

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580018846.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997741A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 27/14 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

[22] 申请日 2005.4.7

[21] 申请号 200580018846.7

[30] 优先权

[32] 2004. 4. 9 [33] JP [31] 116089/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/007191 2005.4.7

[87] 国际公布 WO2005/097996 日 2005.10.20

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.8

[71] 申请人 日本全药工业株式会社

地址 日本福岛县

[72] 发明人 津久井利广 辻本元 岩渊成紘

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 梁谋

权利要求书 2 页 说明书 22 页 序列表 20 页
附图 15 页

[54] 发明名称

新的螨变应原

[57] 摘要

安全和有效的不含诱导过敏的杂质的变应原，其作为螨变态反应性疾病的治疗剂或诊断剂。提供了以下重组蛋白：(a) 由 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列组成的蛋白；或 (b) 包含通过对 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列的蛋白，其具有螨变应原活性。

1. 以下重组蠕变应原(a)或(b):
 - (a)包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的重组蠕变应原; 或
 - (b)包含通过对 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列, 并且具有蠕变应原活性的重组蠕变应原。
2. 以下重组蠕变应原(a)或(b):
 - (a)包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的重组蠕变应原; 或
 - (b)包含通过对 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列, 并且具有蠕变应原活性的重组蠕变应原。
3. 编码以下蠕变应原(a)或(b)的基因:
 - (a)包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蠕变应原; 或
 - (b)包含通过对 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列, 并且具有蠕变应原活性的蠕变应原。
4. 编码以下蠕变应原(a)或(b)的基因:
 - (a)包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的蠕变应原; 或
 - (b)包含通过对 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列, 并且具有蠕变应原活性的蠕变应原。
5. 包含以下 DNA (c)或(d)的基因:
 - (c)包含 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 DNA; 或
 - (d)在严格条件下与包含特定序列的 DNA 杂交, 并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 DNA, 所述特定序列与包含 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 DNA 的序列互补。
6. 包含以下 DNA (c)或(d)的基因:
 - (c)包含 SEQ ID NO: 34 所示核苷酸序列的 DNA; 或
 - (d)在严格条件下与包含特定序列的 DNA 杂交, 并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 DNA, 所述特定序列与包含 SEQ ID NO: 34 所示核苷酸序列的 DNA 的序列互补。
7. 权利要求 1 或 2 的蠕变应原的片段肽。

8. 权利要求 7 的片段肽，其包含含有 SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列中的至少一个序列的氨基酸序列。

9. 螨变应原的片段基因，其编码权利要求 7 或 8 的片段肽。

10. 重组载体，其包含权利要求 3-6 的任意一项的基因或权利要求 9 的片段基因。

11. 融合蛋白，其由权利要求 1 或 2 的螨变应原和另一种蛋白组成。

12. 用权利要求 10 的表达载体转化的细菌、酵母、昆虫或动物细胞。

13. 生产重组螨变应原的方法，该方法包括在可以表达基因的条件下培养权利要求 12 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞，导致细胞产生重组螨变应原，然后收获重组螨变应原。

14. 生产重组螨变应原的方法，该方法包括在可以表达基因的条件下培养权利要求 12 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞，导致细胞产生融合重组螨变应原，收获融合重组螨变应原，然后除去与变应原融合的另一蛋白。

15. 螨变态反应性疾病的治疗剂，其含有权利要求 1 或 2 的重组螨变应原、权利要求 7 的片段肽或权利要求 11 的融合蛋白作为活性成分。

16. 螨变态反应性疾病的诊断剂，其含有权利要求 1 或 2 的重组螨变应原、权利要求 7 的片段肽或权利要求 11 的融合蛋白作为活性成分。

17. 权利要求 1 或 2 的抗螨变应原的抗体。

18. 权利要求 17 的抗螨变应原的抗体，其是单克隆抗体。

19. 杂交瘤，其产生权利要求 18 的单克隆抗体。

20. 屋尘中的螨变应原的免疫测定方法，其使用权利要求 17-19 的任意一项的抗体。

21. 权利要求 20 的屋尘中的螨变应原的免疫测定方法，其是 ELISA 法。

新的螨变应原

技术领域

本发明涉及具有变应原活性的重组螨变应原，具体涉及导致狗特异性的螨变应原。本发明进一步涉及编码变应原的基因、使得基因能够表达的表达载体、通过用表达载体转化获得的转化体、制备重组螨变应原的方法、螨变态反应性疾病的治疗剂，和螨变态反应性疾病的诊断剂。

背景技术

已知屋尘螨是诸如特应性皮炎和支气管哮喘的变态反应性疾病的主要原因。常规地，使用变态反应的致病物质作为治疗剂的脱敏治疗被认为是最重要的基本治疗方法。具体地，对诸如花粉病、屋尘螨变态反应和真菌性变态反应的疾病广泛进行了脱敏治疗，这些疾病是难以避免的诸如吸入的变应原的抗原诱导的。但是，由于致敏抗原的作用，脱敏治疗涉及过敏的危险，因此，需要施用安全的治疗性抗原。正在研究所述安全的致敏抗原。

至于螨变态反应性疾病，报道了两种类型的螨，即屋尘螨 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 和粉尘螨 (*Dermatophagoides farinae*) 是屋尘中的变应原来源 (参见非专利文件 1 和 2)。从这些螨分离了主要的螨变应原。已知这些螨变应原是分子量为 24 kD - 28 kD 的糖蛋白 (pI 4.6 - 7.2) 和/或包含在螨排泄物中的分子量为 14.5 kD - 20 kD 的蛋白 (pI 5 - 7.2) 和/或螨体 (参见非专利文件 3 - 7)。

至于螨变应原基因，克隆了屋尘螨的主要变应原 *Der p 1* (分子量: 25,371) 和 *Der p 2* (分子量: 14,131) 以及粉尘螨的主要变应原 *Der f 1* (分子量: 25,191) 和 *Der f 2* (分子量: 14,021)，也确定了它们的核苷酸序列 (参见非专利文件 8 - 15)。也制备了基于这些变应原的重组变应原，进行了涉及这些变应原的研究。此外，也报道了 *Der f 3*，即一种分子量为大约 30,000 的变应原的核苷酸序列 (参见非专利文件 16)。此外，作为螨变应原，也报道了 ma 10、ma 3、ma 15、ma 29、ma 44、ma 50、ma 113、ma 114 和 ma 115 (参见专利文件 1)。此外，也报道了表现与

抗-*Der f 2* 血清的强交叉反应性的 ma 124 (参见专利文件 2)。

此外,报道了 98-kDa *Der f 15*、109-kDa *Der f 15* (参见非专利文件 17)和 60-kDa *Der f 18* (参见非专利文件 18)在狗中是与 IgE 强反应的变应原。

作为诊断螨变态反应性疾病的方法,常规将皮内反应测试作为主流方法,该方法基于患者的病史,并且使用屋尘螨提取物和/或螨体提取物。该方法与涉及血清 IgE 抗体滴度(相对值)测量的 RAST(放射变应原吸附测试)方法、吸入诱导测试和鼻粘膜刺激测试等组合。但是,直接诊断螨变态反应性疾病仍然非常困难。

常规进行了支气管哮喘的脱敏治疗方法,该方法采用屋尘提取物和屋尘螨作为特异性变应原。但是,还没有成功分析屋尘的组成。此外,屋尘含有很多类型的可以诱导过敏的杂质。因此,在这些情况下,屋尘的剂量是非常有限的。因此,常规脱敏治疗的效果是非常低水平的。因此,需要用于脱敏治疗的更有效和更安全的抗原。公知的是有效用于脱敏治疗的变应原存在于螨的高分子量粗排泄物的级份中。由这些级份,不能获得足够用于脱敏治疗的量的螨变应原。因此,采用涉及从通过饲养螨获得的产物提取和纯化螨变应原的方法,获得用于治疗的抗原的稳定供应是困难的。此外,如上文的描述,常规报道了用基因重组技术制备多种重组螨变应原。但是,不能说这些变应原对于实际治疗总是有效的。需要提供具有更有效的、新的和更高的螨变应原活性的重组螨变应原。

