door de eigenschap tot conjugatie met aminozuren of (poly)peptiden door nucleofiele additie of substitutie bij  
een temperatuur beneden 40°C.

25 De primair-toxische stoffen volgens de uitvinding, die niet in de vorm van glycosiden verkeren, zijn oplosbaar in met water niet mengbare organische oplosmiddelen.

De stoffen volgens de uitvinding kunnen ook in de vorm van in water oplosbare glycosiden verkeren. Dergelijke glycosiden zijn bijvoorbeeld derivaten van alifatische of alicyclische terpenoïde-verbindingen,  
30 die bijvoorbeeld via een exocyclische methyleengroep aan het koolhydraat gebonden zijn.

Overigens behoren de primair-toxische stoffen of allergenen volgens de uitvinding in het algemeen tot de groep van de mono- of sesqui-  
35 terpenoïden met een of meer reactieve carbonyl-, epoxy- of vinylgroepen, of tot de groep van de gesubstitueerde ortho- of para-benzochinonen.

De uitvinding heeft tevens betrekking op werkwijzen voor het isoleren van primair-toxische stoffen of allergenen uit plantaardig materiaal, bijvoorbeeld uit het stuifmeel van grassen, bomen, heesters en  
40 andere gewassen, alsmede uit voedingsmiddelen, waarbij deze werkwijze

8900052.

wordt gekenmerkt doordat men uit plantaardig materiaal stoffen met een molecuulgewicht van minder dan 12000 Dalton afscheidt. Voor het identificeren van de stoffen, die men wenst te verkrijgen, kan men gebruik maken van de IgE-bindende activiteit.

5 Volgens een uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding kan men een waterig extract van plantaardig materiaal onderwerpen aan een behandeling met een dialyse-membraan, een ultrafilter of een moleculaire zeef, waarbij men een scheiding in een hoogmoleculaire fractie (molecuulgewicht groter dan 12000 Dalton) en een laagmoleculaire fractie  
10 (molecuulgewicht kleiner dan 12000 Dalton) tot stand brengt. Vervolgens kan men de fractie van het plantaardige materiaal, waarin zich geen stoffen met een molecuulgewicht van meer dan 12000 bevinden, extraheren met een organisch oplosmiddel, water of een bufferoplossing, bij voorkeur met een pH van 6-7,5.

15 Het is ook mogelijk plantaardig materiaal, waaruit eventueel stoffen met een molecuulgewicht van meer dan 12000 zijn verwijderd, aan een stoomdestillatie te onderwerpen. Een dergelijke werkwijze verdient de voorkeur indien men beschikt over plantaardig materiaal dat niet aan een drogingsproces of aan een ontvetting is blootgesteld geweest.

20 Bij voorkeur zal men plantaardig materiaal, waaruit eventueel stoffen met een molecuulgewicht van meer dan 12000 zijn verwijderd, eerst extraheren met een met water niet-mengbaar organisch oplosmiddel, dat in het bijzonder vluchtig is, en het verkregen extract vervolgens  
25 in het plantaardig materiaal voor of tijdens de stoomdestillatie te hydrolyseren, bijvoorbeeld in alkalische waterige oplossing, die in het bijzonder een pH van 9-11 bezit. Het stoomdestillaat bevat dan de primair-toxische stoffen volgens de uitvinding, die door extractie met in water niet-mengbaar organisch oplosmiddel kunnen worden gewonnen.

30 Uiteraard zal men bij de bovengenoemde behandelingen volgens de uitvinding - met uitzondering van de stoomdestillatie - zoveel mogelijk bij lage temperatuur, bijvoorbeeld lager dan 10°C werken om ontleding van de gewenste stoffen te vermijden.

De uitvinding heeft eveneens betrekking op de toepassing van de  
35 primair-toxische stoffen of allergenen, die volgens de werkwijzen van de uitvinding verkrijgbaar zijn. Zo kunnen deze stoffen worden gebruikt voor de bereiding van eiwit-conjugaten met allergene eigenschappen, waarbij de genoemde stoffen worden gekoppeld aan een dragereiwit. Een geschikt dragereiwit is niet-allergeen en bezit een molecuulgewicht van  
40 ten minste 20000 Dalton. Daarnaast bevat het eiwitmolecuul ten minste

8900652

twee cysteine-aminozuurgroepen. De stoffen volgens de uitvinding worden aan het dragereiwit gekoppeld volgens in de stand van de techniek bekende methoden. Bij voorkeur vindt een koppeling of conjugatie plaats door interactie in waterig milieu, dat wil zeggen in oplossing, emulsie  
5 of dispersie bij een temperatuur van 20-40°C en een pH van 8,5-11.

Het zal duidelijk zijn, dat de stoffen volgens de uitvinding of de preparaten, die volgens de werkwijze van de uitvinding kunnen worden bereid, voor dezelfde doeleinden kunnen worden toegepast als de stoffen, die tot dusver als allergenen werden beschouwd. Dat wil zeggen, dat de  
10 onderhavige stoffen bijvoorbeeld kunnen worden toegepast in testkits of desensibilisatiepreparaten.

Derhalve heeft de uitvinding tevens betrekking op de toepassing van de gevonden/geïsoleerde stoffen voor de bereiding van preparaten geschikt voor de behandeling van allergie en op de toepassing voor ana-  
15 lytische doeleinden en standaardisatie.

De uitvinding wordt gedemonstreerd aan de hand van de Voorbeelden, welke tevens de werkwijzen toelichten voor de isolering van genoemde primair-toxische stoffen of de glycosiden daarvan. De uitvinding laat tevens in de Voorbeelden V en VI zien dat het met behulp van de geïso-  
20 leerde primair-toxische stoffen mogelijk is om de conjugatie-reactie met eiwitten buiten het lichaam uit te voeren en aldus halfsynthetische hoogmoleculaire ~~verbindingen~~ ~~samen~~ te stellen welke als IgE-bindend allergeen voor experimentele doeleinden en voor klinische toepassing kunnen worden gebruikt.

In Voorbeeld I wordt de werkwijze beschreven voor het ontvetten en de extractie van het stuifmeel van de grassoort *Lolium perenne* L. met waterige buffer-oplossing. De scheiding in dialyzeerbare (LMWT) en niet-dialyzeerbare (HMWT) componenten wordt toegelicht, alsmede het gebruik van het niet-dialyzeerbare allergeen-gedeelte HMWT voor het aantonen van  
30 IgE-antistoffen in het bloedserum van hooikoorts-patienten. In het geval van *Lolium perenne* bevat het ongefractioneerde dialyzeerbare gedeelte LMWT echter componenten welke m.b.v. enzyme immunoassay methoden eveneens geschikt zijn voor de kwantitatieve meting van IgE-antistoffen. Scheiding van het laagmoleculaire deel door percolatie over kolommen met  
35 moleculaire zeef-materialen laat zien dat deze IgE-bindende stoffen - welke ca 500-1000 x minder potent zijn dan HMWT- een molecuulgrootte hebben van 5000-10000 Dalton. De ultraviolet absorptiespectra van deze fracties tonen aan dat aan het peptide-deel in ieder geval koolhydraten en niet-flavonoïde pigmenten geconjugeerd zijn.

40 In het geval van de pollen van het (on)kruid *Artemisia vulgaris* L.

8900052.

in Voorbeeld II zijn de molecuulgewichten van de afzonderlijke IgE-bindende LMWT componenten van dezelfde grootte-orde als die van LMWT componenten van *Lolium perenne*. Opmerkelijk is dat *Artemisia* LMWT preparaten een hoge concentratie vertonen aan wateroplosbare flavonoïde-conjugaten, welke echter niet verantwoordelijk zijn voor de allergene activiteit. De actieve LMWT-fracties zijn hygroscopisch en bevatten naast koolhydraat ook geconjugeerde UV-absorberende chromofore groepen welke non-flavonoid zijn. Door een hier voor het eerst toegepaste vorm van "immunoblotting-inhibitie" kon worden aangetoond dat de meest potente LMWT-fracties chemische structuur-determinanten bevatten welke door alle IgE-antistoffen tegen alle HMWT-allergenen wordt herkend. Daarmee is duidelijk geworden dat deze HMWT allergenen niet "multipel" zijn omdat onderling verschillende eiwitstructuren individueel immunologisch herkend worden, maar omdat deze eiwitten in verschillende verhouding steeds dezelfde laagmoleculaire chemische hapteen-structuur dragen.

In Voorbeeld III worden de LMWT componenten geïsoleerd en in fracties gescheiden uit het pollen van de in het Middellandse Zeegebied zeer verspreide plant *Parietaria judaica* L. Van deze vorm van overgevoelighed is klinisch zeer duidelijk dat bij de bevolking zowel zuiver toxische als allergische reacties kunnen voorkomen. Het stuifmeel is moeilijk in zuivere toestand te verkrijgen en is meestal verontreinigd met ca 25% andere plantendelen. De extracten zijn mede daarom zeer rijk aan pigmenten, waaronder chlorophyl. De werkwijze toont ook hier aan dat zulke pigmenten, al dan niet in glycosidische binding, in allergologisch opzicht inactief zijn. Dit is eveneens gedemonstreerd in Voorbeeld IV dat de werkwijze beschrijft voor het eveneens pigment-rijke pollen van *Betula alba* L. In het geval van deze boompollen zijn de actieve dialyzeerbare componenten lager van moleculairgewicht dan in de voorgaande Voorbeelden. In samenhang met de negatieve resultaten met *Betula alba* LMWT voor gebruik in enzyme immunoassay voor IgE-antistoffen toont dit aan dat allergologisch potente allergenen minimaal bivalent moeten zijn t.a.v. het aantal IgE-bindende haptenen per drager-molecuul. Tevens blijkt uit de werkwijze in dit Voorbeeld dat de meest potente allergenen worden verkregen door vòòr de waterige extractie het stuifmeel niet te ontvetten met een organisch oplosmiddel, hetgeen de aanwezigheid van reactieve hapteen-precursors en dus de primair-toxische stoffen in de "pollen-olie" aannemelijk maakt. In Voorbeeld V wordt een werkwijze beschreven waarbij deze hapteen-precursors als (vluchtige) organische verbindingen door behandeling in alkalisch milieu worden vrijgemaakt in de reactieve vorm. Door reactie van deze primair-toxische stoffen met de

8900052.9



nagenoeg inactieve pollen-eiwitten van de aan de berk botanisch verwante hazelaar (*Corylus avellana* L.) kan vervolgens een semi-synthetisch hoogmoleculair, multivalent en IgE-bindend berke-pollen allergeen worden samengesteld. In Voorbeeld VI wordt een werkwijze beschreven waarbij de  
 5 reactieve primair-toxische stoffen rechtstreeks door stoomdestillatie uit de onbehandelde stuifmeelkorrels of uit de geconcentreerde dialyzeerbare waterige extracten kunnen worden gewonnen. Tenslotte wordt hun identiteit als mono-of sesquiterpenoiden aannemelijk gemaakt.