专利文件 1 日本专利公开(Kokai) No. 7-112999 A (1995)

专利文件 2 日本专利公开(Kokai) No. 7-278190 A (1995)

非专利文件 1 *Allerg. Asthma*, 10, 329-334 (1964)

非专利文件 2 *J. Allergy*, 42, 14-28 (1968)

非专利文件 3 *J. Immunol.*, 125, 587-592 (1980)

非专利文件 4 *J. Allergy Clin. Immunol.*, 76, 753-761 (1985)

非专利文件 5 *Immunol.*, 46, 679 - 687 (1982)

非专利文件 6 *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 81, 214-223 (1986)

非专利文件 7 *J. Allergy Clin. Immunol.*, 75, 686-692 (1985)

非专利文件 8 *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 85,127-129 (1988)

- 非专利文件 9 J. Exp. Med., 167, 175-182 (1988)
非专利文件 10 J. Exp. Med., 170, 1457-1462 (1989)
非专利文件 11 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 118-123 (1990)
非专利文件 12 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 124-129 (1990)
非专利文件 13 Jpn. J. Allergol., 39, 557-561 (1990)
非专利文件 14 Clinical and Experimental Allergy, 21, 25-32 (1991)
非专利文件 15 Clinical and Experimental Allergy, 21, 33-37 (1991)
非专利文件 16 FEBS Lett., 377, 62-66 (1995)
非专利文件 17 Vet. Immunol. Immunopathol, 78, 231-247 (2001)
非专利文件 18 J. Allergy Clin. Immunol, 112, 79-86 (2003)

发明内容

本发明的一个目的是提供不含诱导过敏的杂质的安全和有效的重组螨变应原，作为螨变态反应性疾病的治疗剂或诊断剂。更具体地，本发明的目的是提供来源于螨体的基因，并且提供使得基因能够表达的表达载体。本发明的另一目的是提供具有变应原活性的新的螨变应原，其是通过表达来源于螨体的基因而获得的。本发明的进一步的目的是提供含有重组螨变应原作为活性成分的螨变态反应性疾病的新治疗剂，并且提供含有重组螨变应原的螨变态反应性疾病的新诊断剂。

作为广泛研究以实现上述目的的结果，发明人发现了新的螨变应原，并且发现该变应原在脱敏治疗中发挥极佳的作用。因此，发明人完成了本发明。

具体地，本发明的描述如下：

[1]以下重组螨变应原(a)或(b)：

- (a)包含 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列的重组螨变应原；或
(b)包含通过对 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列，并且具有螨变应原活性的重组螨变应原。

[2]编码以下螨变应原(a)或(b)的基因：

- (a)包含 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列的螨变应原；或
(b)包含通过对 SEQ ID NO: 2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列，并且具有螨变应原活性的螨

变应原。

[3]包含以下 DNA (c)或(d)的基因:

(c)包含 SEQ ID NO: 1 或 34 所示核苷酸序列的 DNA; 或

(d)在严格条件下与包含特定序列的 DNA 杂交, 并且编码具有螨变应原活性的蛋白的 DNA, 所述特定序列与包含 SEQ ID NO: 1 或 34 所示核苷酸序列的 DNA 的序列互补。

[4]根据[1]的螨变应原的片段肽。

[5]根据[4]的片段肽, 其包含含有 SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列中的至少一个序列的氨基酸序列。

[6]螨变应原的片段基因, 其编码[4]或[5]的片段肽。

[7]重组载体, 其包含[2]或[3]的基因或[6]的片段基因。

[8]融合蛋白, 其由[1]的螨变应原和另一种蛋白组成。

[9]用[7]的表达载体转化的细菌、酵母、昆虫或动物细胞。

[10]生产重组螨变应原的方法, 该方法包括在可以表达基因的条件下培养[9]的细菌、酵母、昆虫或动物细胞, 导致细胞产生重组螨变应原, 然后收获重组螨变应原。

[11] 生产重组螨变应原的方法, 该方法包括在可以表达基因的条件下培养[9]的细菌、酵母、昆虫或动物细胞, 导致细胞产生融合重组螨变应原, 收获融合重组螨变应原, 然后除去与变应原融合的另一蛋白。

[12]螨变态反应性疾病的治疗剂, 其含有[1]的重组螨变应原、[4]的片段肽或[8]的融合蛋白作为活性成分。

[13] 螨变态反应性疾病的诊断剂, 其含有[1]的重组螨变应原、[4]的片段肽或[8]的融合蛋白作为活性成分。

[14]抗[1]的螨变应原的抗体。

[15]根据[14]的抗螨变应原的抗体, 其是单克隆抗体。

[16]杂交瘤, 其产生[15]的单克隆抗体。

[17]屋尘中的螨变应原的免疫测定方法, 其使用[14] - [16]的任意一项的抗体。

[18]根据[17]的屋尘中的螨变应原的免疫测定方法, 其是 ELISA 法。

说明书包括了本申请的优先权文件日本专利申请 No. 2004-116089 的说明书和/或附图中公开的部分或所有内容。

附图说明

图 1 是表示重组狗 FcεRIα链的电泳结果的照片。

图 2 是表示重组狗 FcεRIα链与 IgE 的结合的照片。

图 3 显示检测粉尘螨特异性 IgE 的结果。

图 4 是显示用重组狗 FcεRIα链进行 Western 印迹分析的结果的照片。

图 5 是显示从粉尘螨提取的抗原的 2-D (二维) 电泳图样的照片。

图 6 显示的照片显示了粉尘螨变应原蛋白的 2-D (二维) 电泳和 Western 印迹分析的结果。

图 7-1 显示了 Zen1 基因的部分核苷酸序列和氨基酸序列。

图 7-2 显示了 Zen1 基因的部分核苷酸序列和氨基酸序列 (续图 7-1)。

图 8-1 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列。

图 8-2 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列 (续图 8-1)。

图 8-3 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列 (续图 8-2)。

图 8-4 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列 (续图 8-3)。

图 9 是显示用大肠杆菌制备然后纯化的重组 Zen1 的 SDS-PAGE 结果的照片。

图 10 是显示通过抗 Zen1 多克隆抗体的 Western 印迹分析的反应结果的照片。泳道 1 显示重组 Zen1 的结果, 用的 2 显示螨体的结果。

图 11 是显示 ELISA 分析的重组 Zen1 与 IgE 的反应性结果的照片。

实施本发明的最佳方式

下面详细描述本发明。

(1) 分离螨变应原 Zen1 蛋白和确定其部分序列

用获自临床诊断为具有螨变态反应的动物的螨变应原特异性 IgE 确定螨变态反应。具体地, 用含有例如螨变应原特异性 IgE、螨提取物、识别病原体特异性 IgE 的 IgE 受体的血清, 通过 Western 印迹鉴定螨

变应原。可以通过公知的方法鉴定变应原。

由此鉴定的本发明的新的螨变应原是一种 Zen1 蛋白，分子量为 150 kDa - 200 kDa。

可以通过进行电泳，然后从螨变应原斑点提取螨变应原而分离鉴定的螨变应原。此时，需要进行 2-D (二维) 电泳，以便与其它蛋白完全分离。

用由此提取的螨变应原，可以通过公知的方法确定部分序列。公知的确定部分序列的方法的实例包括基于 MS/MS 和肽作图的从头测序。

(2)通过 RT-PCR 制备 cDNA 克隆

可以通过从螨提取 mRNA，用 mRNA 作模板合成螨变应原 cDNA，构建 cDNA 文库，然后筛选靶，获得编码本发明的螨变应原的 DNA。

所述 mRNA 的供应源是螨体，螨优选是粉尘螨、屋尘螨等，它们是屋尘螨。但是，其实例不限于此。通过常用技术可以制备所述 mRNA。由此获得的 mRNA 作为模板，基于上文(1)中获得的序列信息设计引物，然后合成编码螨变应原的 cDNA 片段。将由此获得的片段亚克隆到合适的载体如 pGEM (由 Promega 生产)。然后通过诸如循环测序方法的标准方法确定核苷酸序列。

SEQ ID NOS: 3 - 19 示出了本发明的螨变应原的部分氨基酸序列。其中，通过从头测序确定了 SEQ ID NOS: 3 - 7 中所示的序列。N 末端氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 19。通过肽作图确定了 SEQ ID NOS: 8 - 18 中所示的序列。

本发明包括螨变应原，它包含的氨基酸序列包含至少一个 SEQ ID NOS: 3-19 所示的氨基酸序列，这些序列代表作为螨变应原的 Zen1 蛋白的片段。

编码作为本发明的螨变应原的 Zen1 蛋白的 Zen1 基因的 DNA 的部分核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 1，其全长核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 34。作为本发明的螨变应原的 Zen1 蛋白的部分氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 2，其全长氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 35。

只要包含所述氨基酸序列的蛋白具有螨变应原活性，在氨基酸序列中可以发生至少一个，优选一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加。

例如，可以缺失 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列

的至少一个, 优选一个或几个(如 1-10, 进一步优选 1-5 个)氨基酸。可以在 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列中添加至少一个, 优选一个或几个(如 1-10, 进一步优选 1-5 个)氨基酸。或者, 可以用其它氨基酸取代 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列中的至少一个, 优选一个或几个(如 1-10, 进一步优选 1-5 个)氨基酸。

通过对 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的所述氨基酸序列包括与 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列具有至少 85% 或更多, 优选 90% 或更多, 进一步优选 95% 或更多, 特别优选 97% 或更多同源性的序列, 所述同源性例如是用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information), 采用最初设置的缺省参数计算的。

具有通过对 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的所述氨基酸序列的蛋白与具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列的蛋白基本相同。

此外, 本发明的基因的实例也包括能够在以下条件下与包含特定序列的 DNA 杂交, 并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 DNA, 所述特定序列与具有上述 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 34 所示 DNA 序列的基因的序列互补。具体地, 所述条件使得能够用固定了 DNA 的滤器在 68°C 下 0.7 M - 1.0 M NaCl 存在下杂交, 并且在 68°C 下用 0.1 - 2 × SSC 溶液 (1 × SSC 包含 150 mM NaCl 和 15 mM 柠檬酸钠) 洗涤, 从而进行鉴定。或者, 本发明的基因是当通过 Southern 印迹方法转移并固定在硝酸纤维素膜上, 然后 42°C 下在杂交缓冲液 (50% 甲酰胺, 4 × SSC, 50 mM HEPES (pH 7.0), 10 × Denhardt's 溶液, 和 100 μg/ml 鲑鱼精子 DNA) 中反应过夜时能形成杂交体的 DNA。

此外, 本发明还包括相应于上述 DNA 的 RNA, 或能够在严格条件下与该 RNA 杂交, 并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 RNA。

可以通过将本发明的基因连接 (插入) 到合适的载体中而获得本发明的重组载体。用于插入本发明的基因的载体不是特别限定的, 只要它们能够在诸如细菌、酵母或动物细胞的宿主中复制。所述载体的实例包括质粒 DNA 和噬菌体 DNA。用于构建表达载体的载体 DNA 是

广泛普及并且容易获得的。所述载体 DNA 的实例包括 pUC19 和 pTV118 N (由 Takara Shuzo 生产)、pUEX2 (由 Amersham 生产)、pGEX-4T, 和 pKK233-2 (由 Pharmacia 生产), 以及 pMAM-neo (由 Clontech 生产)。

构建本发明的所述表达载体的方法并不受到特别的限制, 并且可以根据标准方法进行。例如, 可以将 *EcoRI* 消化的蠕变应原 cDNA 片段插入质粒 pUC19 多克隆位点中的 *EcoRI* 位点。此外, 可以将该片段连接于质粒载体 pGEX-4T 的 *EcoRI* 位点, 使得能够获得表达载体。

用本发明的所述表达载体转化的细菌、酵母或动物细胞不受特别的限制, 只要它们能够表达本发明的基因。所述细菌的实例包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。所述酵母的实例包括啤酒糖酵母等。所述动物细胞的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Sf21 和 Sf9 细胞, 它们是 *Mamestra brassicae* 卵巢细胞、猴 COS 细胞和小鼠成纤维细胞。

本发明的重组蠕变应原的实例包括直接表达的蠕变应原和表达为与其它蛋白的融合蛋白的那些。下文中, 所述融合蛋白称作融合重组蠕变应原。形成所述融合蛋白的其它蛋白的实例包括, 但不特别限定于 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S-转移酶、蛋白 A 和麦芽糖结合蛋白。

本发明的重组蠕变应原也可是仅仅由对变应原活性关键的区域组成的肽片段或包含对变应原活性关键的地域的肽片段。此外, 除了通过表达单独的蠕变应原蛋白获得的产物, 可以通过除去其它蛋白, 从表达为融合蛋白的产物获得所述重组蠕变应原。

具体地, 通过表达来源于蠕体的基因获得本发明的重组蠕变应原, 它是具有蠕变应原活性的蛋白。此处, “具有蠕变应原活性”是指能够在哺乳动物中诱导变态反应。

可以通过以下方法生产本发明的蠕变应原。在完成上述转化株的培养后, 收获微生物体, 悬浮于含有多种蛋白酶抑制剂的缓冲液中, 然后通过超声处理进行破碎。用含有诸如苯基甲磺酰氟、一碘乙酸、抑胃酶肽 A 或乙二胺四乙酸的蛋白酶抑制剂和诸如十二烷基硫酸钠(SDS)、triton X-100 或 Nonidet P40 的表面活性剂的缓冲液提取细胞碎屑中的定位于膜的蛋白。通过采用固定的谷胱甘肽的亲亲和层析、采用固定的抗蠕抗体的亲和层析等, 纯化从提取物或培养物浓度物获得的由蠕变应原和谷胱甘肽 S-转移酶组成的融合蛋白。此外, 固定了谷胱

甘肽的载体是由 Pharmacia 生产的载体。此外，固定了抗螨抗体的载体是通过将兔抗螨抗体与活化的 Tresyl 载体(如, Tresyl GM 凝胶(由 Kurita Water Industries 生产), Tresyl Toyopearl (由 Tosoh 生产)和 Tresyl sepharose (由 Pharmacia 生产))共价结合而制备的载体。此外, 可以获得由螨变应原和 His 标志(如 6× His)组成的融合蛋白, 然后用固定了金属的亲合珠等进行纯化。

用蛋白酶消化纯化的融合重组螨变应原, 然后通过单个或组合的公知纯化方法进行分级分离, 同时用 ELISA 和螨变态反应性疾病患者的白细胞组胺释放测定(Allergy 37, 725 (1988))进行监测, 所述纯化方法包括凝胶过滤层析、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水层析、层析聚焦、等电聚集法和凝胶电泳法。

本发明还包括含有螨变应原作为活性成分的螨变态反应性疾病治疗剂。所述治疗剂用作多种类型的螨变态反应性疾病的治疗剂。此处, “螨变态反应性疾病”包括所有由螨特异性抗原导致的变态反应性疾病, 如特应性支气管哮喘、变态反应性鼻炎、变态反应性结膜炎和特应性皮炎。

可以通过例如以下方法制备本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂: 干燥通过上述方法纯化的重组螨变应原或其片段肽, 收获粉末形式的所述变应原或片段肽, 然后制备螨变态反应性疾病的治疗性脱敏剂。但是, 该方法不特别限于此。当将本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂用作治疗性脱敏剂时, 可以直接使用该试剂, 或如果必要, 用作通过标准方法提供的与通常使用的佐剂和多种添加剂的联合药物, 所述佐剂和多种添加剂如稳定剂、赋形剂、增溶剂、乳化剂、缓冲剂、润滑剂、防腐剂 and 着色剂。例如, 将粉末形式的纯化的重组螨变应原溶解于补加了苯酚的生理盐水中, 然后用作抗原的储液, 用于脱敏治疗。