10

VOORBEELD I

Een hoeveelheid van 100 gram microscopisch zuivere gedroogde pollen van *Lolium perenne* (Biopol Laboratories, California, U.S.A.) werd geëxtraheerd in een Soxhlet apparaat met droge diethylether tot de  
 15 extractievloeistof kleurloos was (ca 6 uur). De ether-fase werd onder een koude luchtstroom drooggedampt en het residu werd opgenomen in 96% ethylacohol. Pollen preparaten bevatten in het algemeen 5 - 10% van hun drooggewicht aan stoffen welke in organische oplosmiddelen als ethyl-ether, petroleumether, ethylacetaat e.d. oplosbaar zijn. Het ontvette  
 20 pollen-residu werd gedroogd aan de lucht, gewogen, en gedurende 2 uur onder roeren geëxtraheerd bij kamertemperatuur met 500 ml gedestilleerd water. Na centrifugatie werd het residu nogmaals op dezelfde wijze geëxtraheerd. De gecombineerde extracten werden vervolgens gedialyzeerd gedurende 4 uur bij + 4°C (Visking membrane, nominale cut-off 10000  
 25 daltons) tegen 2 liter gedestilleerd water. Het eerste dialysaat (buitenvloeistof) werd geheel gelyofiliseerd en leverde een hygroscopisch product op, dat werd opgenomen in 50 ml gedestilleerd water en als LMWT-product werd bewaard bij -40°C. Het retentaat werd gedurende nogmaals 24 uur verder gedialyzeerd tegen regelmatig verversst water en  
 30 tenslotte gelyofyliseerd tot het HMWT-product. De opbrengst aan HMWT voor de graspollen van de Gramineae familie is doorgaans 8-10%.

Voor de meting van IgE-antistoffen tegen de laagmoleculaire componenten werden de cupjes van polystyreen microtiter vlakbodem platen (Dynatech) voorbehandeld met de LMWT-producten welke met 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>  
 35 waren voorverdund tot een optische dichtheid bij 275 nm van 1.0 in 1 cm kwarts cuvetten; de verdunningsfactor lag in de orde van 20-35. De cupjes werden na indrogen van de LMWT-componenten geincubeerd met verdund patientenserum en tenslotte verder behandeld met een peroxidasegelabelled antiserum van de geit tegen humaan IgE in 1 : 400 verdunning (TAGO  
 40 Laboratories, California, U.S.A.). Tenslotte werd de kleur ontwikkeld

0900652.

met een peroxidase-substraat. De op deze wijze te evalueren kwantitatieve IgE-binding door LMWT of subfracties daarvan representeert een diagnostische laboratorium-methodiek welke statistisch significant correleert met de gangbare RAST-resultaten voor IgE-binding door HMWT-allergenen, zoals in Figuur 1 gedemonstreerd.

Voor de scheiding van het LMWT-product werd een hoeveelheid van 2.5 ml van het ontdooide LMWT concentraat gepercoleerd over de moleculaire zeef Sephadex G25 Fine (Pharmacia AB, Uppsala, Zweden) gesuspenderd in gedestilleerd water. De kolom werd vervolgens geëluëerd met gedestilleerd water en de effluent vloeistof werd in separate fracties opgevangen. Voor preparatieve doeleinden kan dezelfde kolom voor herhaalde applicatie van LMWT worden gebruikt. In dit Voorbeeld werden op basis van het elutiepatroon in Figuur 2 de fracties in 4 pools verzameld, met als opbrengsten: Pool I (kleurloos) = 11 mg, Pool II (geel, hygroscopisch, opgenomen in 5 ml aquadest), Pool III (geel) = 3 mg, Pool IV (geel) = 0.5 mg. De ultraviolet-absorptiespectra van deze gescheiden laagmoleculaire fracties zijn in Figuren 4 en 5 weergegeven.

Voor de bepaling van de IgE-bindende capaciteit van LMWT en de subfracties werd gebruik gemaakt van de algemeen gebruikelijke methodiek van de RAST-inhibitie. De resultaten zijn in Figuur 3 grafisch weergegeven.

#### VOORBEELD II

Een hoeveelheid van 25 gram gedroogd stuifmeel van *Artemisia vulgaris* (Greer Laboratories, Lenoir, N.C., U.S.A., lot nr. 85 Y 47 - 7 B) werd ontvet met diethylether, geëxtraheerd met gedestilleerd water en gescheiden in de HMWT en LMWT fracties zoals in Voorbeeld I beschreven. De opbrengst aan HMWT product was 8.4% uitgaande van de gedroogde en niet-ontvette pollen. De LMWT-fractie werd vervolgens gescheiden door percolatie over een kolom Sephadex G25 Fine in gedestilleerd water volgens de beschrijving in Voorbeeld I. Het elutiediagram is in Figuur 6 weergegeven. De verzamelde opbrengst van 3 runs van 2 ml LMWT elk was: Pool I = 133 mg, Pool II (hygroscopisch, opgenomen in 2 ml gedestilleerd water), Pool III = 5.1 mg, Pool IV = 4.5 mg. De IgE-bindende capaciteit werd vastgesteld door RAST-inhibitie en is in Figuur 7 kwantitatief aangegeven. De binding van specifieke IgE-antistoffen werd tevens aangetoond als volgt. Het serum (250  $\mu$ l) van een patient met hoge IgE-titer tegen de HMWT-allergenen van *Artemisia vulgaris* (# 880528, RAST-waarde in onverdund serum 41%) werd voorgeïncubeerd met 50  $\mu$ l van een 1% op-

8900652.

lossing van respectievelijk de Artemisia LMWT subfracties I, II, III en IV. De HMWT fractie in 4% oplossing werd gescheiden door isoelectrisch focuseren in polyacrylamide gel, gevolgd door "Western blotting" (d.i. electroforetische overdracht) op nitrocellulose vel. De nitrocellulose afdruk werd daarna gedurende 2 uur behandeld met de serum-LMWT mengsels in 1:10 verdunning. Vervolgens werd behandeld met een peroxidase-gemerkt antiserum tegen humaan IgE, waarna tenslotte door incubatie met een peroxidase-substraat de kleur werd ontwikkeld. Deze experimenten toonden aan dat de IgE-antistoffen in het patientenserum tegen alle hoogmoleculaire Artemisia-allergenen door de LMWT-subfracties geblokkeerd werden, waarbij de blokkerings-capaciteit van deze subfracties dezelfde kwantitatieve verhouding te zien gaf als de RAST-inhibitie. Subfracties I en II bevatten derhalve alle determinanten welke als haptenen over de hoogmoleculaire allergenen verspreid zijn. De ultraviolet absorptiespectra van de IgE-bindende fracties I en II, en van de niet-allergene fracties III en IV zijn afgedrukt in respectievelijk Figuur 8 en 9.

#### VOORBEELD III

Het droge stuifmeel van de plant *Parietaria judaica* (ALLERGON AB, Zweden) werd geëxtraheerd en in fracties gescheiden volgens de in Voorbeeld I beschreven werkwijze. De opbrengst aan HMWT-preparaat uit dit pollen ligt voor verschillende monsters tussen 2.5 en 3.5 gewichts-%. De onderverdeling van de LMWT-fractie in 4 subfracties is grafisch weergegeven in Figuur 10. De gezamenlijke opbrengst van de onderscheiden Pools van 3 runs van 1.5 ml LMWT-oplossing was: Pool I (bruin, 13.8 mg), Pool II (bruingekleurd, hygroscoopisch, na lyofilisatie opgenomen in 7 ml water), Pool III (geelgekleurd, 7.2 mg), Pool IV (geel, 6.9 mg).

De resultaten van de IgE-bindingsproeven door RAST-inhibitie in relatie tot het HMWT-product zijn in Figuren 11 en 12 vermeld. De ultraviolet absorptiespectra van de actieve subfracties I en II en van de inactieve fracties III en IV zijn afgedrukt in respectievelijk Figuur 13 en 14. De structurele interpretatie van de spectra volgt uit Tabel 1.

TABEL 1: Extinctiecoëfficiënten bij pH 9.4 van laagmoleculaire componenten uit waterige extracten van *Parietaria judaica* pollen in relatie tot enkele kristallijne flavonoiden en -glycosiden.

5

Fractie	E(1%, 1 cm) <sub>275</sub>	E(1%, 1 cm) <sub>325</sub>	E(1%, 1 cm) <sub>395</sub>	E <sub>395/325</sub>	E <sub>395/275</sub>
10 POOL I	64.3	37.5	32.5	0.87	0.51
POOL II	n.d.	n.d.	n.d.	1.35	0.46
POOL III	255	145	225	1.55	0.88
POOL IV	430	203.8	372.5	1.83	1.15
RUTIN	1620	630	1340	2.13	0.83
15 APIGENIN	850	450	970	2.15	1.14
RHOIFOLIN	74		182		2.46

20

#### VOORBEELD IV

Een hoeveelheid van 25 gram gedroogd stuifmeel van de berke-boom (*Betula alba* L., GREER Laboratories Lenoir, NC, U.S.A., batch nr. 46Y80-4) werd ontvet met diethylether en daarna 2 x geëxtraheerd, telkens met 200 ml gedestilleerd water volgens de werkwijze beschreven in Voorbeeld I. Uit dit extract werden de HMWT en LMWT producten bereid, met een opbrengst HMWT van 2.3 gewichts-%. De waterige LMWT-fractie werd vervolgens in 5 subfracties gescheiden volgens de werkwijze in Voorbeeld I; het scheidingspatroon en de afgezonderde subfracties zijn in Figuur 15 weergegeven. De opbrengsten uit in totaal 6 ml geconcentreerde LMWT-oplossing waren: Pool I (fracties 14-24, kleurloos en hygroscopisch, na vriesdrogen opgenomen in 5 ml gedestilleerd water), Pool II, fracties 25-31, oranjegekleurd, hygroscopisch, na vriesdrogen opgenomen in 3 ml gedestilleerd water), Pool III (fracties 33-38, felgeel gekleurd, 4.8 mg), Pool IV (fracties 39-57, felgeel gekleurd, 13.5 mg), Pool V (fracties 58-90, felgeel gekleurd, 21.5 mg).