可以通过常规施用途径, 如经皮、口服、皮内、皮下、肌肉和黏膜内施用方法施用本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂。此外, 本发明的治疗剂也可以用于经皮或经粘膜药物, 如锭剂、舌下含片、滴眼液、鼻内喷雾剂、泥敷剂、乳膏和洗剂。此外, 施用本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂的剂量和施用次数可以根据施用途径、症状等进行合适的选择, 使得对于成人, 剂量在每次施用大约 20 μg 或更少的范

围内。每周一次或几次进行施用。

此外，本发明的螨变态反应性治疗剂不仅用作抗螨变态反应性疾病的治疗剂，也可以用作抗该疾病的预防剂。此外，本发明的螨变态反应性疾病治疗剂可以安全用于人体，而不产生过敏诱导作用。

本发明的螨变态反应性诊断剂用作诊断抗螨变态反应性疾病的皮内反应的试剂或诊断螨变态反应的滴定剂。当将诊断剂用作诊断皮内反应的诊断剂时，通过制备通过根据标准方法的上述方法纯化的重组螨变应原或其片段肽而获得该试剂。例如，将重组螨变应原干燥并制成粉末，将粉末溶解并稀释于含有苯酚的生理盐水，然后使用。采用诊断剂作为诊断皮内反应的试剂的方法是根据标准方法使用的。

此外，当将诊断剂用作诊断螨变态反应的滴定剂时，类似地通过标准方法制备该试剂。例如，将重组螨变应原或其片段肽合适地溶解并稀释于 Hank's 缓冲液，将得到的溶液用作组胺释放滴定试剂。该方法通常是通过以下程序进行的。具体地，将螨变态反应性疾病患者的血液或通过离心从患者血液获得的血细胞级份悬浮于缓冲液中。用重组螨变应原作为滴定剂，对固定量的血细胞悬浮液进行滴定。用 HPLC 测量通过变应原刺激从嗜碱性细胞释放的组胺量 [Allergy 37, 725 (1988)]。

在组胺释放滴定中，基于最大释放量的 50% (滴定曲线的反曲点) 确定组胺的释放量。具体地，该滴定的特征在于：(1) 根据血细胞悬浮液的滴度直接测量患者的变应原敏感性；和 (2) 在将血浆与重组螨变应原预反应后，通过用反应溶液对血细胞进行滴定获得的值 (血液滴定曲线值) 通常高于通过用重组螨变应原对血细胞悬浮液进行滴定获得的值 (血细胞悬浮液滴定曲线值)。这是由于血浆中能够中和变应原的 IgG 抗体 (封闭抗体) 的存在。因此，可以根据血液滴定曲线从血细胞悬浮液滴定曲线偏移的程度获得封闭抗体滴度。变应原敏感性和该封闭抗体滴度使得能够实现准确的螨变态反应诊断。该组胺释放滴定测试也可以用于监测脱敏治疗的效果。

本发明也包括抗本发明的螨变应原的抗体或其片段肽。所述抗体可以通过公知方法作为多克隆抗体或单克隆抗体获得。所述抗体可以用于测量屋尘中螨变应原的存在、不存在等。所述测量可以用公知的免疫学方法如 ELISA 进行。在所述测量后，从屋尘中提取蛋白，然后

测量。

此外，表达了本发明的重组螨变应原蛋白。通过用如此表达的重组蛋白进行测试，如特异性 IgE 反应测试或用螨变态反应患者狗进行的皮内反应测试，可以证实本发明的螨变应原蛋白的变应原蛋白功能。

将在下面的实施例中进一步描述本发明。这些实施例不意欲限制本发明的范围。

此外，除非特别指出相反的意思，用于每个实施例的试剂是从 Nacalai Tesque, Wako Pure Chemical Industries, Sigma, Difco 等购买的商品化试剂。此外，用于基因工程的试剂，如限制酶，是从 Takara Shuzo, Toyobo, Invitrogen 等购买的，然后根据制造商的说明书进行使用。

[实施例 1] 建立 IgE 检测系统

通过 PCR 扩增狗高亲和力 IgE 受体 α 链(Fc ϵ RI α) cDNA 的细胞外区，排除其信号肽位点，并且加入了限制酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点。用 T4-DNA 连接酶将所得物连接到大肠杆菌表达质粒载体 pGEX4T-1 (由 Amersham Biosciences 生产)的 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点。用由此获得的重组质粒转化大肠杆菌 TOP10 菌株(由 Invitrogen 生产)。在含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中将转化的菌株 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。随后，在新的 LB 培养基上传代培养少量菌株，直到 600nm 处的 OD 值达到 1.0。随后，添加 IPTG (异丙基-1-硫- β -D-半乳糖苷)，达到 1mM 的终浓度。3 小时后，收获细胞，然后用 PBS (pH 7.4)清洗一次。通过在 PBS (pH 7.4)中超声处理而裂解再次收获的细胞，通过离心除去不溶的级份，然后收集含有与谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合的狗 Fc ϵ RI α 的可溶级份。随后，用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱(由 Amersham Biosciences 生产)从可溶级份获得与 GST 融合的狗 Fc ϵ RI α 。从 10 升培养溶液获得 1.0 mg 融合蛋白(GST- Fc ϵ RI α)。证实了获得的纯化 GST-Fc ϵ RI α 在 SDS-PAGE 后显示出单个 45kDa 的条带(图 1)。将重组的狗 IgE (由 BETHYL 生产)和纯化的狗 IgG 固定在免疫板(由 Nalge Nunc International 生产)上，采用从 1.0 μ g, 0.1 μ g, 0.05 μ g, 0.025 μ g, 0.0125 μ g, 以及然后 0.00625 μ g 的 2 倍系列稀释，以便证实纯化的 GST-Fc ϵ RI α 的反应性。证实了纯化的 GST-Fc ϵ RI α 与 IgE 反应，但不与 IgG 反应(图

2)。将从粉尘螨提取的 4.0 μg 抗原（由 GREER 生产）固定在免疫板（由 Nalge Nunc International 生产）上。使粉尘螨阳性狗血清（通过用生理盐水稀释 50 倍的粉尘螨抗原溶液（由 GREER 生产）进行皮内反应证实为粉尘螨阳性的狗血清）与抗原反应。然后加入生物素标记的 GST-Fc ϵ RI α 。此外，基于添加过氧化物酶偶联的链亲和素（由 Jackson Immuno Research 生产）和底物导致的显色反应，证实了 GST-Fc ϵ RI α 链识别螨变应原特异性 IgE（图 2）。此外，将从粉尘螨提取的 4.0 μg 抗原（由 GREER 生产）固定在免疫板（由 Nalge Nunc International 生产）上。使通过用提取自粉尘螨的抗原免疫而获得的狗血清与抗原反应。证实 GST-Fc ϵ RI α 不与 56 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 1 小时的粉尘螨阳性狗血清反应，也不与纯化的狗 IgG 反应，但与重组的狗 IgE（由 BETHYL 生产）反应。认为 GST-Fc ϵ RI α 识别变应原特异性 IgE（图 3）。在图 3 中，“-”表示血清没有在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 小时，“+”表示血清在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 小时，“cont.”表示未免疫的血清。