In een afzonderlijke proef werd 1 gram berke-pollen van dezelfde batch met gedestilleerd water geëxtraheerd zonder voorafgaande ontvetting met diethylether en werd uit het waterig extract na dialyse direct het HMWT-preparaat vervaardigd (Product A) in een opbrengst van 1.95

8900052.

gew.%. Tevens werd 1 gram berke-pollen wèl ontvet met ether en werd analoog het HMWT-product afgezonderd in een opbrengst van 1.70 gew.% (Product B). In gelijke gewichtshoeveelheden getest in de RAST-inhibitie bleek het niet-ontvette HMWT product A een factor 3 potenter dan het  
 5 wel-ontvette product B (Figuur 17), hetgeen wijst op de aanwezigheid in de oleoresin-fractie van stuifmeel van ether-oplosbare stoffen met de chemische structuur van allergeen-actieve hapteen-epitopen in de klassieke hoogmoleculaire en wateroplosbare pollen-allergenen. Deze primair-toxische stoffen adsorbeerden krachtig aan actieve kool, waarvan zij  
 10 met ethylalcohol te elueren waren.

In tegenstelling tot de laagmoleculaire IgE-bindende componenten uit *Lolium perenne* in Voorbeeld I bleken de LMWT-oplossingen van *Betula alba* ongeschikt voor coating aan polystyreen-platen en daarop volgende diagnostische IgE-bepaling (Figuur 16). Zoals uit de Figuren 15 en 16 in  
 15 relatie tot Figuren 1 en 2 blijkt vindt dit onvermogen zijn oorzaak in het aanzienlijk lagere moleculairgewicht van de meest actieve *Betula* LMWT-fracties. Dit rechtvaardigt de veronderstelling dat de meest actieve LMWT-componenten uit *Lolium* in feite multi- of tenminste bi-valente (glyco-)peptiden zijn waaraan de primair-toxische stoffen uit de etherische pollen-olie reeds chemisch geconjugeerd voorkomen, terwijl de IgE-  
 20 bindende *Betula* LMWT-componenten vermoedelijk monovalente en wateroplosbare hapteen-glycosiden en/of hapteen-aminozuur conjugaten zijn.

Laatstgenoemde toxine-derivaten hebben een sterke neiging tot fysische adsorptie aan eiwitten en zijn dan ook alleen door zeer lang-  
 25 durige dialyse, bij voorkeur uit zwak zuur milieu, te verwijderen. Dit bleek uit de toevallige waarneming dat een patient met berke-pollen allergie voor een hyposensibilisatiekuur een subcutane injectie kreeg toegediend van een berke-pollen HMWT preparaat dat slechts gedurende 4 uur gedialyzeerd was en die daardoor binnen 15 minuten in een levensbe-  
 30 dreigende anafylactische shock geraakte. De injectie van hetzelfde, doch nu gedurende 48 uur gedialyzeerde HMWT-preparaat in dezelfde dosering werd de daaropvolgende week echter zonder nevenreactie doorstaan. Deze waarneming onderstreept dat ongefractioneerde waterige extracten van stuifmeel behalve IgE-bindende allergeen-actieve hoog-en laagmoleculaire  
 35 stoffen ook laagmoleculaire potente toxinen bevatten welke daarmee structureel nauw verwant zijn, zowel in ongeconjugeerde vorm in de etherische olie als in de vorm van het natuurlijk glycoside in de waterfase.

De IgE-bindende capaciteit van de LMWT-fracties is in Figuur 17  
 40 weergegeven. De ultraviolet absorptiespectra van de inactieve componen-

ten I en V en die van de actieve fracties II-IV zijn gereproduceerd in respectievelijk Figuur 18 en 19. In samenhang met de analyse-resultaten in Tabel 2 wijzen deze gegevens er wederom op dat de flavonoïde pigmenten in pollen-extracten in allergologisch opzicht van geen betekenis 5 zijn.

TABEL 2. Extinctiecoëfficiënten bij pH 9.4 van laagmoleculaire componenten uit waterige extracten van *Betula alba* pollen.

10	Fractie	E(1%,1cm) 270 nm	E(1%,1cm) 325 nm	E(1%,1cm) 400 nm	E400/325	E270/400
15	LMWT	n.d.	n.d.	n.d.	1.68	1.90
	I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	III	198	90	124	1.38	1.60
	IV	294	78	157	2.00	1.87
20	V	348	140	280	2.00	1.24

#### VOORBEELD V

25

Op geleide van de voorgaande voorbeelden werd een semi-synthetisch "berke-pollen" - allergeen bereid. Als hoogmoleculaire en niet-dialyzeerbare dragermoleculen werd gekozen voor de HMWT componenten uit het stuifmeel van de hazelaar (*Corylus avellana* L., GREER Laboratories, 30 Lenoir, NC, U.S.A.). *Betula alba* en *Corylus avellana* zijn beide species uit de botanische familie van de Betulaceae, waarvan bekend is dat immunologische kruisreacties bij patienten met een overgevoeligheid voor deze voorjaarsbomen zeer frequent (en in voorspelbare verhouding) voorkomen. De HMWT-"allergenen" van *Corylus* zijn echter zeker een factor 35 5000 minder potent dan die van de *Betula*. Een van de mogelijke oorzaken daarvan is dat de hazelaar minder reactieve primair-toxische stoffen zou kunnen bevatten welke na conjugatie met eiwit-drager moleculen actieve allergenen kunnen vormen. Op grond hiervan moet het mogelijk zijn om de HMWT-berkepollenallergenen te imiteren door reactie van de *Corylus* 40 eiwitten met de LMWT *Betula* toxinen.

In het model-experiment werd een hoeveelheid van 10 mg *Corylus* pollen HMWT, bereid volgens de werkwijze in Voorbeeld I, opgelost in 1

6900052.

ml  $\text{NaHCO}_3$  pH 9.5. Hieraan werd toegevoegd 0.5 ml van een geconcentreerd en ongefractioneerd LMWT-extract van *Betula alba* pollen volgens de werkwijzen in Voorbeelden I en IV. Het mengsel werd gedurende 3 uur geroerd bij kamertemperatuur en werd vervolgens gedialyzeerd tegen gedestilleerd water gedurende 18 uur. In de controle-experimenten werd dezelfde hoeveelheid *Corylus* HMWT gemengd met 0.5 ml water, en werd 0.5 ml *Betula* LMWT gemengd met 1.0 ml water. Uit dit laatste mengsel kon na dialyse geen retentaat meer teruggewonnen worden. Het gevriesdroogde retentaat van het *Corylus* HMWT/*Betula* LMWT reactieproduct werd onderzocht door spectroscopische analyse in relatie tot de *Betula* LMWT-, *Betula* HMWT-, en *Corylus*-HMWT controles.

De spectroscopische analyse in Figuur 20 laat zien dat laagmoleculaire flavonoiden in sterke mate geadsorbeerd blijven aan de pollen-eiwitten en daarvan eerst na langdurige dialyse verwijderd kunnen worden. In overeenstemming met de voorgaande Voorbeelden blijken flavonoiden echter geen rol te spelen in de IgE-bindende reactie en zijn noch in het synthetische berkepollen-preparaat, noch in het stoomdestillaat van berkepollen meer aan te tonen. Niettemin vertoont het synthetisch product een relatief hoge absorptie bij golflengten boven 300 nm, hetgeen wijst op andere aan de *Corylus* eiwitten gebonden absorberende structuren. De resultaten van de RAST-inhibitie experimenten tegen *Betula* allergenen in Figuur 21 tonen duidelijk aan dat het vrijwel inactieve *Corylus* HMWT product door de behandeling met *Betula* LMWT is omgezet in een hoogmoleculair antigeen met de IgE-bindende specificiteit van een berkepollen allergeen: het semi-synthetische product was slechts 47 x minder actief dan het berkepollen HMWT en ruim 200 x actiever dan de *Corylus* HMWT moedersubstantie.

#### VOORBEELD VI

30

Een semi-synthetisch product werd gemaakt uitgaande van Humaan Serum Albumine (HSA, Behringwerke AG, Germany), 0.1% w/v in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  pH 9.4. Aan deze oplossing werd toegevoegd een gelijk volume van het afgedampte ethylether extract van berkepollen in 96% ethylalcohol. De suspensie werd gedurende 24 uur geagiteerd op een rollenbank bij 20°C, waarna gedurende 24 uur werd gedialyzeerd tegen regelmatig verversd aqua destillata vanuit Visking membranen met  $M = 10\ 000$  nominale cutoff. Het retentaat werd gevriesdroogd en het half-synthetische HSA-*Betula* product werd in waterige oplossing gebracht voor bepaling van het UV-absorptie spectrum en de RAST-berkepollen-inhibitie capaciteit. De spectraal-ana-

8900052.

lyse liet zien dat koppeling van ether-oplosbare organische verbindingen als hapteen inderdaad had plaatsgevonden, zoals in Voorbeeld V voor Corylus HMWT al gedemonstreerd. Het HSA-betula product gaf 22% inhibitie van de berkepollen IgE-binding bij een concentratie van 500 µg in het test-systeem, d.i. ca 10 x minder actief dan Corylus HMWT; het HSA-moederproduct was totaal inactief.

Aan eiwit te koppelen primair-toxische stoffen welke de eiwitdrager vervolgens tot allergeen maken zijn volgens deze Voorbeelden te bereiden zowel direct uit de ether-oplosbare verbindingen in stuifmeel als indirect door alkalische hydrolyse van de dialyzeerbare componenten uit waterige extracten van met ether voorbehandelde pollen. Figuur 22 toont langs spectroscopische weg aan dat ook stoomdestillatie van LMWT-oplossingen in zwak zuur milieu (pH 5) tot isoleerbare verbindingen leidt, welke echter structureel onderscheiden zijn door een hogere carbonylabsorptie bij 270 nm. Primair-toxische stoffen verbindingen zijn tenslotte rechtstreeks en gemakkelijk te isoleren door directe stoomdestillatie van onbehandelde pollen, zoals in Figuur 23 aan de hand van het stuifmeel van Lolium perenne, Betula alba en Parietaria judaica wordt geïllustreerd. De betreffende verbindingen zijn uit de stoomdestillaten te verwijderen door hun hoge oplosbaarheid in diethylether. De spectra in Figuur 23 zijn opgenomen van oplossingen in 96% ethylalcohol van aldus bereide en bij kamertemperatuur drooggedampte ether-extracten.