[实施例 2] 通过 Western 印迹分析螨的主要变应原

用 8 只狗的血清和血浆样品进行 Western 印迹分析。这 8 只狗发生了特应性皮炎，并且诊断患有螨变态反应，该诊断是基于用从粉尘螨变应原（由 GREER 生产）提取的抗原溶液进行的皮内反应和采用实施例 1 中产生的重组狗 Fc ϵ RI α 链进行的 ELISA 法。将 β -巯基乙醇加入从粉尘螨提取的抗原的 100.0 μL 溶液，达到 50.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的终浓度。加入 200 μL 由此制备的 Laemmli 样品缓冲液（由 BIO-RAD 生产），然后 100 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 5 分钟。将所得物加样到凝胶浓度为 5% - 20% 的聚丙烯酰胺凝胶（PAGE；由 ATTO 生产）上，然后进行电泳。完成电泳后，将所得物转移到 PVDF 膜（Hybond-P；由 Amersham Biosciences 生产）。使膜在封闭溶液（补加了 5% 脱脂奶的 PBST（通过将 Tween20 添加到 PBS 中达到 0.1% 的终浓度而制备））中 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜。在 PBST 中将膜清洗 10 分钟，在封闭溶液中将每份狗血清或血浆样品稀释 10 倍。将每个稀释的溶液样品加入到膜，然后在室温下反应 3 小时。用 PBST 清洗 3 次（每次 10 分钟）。用封闭溶液稀释生物素标记的狗 Fc ϵ RI α ，然后将稀释的溶液加入膜，随后在室温下反应 2 小时。用 PBST 清洗 3 次（每次 10 分钟），将用 PBST 稀释 10,000 倍的链亲和素-HRP

偶联物（由 Amersham Biosciences 生产）加入膜，然后室温下反应 1 小时。用 PBST 清洗 5 次（每次 10 分钟）后，将 ECL Plus Western 印迹检测系统（由 Amersham Biosciences 生产）的反应溶液加入到膜上，然后在室温下反应 5 分钟。然后，用 X 射线膜(Hyperfilm ECL; 由 Amersham Biosciences 生产)检测信号。结果，在相应于分子量 150 kDa 的条带和相应于分子量 250 kDa 的条带之间检测到了表现强反应的蛋白（图 4）。在图 4 中，用箭头表示的条带相应于表现出强反应，并且分子量为 150 kDa - 250 kDa 的蛋白。在图 4 中，从 1 - 8 的数字分别表示 8 只狗，“ct.”表示阴性血清。

[实施例 3] 通过 2-D（二维）电泳分析螨变应原蛋白

通过 2-D（二维）电泳分离与 IgE 强反应的分子量为 150 kDa - 250 kDa 的变应原蛋白。用 Protean IEF 细胞(由 BIO-RAD 生产)进行 2-D（二维）电泳。将 1.0 mg 从粉尘螨提取的抗原(由 GREER 生产)溶解于 1.0mL 的膨胀缓冲液(2-D 起始试剂盒; 由 BIO-RAD 生产)。在活性条件下(50 V, 20℃和 12 小时)用 17cm 长的 IPG Ready strip 凝胶(pH 4-7; 由 BIO-RAD 生产)和聚焦盘使 300 μ L 由此获得的溶液膨胀。膨胀后，在以下条件下进行聚焦。首先，在步骤 1（250 V, 20 分钟, 20℃）进行除去过量盐的程序。在步骤 2，电压从 250 V 升高到 10,000 V，共 6 小时。在步骤 3，用 10,000V 的电压和总共 60,000 VH 的电压时进行聚集。在 2-D（二维）电泳前，用 SDS-PAGE 平衡缓冲液 I (6 M 尿素, 0.375 M Tris pH 8.8, 2% SDS, 20% 甘油, 和 2% (w/v)DTT; 由 BIO-RAD 生产)将 IPG ready strip 凝胶轻柔振荡 10 分钟。随后，用 SDS-PAGE 平衡缓冲液 II(6 M 尿素, 0.375 M Tris pH 8.8, 2% SDS, 20%甘油, 和 2.5% (w/v) 碘乙酰胺; 由 BIO-RAD 生产)进一步将凝胶轻柔振荡 10 分钟, 从而进行平衡。用 1% (v/w)低熔点琼脂糖（由 BIO-RAD 生产）将平衡的 IPG ready strip 凝胶紧密附着于 PII ready 凝胶(8-16%; 由 BIO-RAD 生产)。用 40mA 的恒定电流（起始电压是 135V，最终电压是 400V）电泳大约 3 小时。电泳后，用 Bio-Safe (由 BIO-RAD 生产)对凝胶染色，由此可以对蛋白斑点进行图样分析（图 5）。

[实施例 4] 通过 Western 印迹分析而鉴定变应原斑点

2-D (二维)电泳后, 将蛋白斑点转移到 PVDF 膜(Hybond-P; 由 Amersham Biosciences 生产)。使膜在封闭溶液(补加了 5%脱脂奶的 PBST (通过将 Tween20 添加到 PBS 中达到 0.1%的终浓度而制备))中 4℃下静置过夜。在 PBST 中将膜清洗 10 分钟, 在封闭溶液中将狗血清或血浆样品稀释 10 倍。将由此稀释的溶液加入到膜, 然后在室温下反应 3 小时。用 PBST 清洗 3 次(每次 10 分钟), 用封闭溶液稀释生物素标记的狗 FcεRIα。将稀释的生物素标记的狗 FcεRIα加入膜, 随后在室温下反应 2 小时。用 PBST 清洗 3 次(每次 10 分钟), 将用 PBST 稀释 10,000 倍的链亲和素-HRP 偶联物(由 Amersham Biosciences 生产)加入膜。室温下反应 1 小时。用 PBST 清洗 5 次(每次 10 分钟)后, 将 ECL Plus Western 印迹检测系统(由 Amersham Biosciences 生产)的反应溶液加入到膜上, 然后在室温下反应 5 分钟。用 X 射线膜(Hyperfilm ECL; 由 Amersham Biosciences 生产)检测信号。结果, 在 pH 约 4.5, 在相应于分子量 150 kDa 的条带和相应于分子量 250 kDa 的条带之间检测到了表现强反应的斑点。由此, 获得了相应于本发明的变应原蛋白(Zen1)的斑点(图 6)。在图 6 中: 左上图 6-1 显示了粉尘螨的 2-D (二维)电泳图样(pH 4-7); 右上图 6-2 显示了用发生特应性皮炎的狗患者的粉尘螨阳性血清进行的 Western 印迹分析(pH 4-7)的结果; 左下图 6-3 显示了粉尘螨的 2-D(二维)电泳图样(pH3.9-5.1); 右下图 6-4 显示了与 2-D (二维)电泳图样相比, 用发生特应性皮炎的狗患者的粉尘螨阳性血清进行的 Western 印迹分析(pH3.9-5.1)获得的反应斑点(斑点在图的上部表现为黑色的圆形斑点, 并且用箭头表示)。用箭头表示的斑点观察到了强反应。

[实施例 5] Zen1 蛋白的蛋白组分析

从凝胶上切下通过 2-D (二维)电泳分离的 Zen1 蛋白斑点, 然后进行 MS/MS 分析。可以获得大量 MS/MS 数据, 但是没有证实任何命中。对 5 种认为是新蛋白的肽进行了从头测序法, 由此确定了氨基酸序列(SEQ ID NOS: 3-7)(表 1)。对这些氨基酸序列进行了 BLAST 检索, 但没有获得明确的命中。

表 1

部分序列 415	:	MKSLLEANEELLK
部分序列 445	:	SAQDVLEK
部分序列 847	:	FMQSLLEADELLR
部分序列 448	:	LPDSDLKDELAK
部分序列 491	:	LPDSDLKNELAEK

通过从头测序法确定的 Zen1 的部分氨基酸序列

[实施例 6] Zen1 蛋白的肽作图分析

从凝胶上切下通过 2-D (二维) 电泳分离的 Zen1 蛋白斑点。制备肽图谱, 然后进行 8 个峰的氨基酸测序。结果, 确定了 11 个氨基酸片段的序列 (SEQ ID NOS: 8 - 18) (表 2)。进行了 BLAST 检索, 但没有获得明确的命中。

表 2

部分序列 21	:	MYNFHLEAY
部分序列 28	:	IAHFLELE
部分序列 32	:	IAHFELE
部分序列 23-1	:	KFQSLLEANE
部分序列 23-2	:	IAHLESE(T)
部分序列 24	:	KFQSLLEANE
部分序列 22	:	DAQLEXE
部分序列 9-1	:	SAQDVSL
部分序列 9-2	:	RNEMNE
部分序列 20-1	:	MFQSLLEANE
部分序列 20-2	:	DLARDVXL