Voor de bereiding van vluchtige verbindingen uit appels werd een verse vrucht (var. Granny Smith) fijngesneden (inclusief schil), waarbij de zaden werden verwijderd; 150 gram van dit materiaal werd met aqua destillata fijngemalen in een keukenmixer, in een rondbodemkolf gebracht, en gedurende 1 uur onderworpen aan stoomdestillatie. Het distillaat werd opgevangen in water en vervolgens uitgeschud met diethylether. Na afscheiden van de etherlaag werd deze gedroogd op watervrij Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en vervolgens onder een koude luchtstroom drooggedampt. Het residu werd opgenomen in 96% ethylalcohol voor het opmeten van het ultraviolet absorptiespectrum. Een klein gedeelte werd met water verdund tot een alcoholpercentage van 50%. Deze laatste oplossing werd onderzocht op inhibitie-capaciteit van de IgE-binding tegen berkepollen HMWT allergeen. Zoals verwacht bleken de vluchtige verbindingen zonder voorafgaande conjugatie aan eiwitdragers deze IgE-binding niet te kunnen remmen. Het absorptiespectrum in Figuur 23 laat zien dat de overgestoomde verbinding mogelijksterwijze een terpenoïde verbinding is.

De modelverbinding protoanemonine (Carl Roth, cat.nr. 2263097) in water absorbeerde alleen met een scherpe piek bij 215 nm; de niet-vluch-



tige terpenoide verbinding betulinol (Carl Roth, cat nr. 8763) in 96% ethylacohol bij 214 nm, met een zwakke schouder bij 290-300 nm (bevat alleen een exocyclische methyleen groep, en geen verdere onverzadigde bindingen of carbonyl-groepen). De modelstof helenine (Sigma Laboratories, cat.nr.H-1375), een alantolactone, absorbeerde alleen bij 223 nm. 5 Vluchtige mono- en sesquiterpenoiden en hun lacton-derivaten zijn dus alleen in het technisch moeilijke zeer kortgolvlige UV-gebied te detecteren. Uit Figuur 23 blijkt niettemin dat de vluchtige verbinding in het stoomdestillaat van *Parietaria judaica* pollen absorbeerde bij 227 nm, 10 met een schouder bij 280 nm; na uitschudden van het stoomdestillaat met ether en overvoeren in 96% ethylacohol absorbeerde het toxine bij 211 nm, met een schouder bij 270 nm. Het stoomdestillaat van onbehandelde *Lolium perenne* pollen, uitgeschud met ether en opgenomen in 96% alcohol absorbeerde in het ultraviolet bij 213 nm, met een schouder bij 268 nm. 15 Het stoomdestillaat van berkepollen LMWT uit alkalisch milieu (pH 10) vertoonde een absorptie-piek bij 224 en 260-265 nm; uitgeschud met ether lag de absorptie (in 96% EtOH) bij 214 nm, met een aanduiding van een schouder bij ca 270 nm. Het stoomdestillaat van de Granny Smith appel pulp lag bij 228 nm. Het ether extract van het waterig destillaat, afge- 20 dampd en opgenomen in 50% EtOH lag bij 225 en duidelijk ook bij 275 nm. De resultaten in dit Voorbeeld wijzen er dan op dat de wateroplosbare LMWT-fractie van stuifmeel-extracten geconjugeerde glycosiden bevat van vluchtige terpenoide verbindingen, waaruit in alkalisch milieu de primair-toxische en ether-oplosbare aglykonen door hydrolyse ontstaan. De 25 concentratie van deze aglykonen in commercieel verkrijgbaar stuifmeel is vermoedelijk uitermate gering, omdat zij door het langdurig droog-behandelingsproces van het pollen grotendeels vervluchtigd zullen zijn (Guérin B. Rev franc Allergol 1980; 20: 193-6).

Allergologisch werkzame, meestal vluchtige primair-toxische stof- 30 fen met een hoge reactiviteit t.o.v. thiol- of amino-groepen in peptiden kunnen ook behoren tot de groep van de ortho- of para- benzochinonen of alkyl- of aryl-derivaten van 1.2-dihydroxybenzeen. Dit kan geïllustreerd aan het voorbeeld van een jongeman die medische hulp zocht voor een ernstig Quincke's oedeem kort nadat in zijn directe omgeving het jonge hout 35 van een prunus-boom werd verzaagd. De verantwoordelijke chemische verbinding kon in het laboratorium worden gewonnen uit het stoomdestillaat van versgezaagd prunus-hout door uitschudden met diethylether en werd spectroscopisch geïdentificeerd als 3.4 - dihydroxybenzoëzuur.

Onderschriften bij de figuren.

## Figuur 1.

Scatter diagram voor de kwantitatieve relatie tussen de IgE-antistoffen tegen Lolium perenne allergenen gemeten tegen de eiwit-allergenen HMWT m.b.v. de RAST-methode en tegen de totale dialyzeerbare fractie LMWT m.b.v. van enzyme immunoassay. Aantal pollinosis-patienten sera  $N = 30$ , Spearman rang correlatie coefficient  $r(S) = 0.832$ ,  $P < 0.00002$ . Regressie lijn :  $y = 16.76x + 8.79$ .

10

## Figuur 2.

Elutiepatroon van Lolium perenne pollen LMWT, 2.5 ml in gedestilleerd water over een  $90 \times 1.4$  cm ( $\phi$ ) kolom Sephadex G25 Fine. Fracties van 100 druppels werden automatisch verzameld, waarbij de licht-absorptie bij 280 nm continu werd geregistreerd. De fracties werden na de scheiding samengevoegd in 4 Pools, zoals in de figuur aangegeven.

15

## Figuur 3.

Remming van de IgE-binding in het bloedserum van een pollinosis-patient door voor-incubatie met de gescheiden LMWT-fracties SI, SII, en SIII uit Lolium perenne. Als remcapaciteit per preparaat wordt het aantal  $\mu\text{g}$  voor 50% RAST-remming aangehouden. De capaciteitsverhouding was  $SII : SI : SIII = 1 : 3.6 : 31.7$ .

25

## Figuur 4.

Ultraviolet absorptiespectra in  $0.1 \text{ M NaHCO}_3$  pH 9.4 van de actieve laagmoleculaire IgE-bindende LMWT-fracties uit Lolium perenne SI en SII in relatie tot het uitgangproduct. LMWT in 1 : 100 verdunning, Pool I in 0.1% w/v oplossing, Pool II in 1 : 100 verdunning. Een hogere absorptie boven 300 nm is niet geassocieerd met een hogere IgE-bindingscapaciteit.

30

## Figuur 5.

Ultraviolet absorptiespectra van de allergologisch inactieve LMWT-fracties III ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) en IV ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) van Lolium perenne in  $0.01 \text{ M NaHCO}_3$  pH 9.4. Het absorptiemaximum van beide fracties ligt bij 260 - 262 nm,  $E(1\%, 1\text{cm})$  fractie III = 400, fractie IV = 193.

40

5900052.

## Figuur 6.

Elutiepatroon van *Artemisia vulgaris* LMWT, 2 ml geconcentreerde oplossing in water, gepercoleerd door een 80 x 1 cm ( $\phi$ ) kolom Sephadex G25 Fine in water. Fractie-grootte 5 ml, relatieve absorptie bij 280 nm. Gecombineerde fracties van drie afzonderlijke runs werden in 4 Pools samengevoegd zoals aangegeven.

## Figuur 7.

Remming van de IgE-binding in het bloedserum # 880528 van een patient met geïsoleerde pollinosis voor *Artemisia vulgaris* (RAST onverdund serum = 41%) door LMWT en de subfracties I en II in verdunningsreeksen van een stock-oplossing van 10 mg/ml, 50  $\mu$ l per test; fracties III en IV waren geheel inactief. De capaciteitsverhouding was LMWT : Pool I : Pool II = 1 : 6.3 : 25.1.

## Figuur 8.

Ultraviolet absorptiespectra van de IgE-bindende fracties LMWT uit *Artemisia vulgaris* pollen en de subfracties Pool I en Pool II bij pH 7.0 in gedestilleerd water; LMWT bij 1:200 verdunning, Pool I bij 1 mg/ml, en Pool II bij 1:500 verdunning. De fractie (I) van LMWT met het minst gedetailleerde spectrum heeft de hoogste IgE-bindende capaciteit.

## Figuur 9.

Ultraviolet absorptiespectra in gedestilleerd water van de allergologisch inactieve subfracties III (0.1 mg/ml) en IV (0.05 mg/ml) uit *Artemisia vulgaris* LMWT. Deze fracties zijn rijk aan flavonoïde verbindingen (absorptiemaxima 325-360 nm).

## Figuur 10.

Elutiepatroon van *Parietaria judaica* LMWT, 1.5 ml geconcentreerde oplossing in water, gepercoleerd door een 85 x 1.4 cm ( $\phi$ ) kolom Sephadex G25 Fine in water. Fractie-grootte 5 ml, relatieve absorptie bij 280 nm. Gecombineerde fracties van drie afzonderlijke runs werden in 4 Pools samengevoegd zoals aangegeven.

## Figuur 11.

Remming van de IgE-binding in het gemengd bloedserum van 4 Spaanse patienten met geïsoleerde pollinosis voor *Parietaria judaica* (RAST onverdund serum = 16%) door de niet-dialyzeerbare allergenen HMWT

8800052.

en de LMWT-subfractie I. De capaciteits - verhouding was HMWT : Pool I = 1 : 105.

Figuur 12.

5 Remming van de IgE-binding in het gemengd bloedserum van 4 Spaanse patienten met geïsoleerde pollinosis voor *Parietaria judaica* (RAST onverdund serum = 16%) door de LMWT-subfracties I t/m IV. De capaciteits - verhouding was I : II : III : IV = 1 : 1.7 : 167 : 500.

10 Figuur 13.

Ultraviolet absorptiespectra van de IgE-bindende LMWT-subfracties I en II uit *Parietaria judaica* pollen in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4; Pool I in 200 µg/ml, de hygroscopische Pool II in 1 : 250 verdunning. De allergologische meest actieve fractie Pool I bevat  
15 nog slechts sporen van flavonoiden.

Figuur 14.

Ultraviolet absorptiespectra in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4 van de allergologisch inactieve LMWT-subfracties III en IV uit *Parietaria judaica* pollen, beide in een concentratie van 40 µg/ml. Deze inactieve fracties bevatten flavonoiden of flavonoïde-glycosiden van het quercitine-type.  
20

Figuur 15.