通过 Zen1 的肽作图获得的相应于峰的氨基酸序列

[实施例 7] 分析 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列

从凝胶上切下通过 2-D (二维) 电泳分离的 Zen1 蛋白斑点。采用 HP G1005A 蛋白测序系统, 通过标准方法确定 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列 (SEQ ID NO: 19) (表 3)。对序列进行了 BLAST 检索, 但没

有获得明确的命中。

表 3

N-末端序列：DNRDDVLKQTEE

Zen1 N-末端氨基酸序列

[实施例 8] 提取螨总 RNA 和分离螨 poly(A) mRNA

根据标准方法通过培养和生长粉尘螨而获得的未处理的螨体置于大约 2.0L 饱和盐溶液中。充分搅拌溶液，然后静置 30 分钟。用粗滤器撇出上清液中的螨体，用生理盐水清洗，然后干燥。将 1.0 g 螨体进行总 RNA 提取，用 FastTrack 2.0 试剂盒(由 Invitrogen 生产)，根据试剂盒的手册分离螨 poly(A) mRNA。

[实施例 9] 合成螨 cDNA

用 100 ng 实施例 8 中分离的螨 poly(A) mRNA 作为模板，并且采用 cDNA 合成试剂盒(ReverTraAce- α -;由 Toyobo 生产)，根据试剂盒的手册进行逆转录反应。

[实施例 10] 通过 PCR 扩增 Zen1 基因

根据 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列，将引物 N-1 (5' - GAYGAYGTNTTRAARCARACNGARGAR-3' (SEQ ID NO: 20): Y = C 或 T, N = A 或 C 或 G 或 T, 并且 R = A 或 G) 和 N-2 (5' -GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR-3' (SEQ ID NO: 21): Y = C 或 T, N = A 或 C 或 G 或 T, 并且 R = A 或 G)设计为有义引物。此外，根据作为反向引物的通过从头测序方法获得的氨基酸序列(表 4)，设计 12 个引物(SEQ ID NOS: 22 - 33)。采用作为模板的 1.0 μ g 实施例 9 中合成的螨 cDNA、Ex taq 聚合酶(由 TaKaRa Bio 生产)和根据手册制备的每个样品，在 94 $^{\circ}$ C 下进行热变性处理 2 分钟，并且进行 35 个循环的反应，每个循环由 94 $^{\circ}$ C 下 1 分钟，65 $^{\circ}$ C 下 2 分钟，和 72 $^{\circ}$ C 下 3 分钟组成。在 72 $^{\circ}$ C 下进行 9 分钟的进一步反应后，在 4 $^{\circ}$ C 储存样品。当用反向引物

415-4 (5' -RTTNAGNAGRTCYTTNGCRTCYTT-3' (SEQ ID NO: 25):
N = A 或 C 或 G 或 T, R = A 或 G, 并且 Y = C 或 T)进行 PCR 时, 获得
了大约 1,000 bp 的 DNA 片段. 当用 491-2 (5' -RTT RTC NGC NAG RTC
YTT RTT-3' (SEQ ID NO: 29): N = A 或 C 或 G 或 T, R = A 或 G, 并
且 Y = C 或 T)进行 PCR 时, 获得了大约 880bp 的 DNA 片段.

表 4

N-1	: 5' · GAY GAY GTN TTR AAR CAR ACN GAR GAR - 3'
N-2	: 5' · GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR - 3'
415-1	: 5' · RTT RAA RAA RTC YTT NGC RTC YTT RAA - 3'
415-2	: 5' · RTT NAG RAA RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
415-3	: 5' · RTT RAA NAG RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
415-4	: 5' · RTT NAG NAG RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
445-1	: 5' · RTT RTC RAA NAC YTC RTG NGC - 3'
445-2	: 5' · RTT RTC NAG NAC YTC RTG NGC - 3'
491-1	: 5' · RTT RTC NGC RAA RTC YTT RTT - 3'
491-2	: 5' · RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT - 3'
448-1	: 5' · RTT NGC RAA RTC YTC RTT RAA YTC - 3'
448-2	: 5' · RTT NGC NAG RTC YTC RTT RAA YTC - 3'
448-3	: 5' · RTT NGC RAA RTC YTC RTT NAG YTC - 3'
448-4	: 5' · RTT NGC NAG RTC YTC RTT NAG YTC - 3'

合成用于扩增 Zen1 基因的混合引物序列。当用 N-1 和 415-4 进行 PCR 时, 获得了大约 1000bp 的片段。当用 N-1 和 491-2 进行 PCR 时, 获得了大约 880bp 的片段。

N = A 或 C 或 G 或 T, R = A 或 G, Y = C 或 T

[实施例 11] 克隆 Zen1 基因

从琼脂糖凝胶(SUPREC-01, 由 TaKaRa 生产)收集用实施例 10 中的引物 N-1 和 415-4 扩增的 DNA 片段。用 T4 DNA 连接酶将 DNA 片段连接到 pGEM-T Easy 载体(由 Promega 生产)的克隆位点, 从而转化宿主大肠杆菌 TOP10 (由 Invitrogen 生产)。具体地, 混合大肠杆菌感受态细胞和质粒, 然后在冰上对混合物进行温度处理大约 30 分钟, 42 ℃ 下 30 秒, 然后在冰上 2 分钟。然后将所得物悬浮于 SOC 培养基(2 % Trypton, 0.5 % 酵母提取物, 0.05 % NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 和 20 mM 葡萄糖), 然后 37℃ 下温育 1 小时。随后, 在补加了

50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基 (1% 酵母提取物, 0.5% trypton 和 1% NaCl) 上 37 $^{\circ}\text{C}$ 下将转化的大肠杆菌培养过夜, 从而获得大肠杆菌菌落。选择认为含有插入的片段的白色克隆。在补加了 50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基上培养克隆过夜。用 GFX (商标) Micro Plasmid Prep 试剂盒 (由 Amersham Bioscience 生产) 纯化质粒 DNA。用染料引物循环测序试剂盒 (由 Amersham 生产) 进行测序反应, 然后用荧光 DNA 测序仪 (由 Shimadzu Corporation 生产) 进行核苷酸序列分析。此外, 当发现 3 个克隆的核苷酸序列在其核苷酸序列分析时完全匹配时, 进行最终的确定 (图 7-1 和图 7-2)。

[实施例 12] 分析 Zen1 基因

用 Genetyx-win ver.6 软件 (由 Software Development 生产) 分析实施例 11 中克隆的 Zen1 基因。碱基的数目是 1020bp, 氨基酸残基的数目是 340 (图 7-1, 图 7-2, 和 SEQ ID NOS: 1 和 2)。对基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了 BLAST 检索, 但是没有获得明确的命中。Zen1 基因被认为是新基因。

[实施例 13] 分离全长 Zen1 cDNA

通过 RACE (cDNA 末端的快速扩增) 法分离全长 cDNA。采用 SV 总 RNA 分离试剂盒 (由 Promega 生产), 从实施例 8 中使用的蠕体提取总 RNA。用 GeneRacer (商标) 试剂盒, 根据试剂盒的手册制备 RACE 的模板。此外, 基于实施例 12 中获得的 Zen1 部分序列, 合成了第一轮 PCR 和嵌套式 PCR 的引物, 用于扩增 5' 和 3' 末端 (表 5)。5' 和 3' 末端的扩增反应按如下进行。在 1.0 μL 根据上文制备的 RACE 模板中加入包含在 GeneRacer (商标) 试剂盒中的 5' 和 3' 引物各 3.0 μL , 1.0 μL dNTP 混合物溶液 (各 10 mM), 包含在 Advantage cDNA 聚合酶混合物 (由 CLONTECH 生产) 中的 5.0 μl 10 \times cDNA PCR 反应缓冲液, 1.0 μL Advantage cDNA 聚合酶混合物, 和按上文所述合成并且调节在 10 μM 的第一轮 PCR 的基因特异性引物各 1.0 μL 。然后用无菌蒸馏水将得到的溶液的体积调节到 50.0 μL 。用 Touchdown PCR 法进行基因扩增。制备的样品溶液在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下热变性 1 分钟, 进行 5 轮反应, 每轮由 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 秒和 72 $^{\circ}\text{C}$ 下 4 分钟组成, 进行 5 轮反应, 每轮由 94 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 秒和

70℃下4分钟组成，进行25轮最终反应，每轮由94℃下30秒和68℃下4分钟组成，然后在4℃下储存。完成第一轮PCR后，向5'和3'末端扩增反应溶液各1.0 mL中加入包含在GeneRacer (商标)试剂盒中的嵌套式PCR的5'引物和3'引物各1.0 μL, 1.0 μL dNTP混合物溶液 (各10 mM), 包含在Advantage cDNA聚合酶混合物(由CLONTECH生产)中的5.0 μl 10 ×cDNA PCR反应缓冲液, 1.0 μL Advantage cDNA聚合酶混合物, 和按上文所述合成并且调节在10 μM的第一轮PCR的基因特异性引物各1.0 μL。然后用无菌蒸馏水将得到的溶液的体积调节到50.0 μL。用上述Touchdown PCR法进行基因扩增。采用1.0%琼脂糖凝胶, 通过电泳证实由此获得的扩增的5'和3'末端的片段。切下这些片段, 然后收集(SUPREC-01, 由TaKaRa生产)。用T4 DNA连接酶将片段连接到pGEM-T Easy载体(由Promega生产)的克隆位点, 从而转化宿主大肠杆菌TOP10 (由Invitrogen生产)。具体地, 混合大肠杆菌感受态细胞和质粒, 然后在冰上对混合物进行温度处理大约30分钟, 42℃下30秒, 然后在冰上2分钟。然后将所得物悬浮于SOC培养基(2% Trypton, 0.5% 酵母提取物, 0.05% NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 和20 mM 葡萄糖), 然后37℃下温育1小时。随后, 在补加了50 μg/ml 氨苄青霉素的LB琼脂培养基(1%酵母提取物, 0.5% trypton 和1% NaCl)上37℃下将转化的大肠杆菌培养过夜, 从而获得大肠杆菌菌落。选择认为含有插入的片段的白色克隆。在补加了50 μg/ml 氨苄青霉素的LB培养基上培养克隆过夜。用GFX (Trademark) Micro Plasmid Prep 试剂盒 (由Amersham Bioscience生产)纯化质粒DNA。用染料引物循环测序试剂盒(由Amersham生产)进行测序反应, 然后用荧光DNA测序仪(由Shimadzu Corporation生产)进行核苷酸序列分析。此外, 当发现3个克隆的核苷酸序列在其分析时完全匹配时, 进行最终的确定。结果, 可以确定Zen1的5'末端和3'末端的核苷酸序列(图8-1-图8-4, 和SEQ ID NOS: 34和35)。

表 5

引物名称	序列	使用目的
Zen1 RS-1	5' - AAT TAC AAA CAT GAG TTA GAA - 3'	3' RACE 1 st PCR
Zen1 RS-2	5' - GAA TTG TTG ACA ATG TTC AAA - 3'	3' RACE 嵌套式 PCR
Zen1 RR-1	5' - GAT TTC ATC TTT CAA ATC TGA - 3'	5' RACE 1 st PCR
Zen1 RR-2	5' - CTT TTC CAA TAC ATC CTG GGC - 3'	5' RACE 嵌套式 PCR

(从上到下, SEQ ID NOS:36、37、38 和 39)

用于 RACE 法的引物及其序列

[实施例 14] 纯化重组 Zen1

通过 PCR 扩增实施例 13 获得的、添加了限制酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点的 Zen1 cDNA。用 T4-DNA 连接酶将扩增产物连接到大肠杆菌表达质粒载体 pGEX4T-1 (由 Amersham Biosciences 生产)的 *Eco*R I 和 *Xho* I 位点。用由此获得的重组质粒转化大肠杆菌 TOP10 菌株(由 Invitrogen 生产)。在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中将转化的菌株 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。随后,在新的 LB 培养基上传代培养少量菌株,直到 600nm 处的 OD 值达到 1.0。添加 IPTG (异丙基-1-硫- β -D-半乳糖苷),达到 1mM 的终浓度。3 小时后,收获细胞,然后用 PBS (pH 7.4)清洗一次。通过在 PBS (pH 7.4)中超声处理而裂解再次收获的细胞,通过离心除去不溶的级份,然后收集含有与谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合的 Zen1 的可溶级份。随后,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱 (由 Amersham Biosciences 生产)从可溶级份获得与 GST 融合的 Zen1。将含量为融合蛋白的 1/100 的凝血酶 (由 Amersham Biosciences 生产)加入含有纯化的融合产物 (即,融合于 GST 的 Zen1) 的溶液,然后在 22 $^{\circ}$ C 下反应 20 小时。由此, GST 从 Zen1 分离。随后,用 Benzamidin 琼脂糖凝胶(由 Amersham Biosciences 生产)除去凝血酶,然后纯化重组的 Zen1。由此获得的纯化的 Zen1 表现出相应于分子量为大约 60kDa 的单个条带,这是通过 SDS-PAGE 证实的 (图 9)。

[实施例 15] 制备抗 Zen1 多克隆抗体和分析抗体与螨蛋白的反应性

以1周的间隔用实施例14纯化的重组Zen1免疫6只小鼠(BALB/c, 雌性, 4周龄)5次。随后,从小鼠采集血液,分离血清,然后通过ELISA分析IgG抗体的反应。按如下进行ELISA。将1.0 μg重组Zen1和4.0 μg从粉尘螨提取的抗原(由GREER生产)分别固定在免疫板(由Nalge Nunc International生产)上,然后在37℃下用封闭溶液(通过将Tween20加入补加了10% FBS的PBS中达到0.05%的终浓度而制备)封闭1小时。用封闭溶液将每个小鼠血清样品稀释1000倍,然后在室温下反应1小时。清洗每个免疫板后,使其与用封闭溶液稀释2000倍的HRP标记的山羊抗小鼠IgG单克隆抗体(由ZYMED生产)反应。清洗每个免疫板后,将100 μL酶底物溶液(ABTS溶液)加入每个孔,然后在37℃下反应10分钟。通过向每个孔中加入100 μL 0.32%的氟化钠溶液而终止酶反应。用免疫读数器(BioRad)测量414nm处每个孔的吸光度。用ELISA证实IgG与相关受试物的反应后,确定受试物是抗Zen1的多克隆抗体。

通过Western印迹分析小鼠IgG与多克隆抗体(重组Zen1)的反应性和关于螨体的该反应性。将β-巯基乙醇加入100.0 μL调节到50 μg/mL的重组Zen1蛋白溶液和100.0 μL从粉尘螨提取的抗原的溶液,达到50.0 μg/mL的终浓度,由此制备200 μL Laemmli样品缓冲液(由BIO-RAD生产)。100℃下热处理5分钟,然后将所得物加样到凝胶浓度为5% - 20%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGEL; 由ATTO生产)上。由此进行电泳。完成电泳后,将所得物转移到PVDF膜(Hybond-P; 由Amersham Biosciences生产)。使膜在封闭溶液(补加了5%脱脂奶的PBST(通过将Tween20添加到PBS中达到0.1%的终浓度而制备))中4℃下静置过夜。在PBST中将膜清洗10分钟。用PBST将HRP标记的山羊抗小鼠IgG单克隆抗体(由ZYMED生产)稀释2000倍,然后将稀释的溶液加入膜,随后在室温下反应2小时。用PBST清洗5次(每次10分钟)后,将ECL Plus Western印迹检测系统(由Amersham Biosciences生产)的反应溶液加入到膜上,然后在室温下反应5分钟。用X射线膜(Hyperfilm ECL; 由Amersham Biosciences生产)检测信号。结果,检测到了表示与分子量为大约60kDa的重组Zen1反应的信号和表示与分子量为150 kDa - 250 kDa的天然型Zen1反应的信号(图10)。因此,证实了实施例13分离的全长Zen1 cDNA编码分子量为