25 Elutiepatroon van *Betula alba* LMWT, 2 ml geconcentreerde oplossing in water, gepercoleerd door een 85 x 1.4 cm (φ) kolom Sephadex G25 Fine in water. Fractie-grootte 5 ml, relatieve absorptie bij 280 nm. Gecombineerde fracties van drie afzonderlijke runs werden in 5 Pools samengevoegd. De pijl geeft de elutie-positie aan van de  
30 markers Blue Dextran en Trasylol<sup>®</sup>. De aangeduide effluent positie van de meest actieve IgE-bindende componenten demonstreert een lager moleculair gewicht (ca 1000-3000 daltons) dan de LMWT-fracties uit de voorgaande Voorbeelden.

35 Figuur 16.

Scatter diagram voor de kwantitatieve relatie tussen de IgE-antistoffen tegen *Betula alba* allergenen gemeten tegen de eiwit-allergenen HMWT m.b.v. de RAST-methode en tegen de totale dialyzeerbare fractie LMWT m.b.v. van enzyme immunoassay. Aantal pollinosis-  
40 patienten sera N = 30, Spearman rang correlatie coefficient  $r(S) =$

8900052.

0.175 (statistisch niet-significant). Regressie lijn :  $y = 78.35x + 11.03$ .

Figuur 17.

5 Remming van de IgE-binding in het gemengde bloedserum van 4 pa-  
 tienten met geïsoleerde pollinosis voor *Betula alba* (RAST onver-  
 dund serum = 38.5%) door de hoofd-allergenen HMWT geëxtraheerd  
 uit respectievelijk onbehandelde en ether-ontvette pollen, alsmede  
 10 door de dialyzeerbare componenten LMWT en de 5 subfracties daar-  
 van. De capaciteits-verhouding was HMWT non-def. : HMWT : I : II :  
 III : IV : V = 1 : 3 : ∞ : 10000 : 17783 : 7079 : ∞. Door het te-  
 voren met ether verwijderen van de "pollen-olie" (of "oleoresin")  
 neemt de allergene activiteit van de extraheerbare waterige hoofd-  
 allergenen met een factor 3 af.

15

Figuur 18.

Ultraviolet absorptiespectra in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4 van de aller-  
 gologisch inactieve subfracties I (verdunding 1 : 100) en V (0.04  
 mg/ml) uit *Betula alba* LMWT. De fracties flavonoïde-rijke compo-  
 20 nenten (absorptiemaximum 400 nm) zijn het laagst in moleculair-  
 gewicht.

Figuur 19.

Ultraviolet absorptiespectra in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4 van de aller-  
 gologisch actieve subfracties II (verdunding 1 : 100), III (0.1  
 mg/ml) en IV (0.05 mg/ml) uit *Betula alba*. Uit de spectra in ver-  
 25 gelijking met de RAST-inhibitie gegevens in figuur 17 volgt dat  
 de flavonoïde bestanddelen geen allergene bijdrage leveren.

30 Figuur 20.

Ultraviolet absorptiespectra in 0.1 M fosfaatbuffer pH 7 + 0.9%  
 NaCl (PBS) van de hoofd-allergene fracties HMWT uit *Betula alba*  
 (0.05%) en *Corylus avellana* (0.02%) in relatie tot het semi-syn-  
 35 thetisch berke-pollen HMWT allergeen (0.1%) samengesteld uit  
 berke-pollen LMWT (spectrum bij 1 : 100 verdunding) en *Corylus*  
 HMWT. Uit deze spectra blijkt dat de flavonoïde bestanddelen niet-  
 allergeen en laagmoleculair zijn, met een sterke neiging tot ad-  
 sorptie aan hoogmoleculaire componenten. Het semi-synthetisch  
 allergeen bevat, evenals het waterig stoomdestillaat uit LMWT pH  
 40 10 geen flavonoiden.

80000527

## Figuur 21.

Remming van de IgE-binding in het gemengde bloedserum van 4 pa-  
 tienten met geïsoleerde pollinosis voor *Betula alba* (RAST onver-  
 dund serum = 38,5%) door de hoofd-allergenen HMWT uit *Betula alba*  
 5 en *Corylus avellana*, alsmede door de dialyzeerbare allergene Pool  
 IV uit berke-pollen LMWT en een semi-synthetisch HMWT allergeen  
 samengesteld uit laagmoleculaire berke-pollen componenten en hoog-  
 moleculaire hazelaar dragermoleculen. De capaciteits-verhouding  
 was *Betula* HMWT : Semi-synthetisch product : *Betula* LMWT-IV :  
 10 *Corylus* HMWT = 1 : 47 : 2360 : 10541.

## Figuur 22.

Ultraviolet absorptie spectra in water van de stoomdestillaten van  
 het LMWT materiaal uit *Betula alba*, respectievelijk vervluchtigd  
 15 uit de LMWT-oplossingen bij pH 5 of pH 10. Concentraties onbekend.  
 De stoomdestillaten bevatten geen flavonoiden, doch wel verbindin-  
 gen met een maximum (vermoedelijke carbonyl-) absorptie bij  
 260-270 nm.

## 20 Figuur 23.

Ultraviolet absorptie van de met ether uitgeschudde, drooggedamp-  
 te, en vervolgens in 96% ethylalcohol opgenomen stoomdestillaten  
 van het droge en onbehandelde stuifmeel van *Betula alba*, *Parie-*  
*taria judaica* en *Lolium perenne*, en van de versgesneden vrucht  
 25 (inclusief schil, exclusief zaden) van appels (*Pinus malus* L.,  
 var. *Granny Smith*), Concentraties onbekend. Alle spectra vertonen  
 maxima in het zeer kortgolvlige gebied van 200-220 nm, in overeen-  
 stemming met hun vermoedelijke (mono- of sesqui-)terpenoïde struc-  
 tuur.

30

## C O N C L U S I E S

1. Primair-toxische stoffen met een molecuulgewicht van minder dan 12000 Dalton, isoleerbaar uit plantaardig materiaal, die potentiële IgE-  
5 bindende allergenen zijn of kunnen worden voor daartoe gepredisponeerde individuen.
2. Primair-toxische stoffen volgens conclusie 1, g e k e n-  
m e r k t d o o r de eigenschap tot conjugatie bij temperaturen onder  
10 40°C met aminozuren of (poly)peptiden door nucleofiele additie of sub-  
stitutie.
3. Primair-toxische stoffen volgens conclusie 1 of 2, g e k e n-  
m e r k t doordat zij oplosbaar zijn in met water niet-mengbare orga-  
15 nische oplosmiddelen.
4. Primair-toxische stoffen volgens conclusie 2, m e t h e t  
k e n m e r k, dat zij na de conjugatie-reactie met aminozuren of pepti-  
den als specifieke hapteen-structuren herkend kunnen worden door IgE- of  
20 IgG-antistoffen, of door cellulaire receptoren.
5. Primair-toxische stoffen of allergenen volgens conclusie 1 of  
2, g e k e n m e r k t doordat zij verkeren in de vorm van in water  
oplosbare glycosiden.  
25
6. Primair-toxische stoffen of allergenen volgens conclusies 1-5,  
g e k e n m e r k t doordat zij behoren tot de groep van de mono- of  
sesquiterpenoiden met een reactieve carbonyl-, epoxy- of vinylgroep, of  
tot de groep van de gesubstitueerde benzochinonen.  
30
7. Werkwijze voor het isoleren van primair-toxische stoffen of  
allergenen uit plantaardig materiaal, m e t h e t k e n m e r k, dat  
men daaruit stoffen met een molecuulgewicht van minder dan 12000 af-  
scheidt.  
35
8. Werkwijze volgens conclusie 7, m e t h e t k e n m e r k, dat  
men stoffen met een IgE-bindende activiteit afscheidt.
9. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, m e t h e t k e n-  
40 m e r k, dat men een waterig extract van plantaardig materiaal onder-

8900052.

werpt aan een behandeling met een dialyse-membraan, een ultrafilter of een moleculaire zeef.

10. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
5 m e r k, dat men plantaardig materiaal extraheert met organisch oplos-  
middel, water of een bufferoplossing.

11. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
m e r k, dat men vers plantaardig materiaal onderwerpt aan stoomdestil-  
10 latie.

12. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
m e r k, dat men plantaardig materiaal eerst onderwerpt aan stoomdestil-  
latie en het verkregen waterige destillaat vervolgens extraheert met een  
15 met water niet mengbaar oplosmiddel.

13. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
m e r k, dat een plantaardig materiaal eerst extraheert met een met  
water niet-mengbaar organisch oplosmiddel en het verkregen extract  
20 vervolgens onderwerpt aan stoomdestillatie.

14. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
m e r k, dat men de glycosiden in waterige extracten in het plantaardig  
materiaal, waaruit eventueel stoffen met een molecuulgewicht van meer  
25 dan 12000 zijn verwijderd, hydrolyseert en de aglykonen wint.

15. Werkwijze volgens conclusie 14, met het kenmer k,  
dat men het gehydrolyseerde waterige extracten van plantaardig materiaal  
voor de winning van aglykonen of primair-toxische stoffen extraheert met  
30 een met water niet-mengbaar organisch oplosmiddel.

16. Werkwijze volgens conclusie 14, met het kenmer k,  
dat men de primair-toxische stoffen of aglykonen wint door stoomdestil-  
latie van het gehydrolyseerde waterige extract van plantaardig mate-  
35 riaal.

17. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het ken-  
m e r k, dat men plantaardig materiaal extraheert met water of met een  
waterige bufferoplossing met een pH tussen 6 en 7,5 bij een temperatuur  
40 van niet meer dan 10°C.

8900652 ?



18. Werkwijze voor de bereiding van eiwit-conjugaten met allergene en IgE-bindende eigenschappen, met het kenmerk, dat men stoffen volgens conclusie 1-4 en 6 respectievelijk verkrijgbaar volgens 5 de werkwijze van conclusie 10-16 koppelt aan een dragereiwit.

19. Werkwijze volgens conclusie 18, met het kenmerk, dat het dragereiwit een molecuulgewicht van ten minste 20000 bezit en in het molecuul ten minste twee cysteine-aminozuurgroepen bevat, en dat de 10 conjugatie wordt uitgevoerd door interactie in waterig milieu bij een temperatuur van 20-40°C en een pH van 8,5-11.

20. Toepassing van stoffen volgens een der conclusies 1-6 respectievelijk verkrijgbaar volgens een der conclusies 7-19. 15

21. Toepassing volgens conclusie 20 voor de bereiding van preparaten, geschikt voor behandeling van allergie.

22. Toepassing volgens conclusie 20 voor analytische doeleinden en 20 standaardisatie.

\*\*\*\*\*

8900052:

fig-1

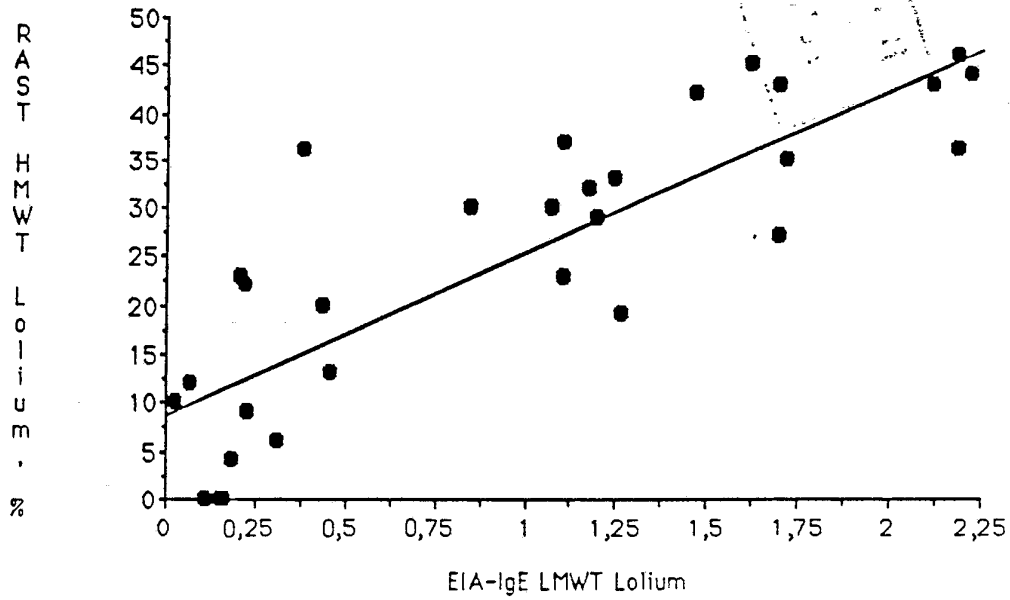
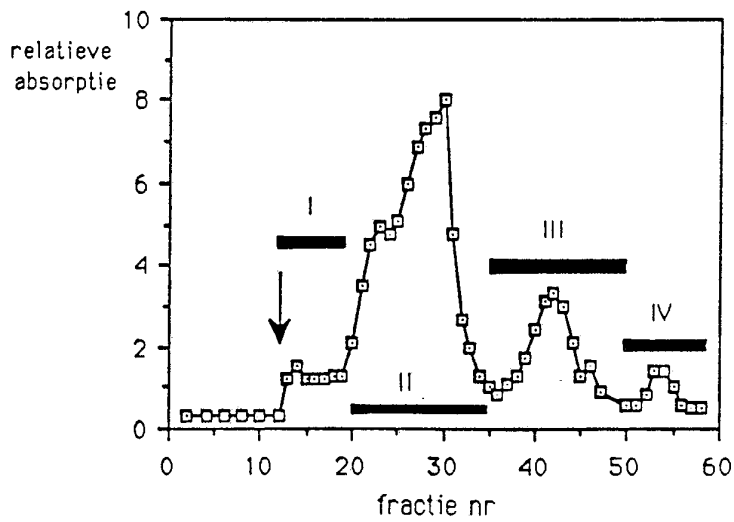


fig-2



8900652.4

fig-3

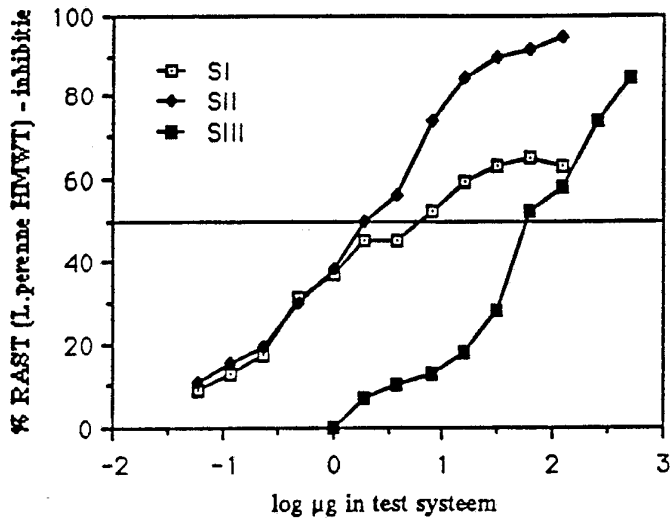
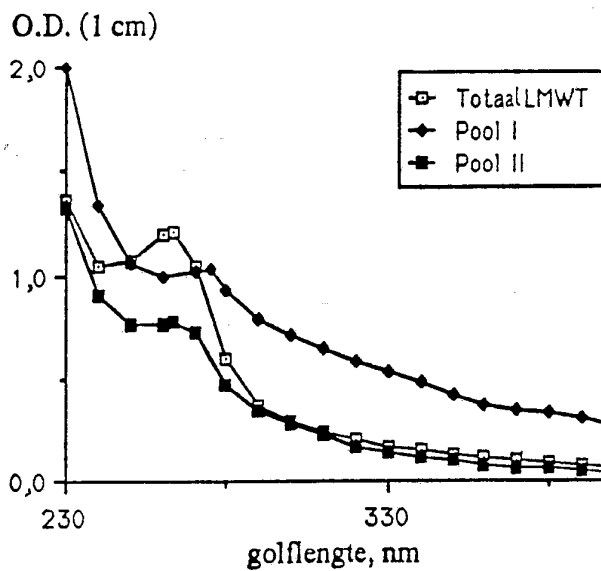


fig-4



89000527

fig - 5

O.D. (1 cm)

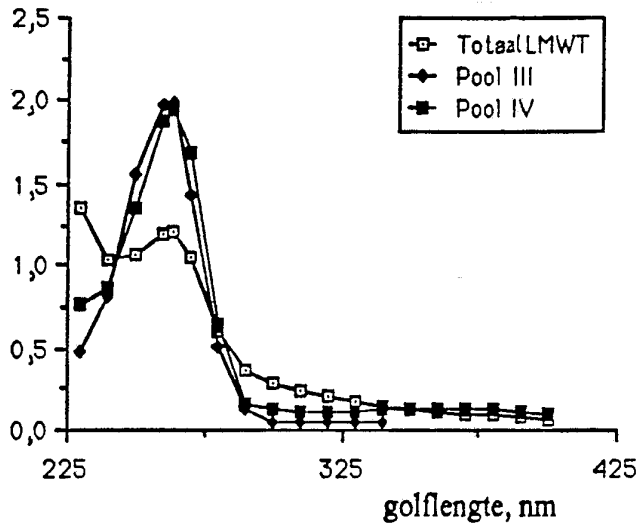


fig - 6

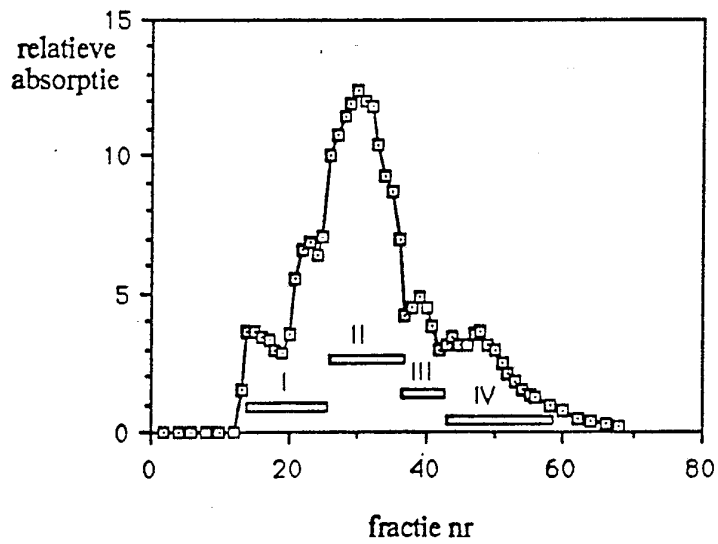


fig - 7

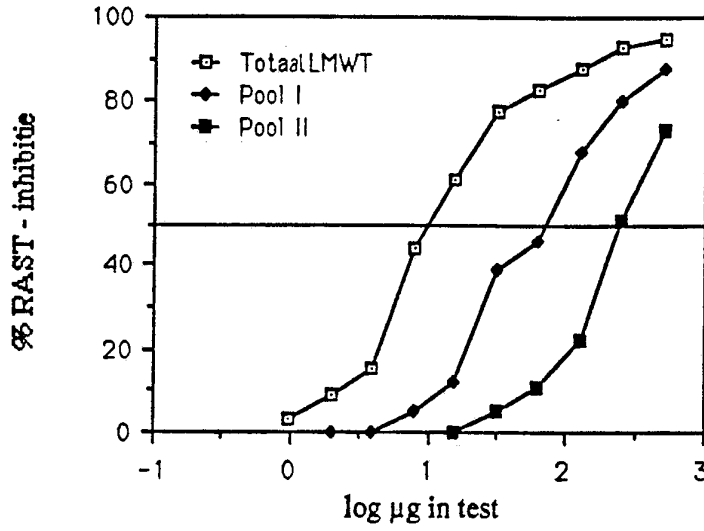
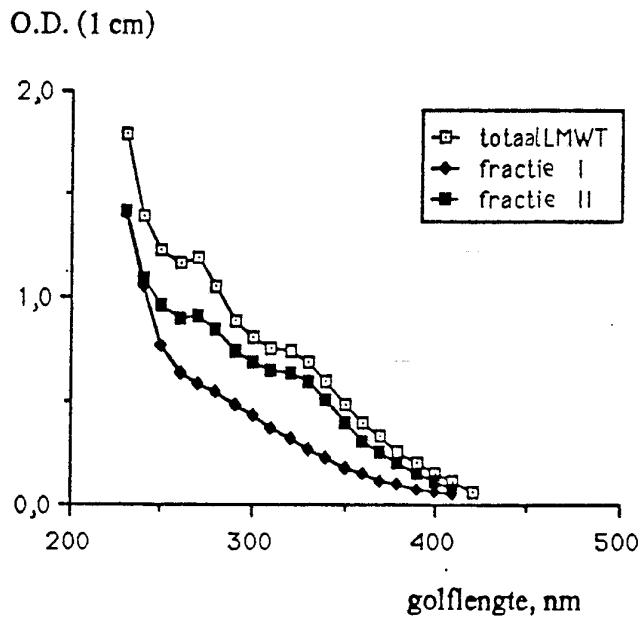


fig - 8



8900652.

fig - 9

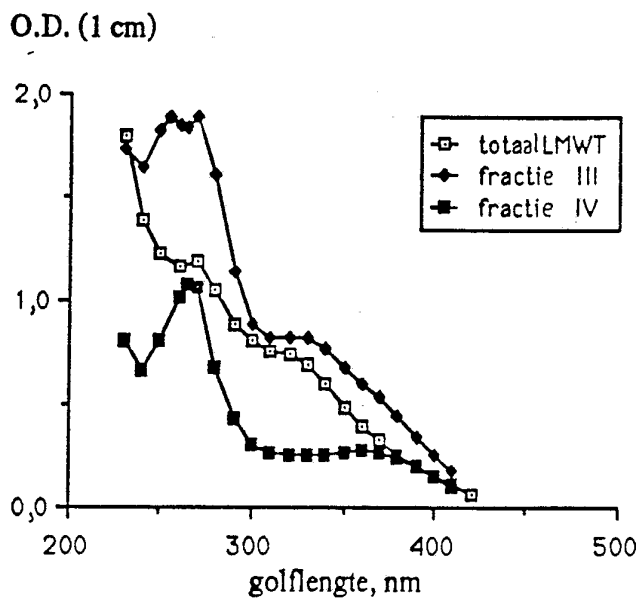


fig - 10

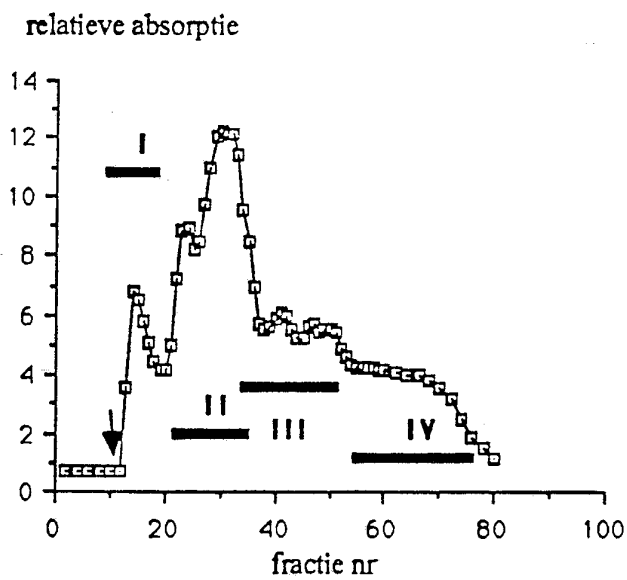


fig-11

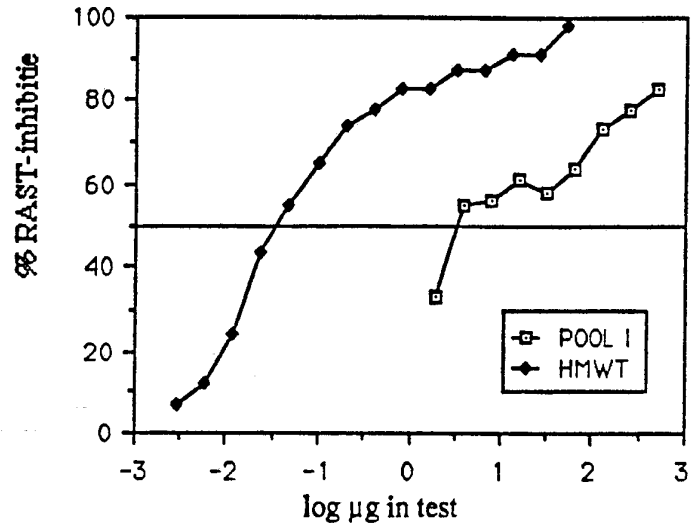
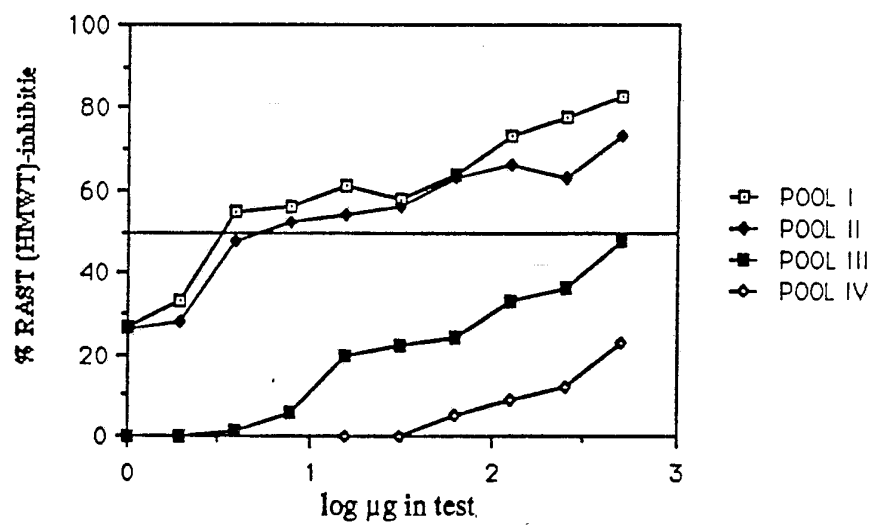


fig-12



0000052.

fig-13

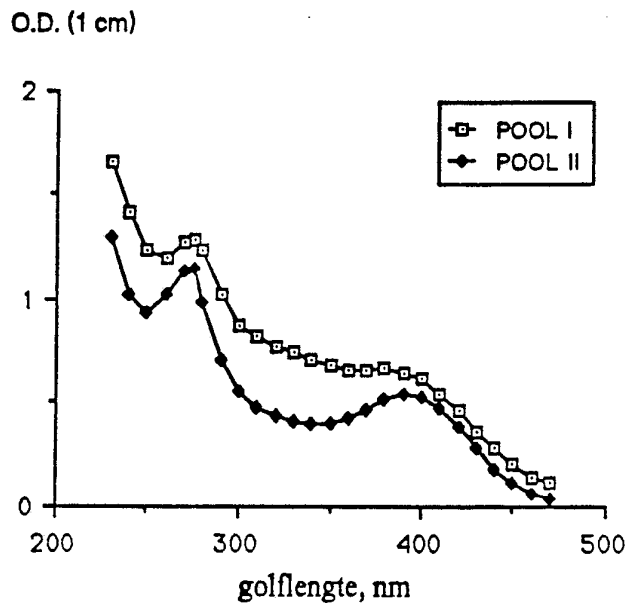
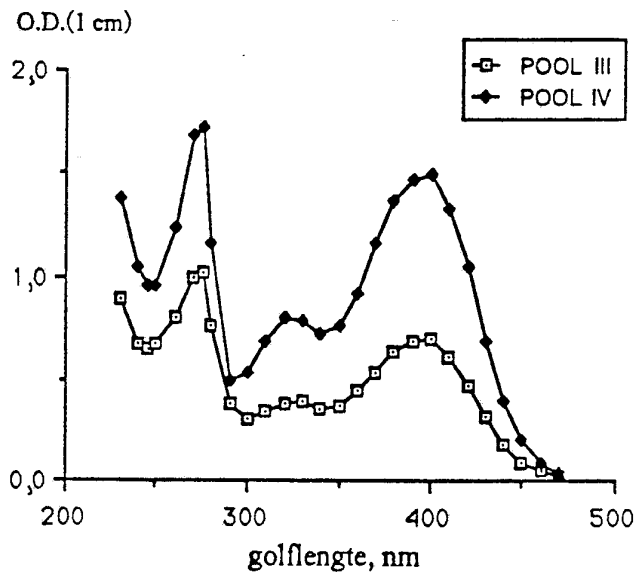


fig-14



8900052.



fig -15

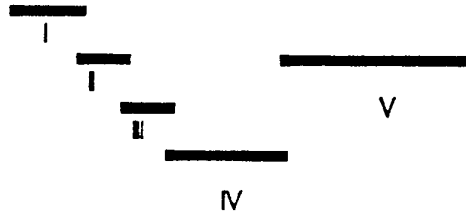
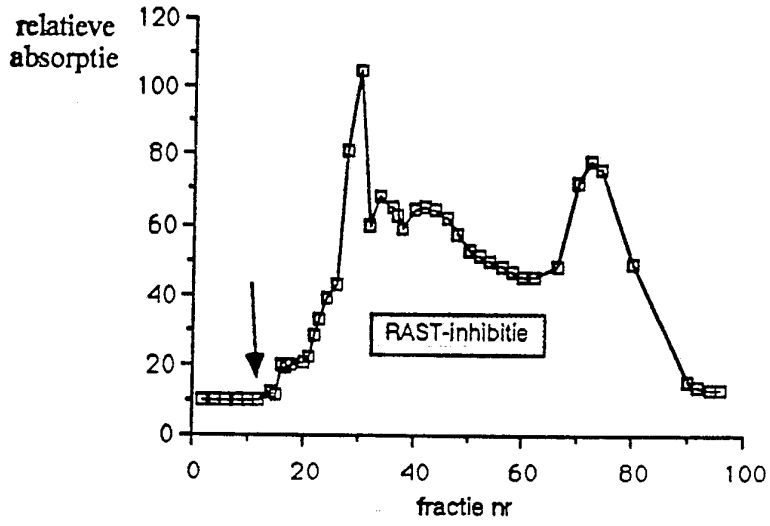
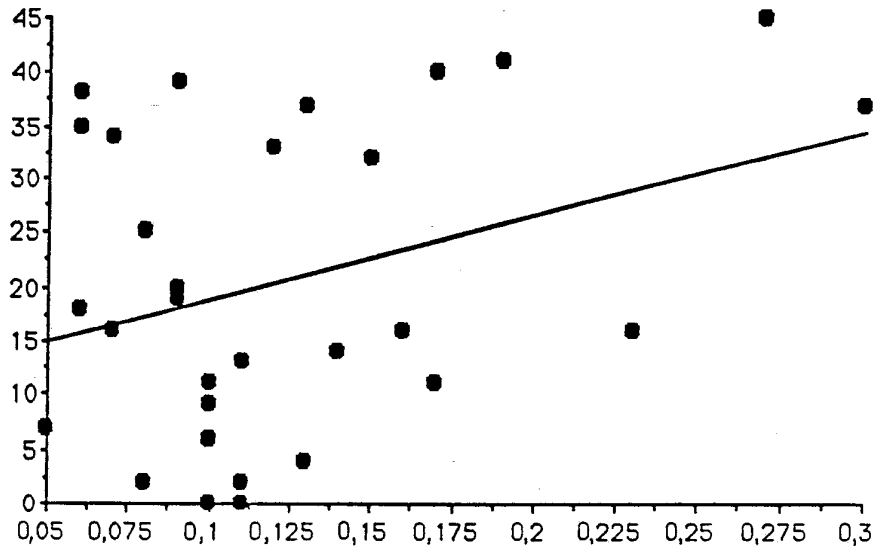


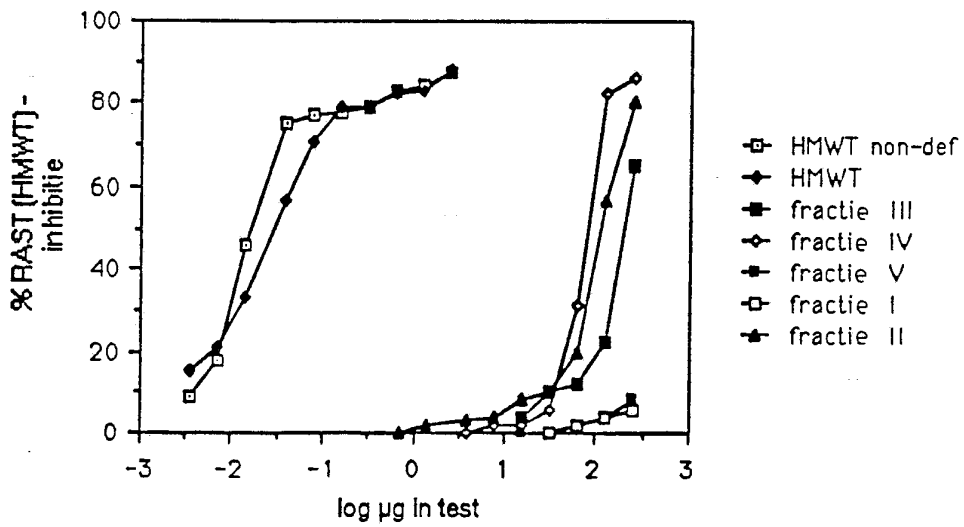
fig -16

RAST Betula HMWT, %



EIA-IgE Betula LMWT

fig -17



8900052

fig - 18

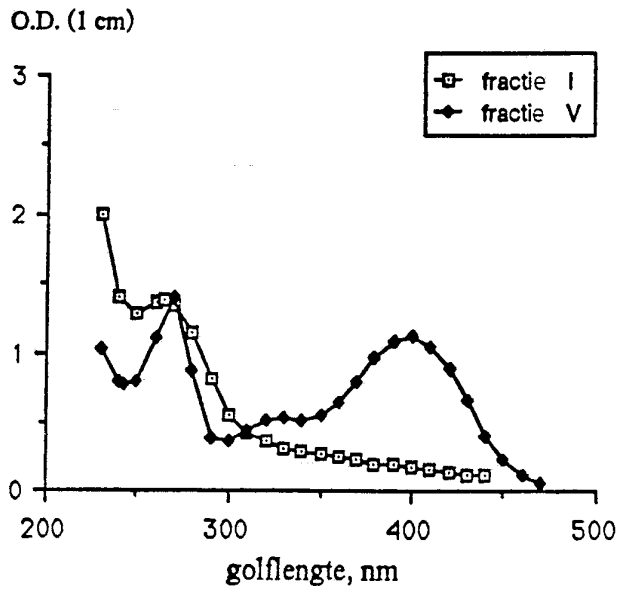
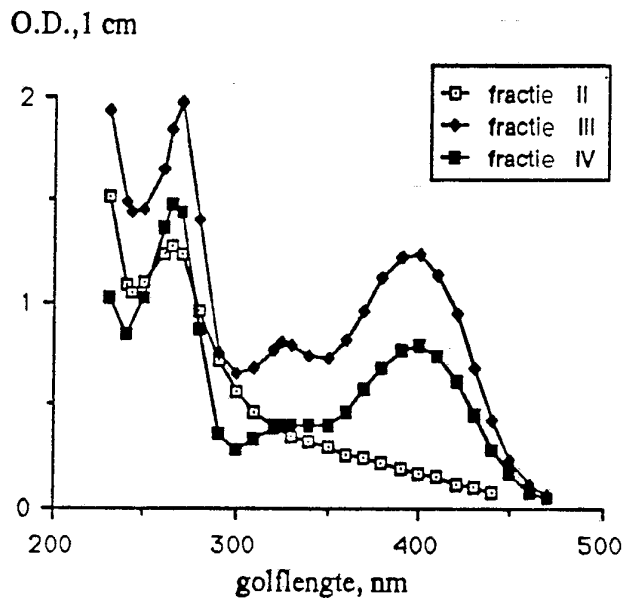


fig - 19



8000052.

fig - 20

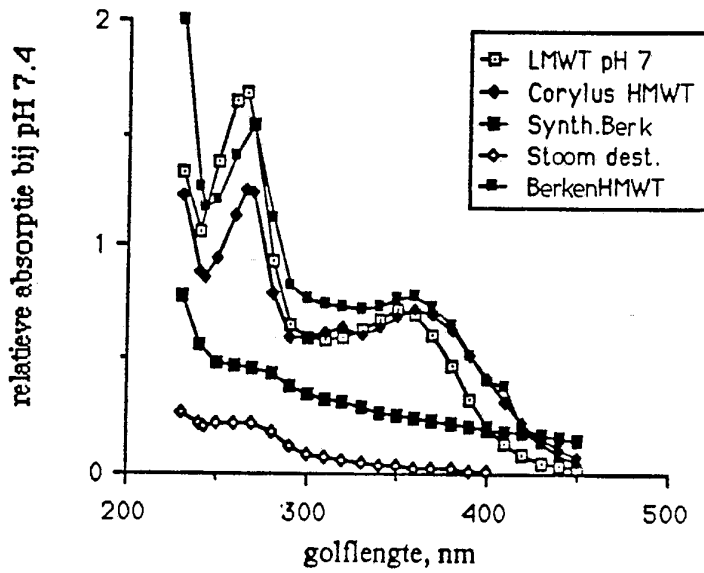
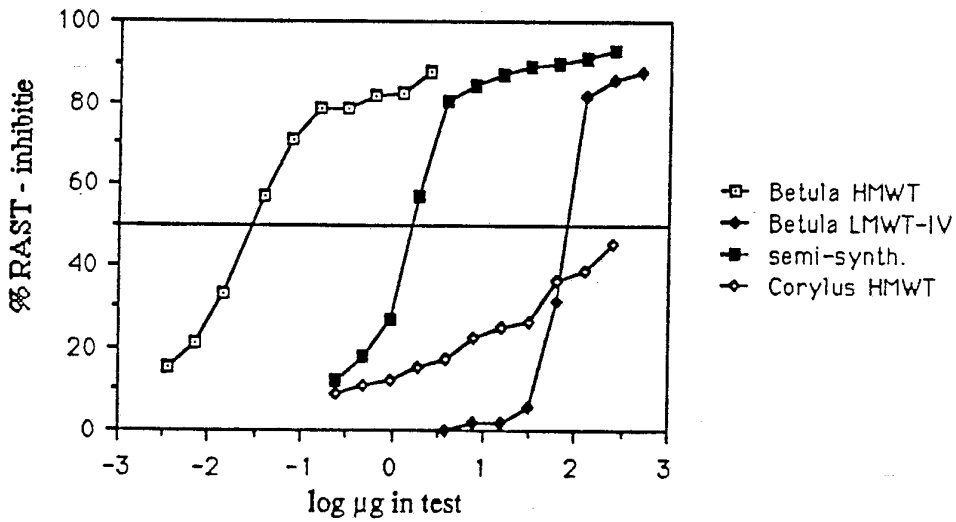


fig - 21



2000002.

fig - 22

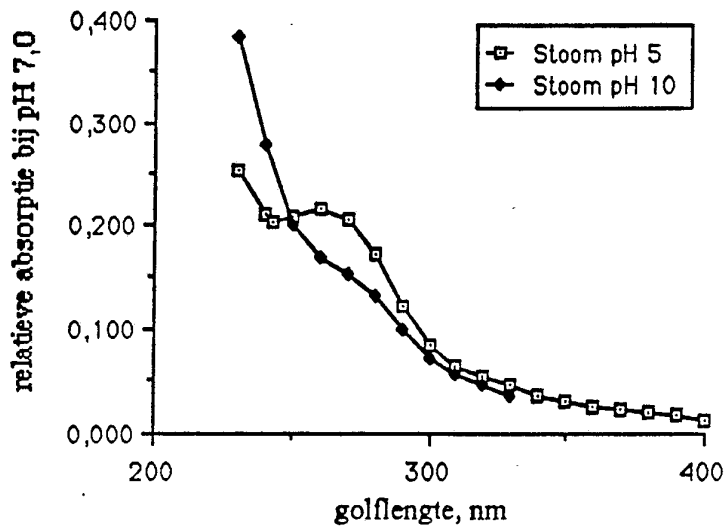
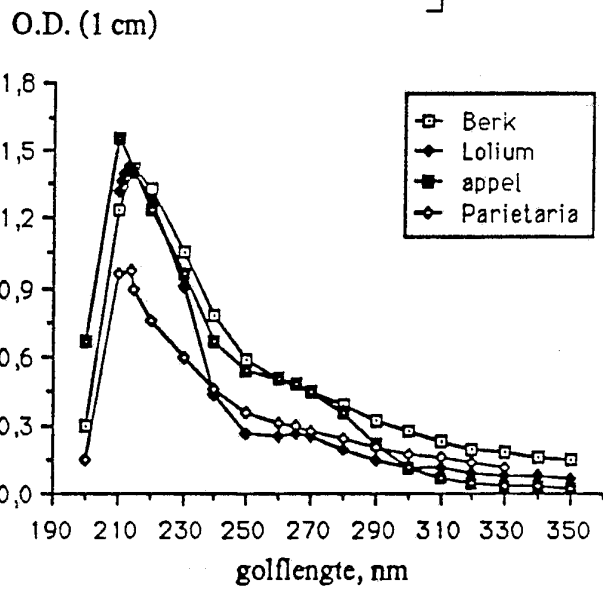


fig - 23



880005