150 kDa - 250 kDa 的螨体的所述变应原蛋白。

[实施例 16] 分析重组 Zen1 的 IgE 反应性

通过 ELISA 评估实施例 14 中纯化的重组 Zen1 的变应原性。将 1.0 μg 重组 Zen1 固定在免疫板（由 Nalge Nunc International K.K. 生产）上，然后在 37°C 下用封闭溶液（通过将 Tween20 加入补加了 10% FBS 的 PBS 中达到 0.05% 的终浓度而制备）封闭 1 小时。使检测的粉尘螨阳性的 9 只狗的血清（通过用生理盐水稀释 50 倍的粉尘螨抗原溶液（由 GREER 生产）进行皮内反应证实为粉尘螨阳性的狗血清）与阴性对照狗血清反应。加入生物素标记的 GST-Fc ϵ RI α ，然后，通过添加过氧化物酶偶联的链亲和素（由 Jackson Immuno Research 生产）和酶底物溶液（ABTS 溶液）导致显色反应。通过向每个孔中加入 100 μL 0.32% 的氟化钠溶液而终止酶反应。用免疫读数器 (BioRad) 测量 414nm 处每个孔的吸光度。具体地，用重组的狗 Fc ϵ RI α ，通过 ELISA 系统分析血清 IgE（9 只通过该程序的皮内反应证实的测试为螨阳性的狗的血清，或阴性狗（对照）的血清）与重组 Zen1 的反应。结果，证实了高于阴性狗的值（用虚线表示）的值。因此，证实了重组 Zen1 是与 IgE 反应的变应原蛋白（图 11）。

工业实用性

本发明使得能够提供作为螨变态反应性疾病的治疗剂或预防剂的安全和有效的重组螨变应原，其不含诱导过敏的杂质。

在此全文引入在此引用的所有公开文献作为参考。本领域技术人员容易理解，本发明的多种修饰和改变在所附权利要求公开的技术思想和发明范围内是可实现的。本发明意欲包括所述修饰和改变。

<110> NIPPON ZENYAKU KOGYO LTD.

<120> 新的螨变应原

<130> PH-2409-PCT

<150> JP2004-116089

<151> 2004-04-09

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1022

<212> DNA

<213> 粉尘螨

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1020)

<400> 1

gac gat gta tta aag cag act gag gag cct att aaa agt gcc cag gat 48
Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp
1 5 10 15

gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa 96
Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu
20 25 30

aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa 144
Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys
35 40 45

aat cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc 192
Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe
50 55 60

aaa aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc 240
Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser
65 70 75 80

ttg aca acc aca aca aag gaa cag aca acc cca act cct gaa cca aca 288
Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
85 90 95

aca aca act cct gaa cgg act acc aaa acc ccc gaa cgg act acc aaa 336
 Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
 100 105 110

aca cgg gaa cca aca aca cca act cct gaa cgg act acc aaa acc ccc 384
 Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 115 120 125

gaa cgg act acc aaa aca cgg gaa cca aca aca cca act cca gaa cgg 432
 Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro
 130 135 140

act acc aaa aca cgg gaa cca aca aca cca act cct gaa cgg act acc 480
 Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
 145 150 155 160

aaa acc ccc gaa cgg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act 528
 Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
 165 170 175

cgg gac cgc tac caa aac ccc cga cgg cta cca aaa cac cgg acc atc 576
 Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile
 180 185 190

cac ccc aac tcc gga cgg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca 624
 His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro
 195 200 205

act cgg gaa cgg act acc aaa acc ccc gaa cgg act acc aaa aca cgg 672
 Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 210 215 220

gaa cca tca acc cca act cgg gaa cgg act acc aaa aca cgg gaa cca 720
 Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro
 225 230 235 240

tca acc cca act cgg gaa cgg act acc aaa aca cgg gaa cca tca acg 768
 Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr
 245 250 255

act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa get gaa gag ott 816
 Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu
 260 265 270

att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg 864
 Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu
 275 280 285

aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat 912
 Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His
 290 295 300

gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg 960
 Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser
 305 310 315 320

gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc 1008
 Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala
 325 330 335

aac gaa etc ctg aa 1022
 Asn Glu Leu Leu
 340

<210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 粉尘螨

<400> 2
 Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu
 20 25 30
 Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys
 35 40 45
 Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe
 50 55 60
 Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
 85 90 95
 Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
 100 105 110
 Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 115 120 125

Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro
 130 135 140

Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
 145 150 155 160

Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
 165 170 175

Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile
 180 185 190

His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro
 195 200 205

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 210 215 220

Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro
 225 230 235 240

Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr
 245 250 255

Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu
 260 265 270

Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu
 275 280 285

Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His
 290 295 300

Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser
 305 310 315 320

Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala
 325 330 335

Asn Glu Leu Leu
 340

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成肽

<400> 3

Met Lys Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成肽

<400> 4

Ser Ala Gln Asp Val Leu Glu Lys
1 5

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成肽

<400> 5

Phe Met Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp Glu Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成肽

<400> 6

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 7

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asn Glu Leu Ala Glu Lys

1

5

10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 8

Met Tyr Asn Phe His Leu Glu Ala Tyr

1

5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 9

Ile Ala His Phe Leu Glu Leu Glu

1

5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 10

Ile Ala His Phe Glu Leu Glu
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 11
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 12
Ile Ala His Leu Glu Ser Glu Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 13
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 14

Asp Ala Gln Leu Glu Xaa Glu

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 15

Ser Ala Gln Asp Val Ser Leu

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 16

Arg Asn Glu Met Asn Glu

1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 17

Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Lys Ala Asp Phe Asp

1 5 10

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 18

Asp Leu Ala Arg Asp Val Xaa Leu

1

5

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 19

Asp Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu

1

5

10

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 9 和 21

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 20

gaygaygtnt traarcaraac ngargar

27

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 9, 12 和 21

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 21

gaygaygtnc tnaarcac ngargar

27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 16

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 22

rttraaraar tcytngert cyttraa

27

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 4 和 16

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 23

rttnagraar tcytngert cytt

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 7 和 16

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 24

rttraanagr tcyttngert cytt

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 4, 7 和 16

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 25

rttnagnagr tcyttngert cytt

24

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 10 和 19

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 26

rttrtcr Aan acytcrtgng c

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 7, 10 和 19

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 27

rttrtcnagn acytertgng c

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 7

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 28

rttrtengcr aartcyttrt t

21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 7 和 10

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 29

rttrtengen agrtctttrt t 21

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明:引物

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> 4
 <223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 30
 rttngeraar tcyterttra aytc 24

<210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明:引物

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> 4 和 7
 <223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 31
 rttngcnagr tcyterttra aytc 24

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明:引物

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> 4 和 19

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 32

rttngcraar tcyterttna gytc

24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> 4, 7 和 19

<223> n 代表 a, c, g 或 t

<400> 33

rttngcnagr tcyterttna gytc

24

<210> 34

<211> 1518

<212> DNA

<213> 粉尘螨

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1515)

<400> 34

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gea 48

Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala

1 5 10 15

ggt att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat 96

Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp

20 25 30

gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta 144

Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val

35 40 45

ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa 192

Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys

50 55 60

cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca	816
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser	
260 265 270	
acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg act	864
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr	
275 280 285	
aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att	912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile	
290 295 300	
aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa	960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys	
305 310 315 320	
aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag	1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu	
325 330 335	
tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa	1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu	
340 345 350	
ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat	1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp	
355 360 365	
gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat	1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn	
370 375 380	
agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg	1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro	
385 390 395 400	
aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc	1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr	
405 410 415	
act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca	1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr	
420 425 430	
ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg	1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro	
435 440 445	

gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat 1392
 Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn
 450 455 460

agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa 1440
 Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu
 465 470 475 480

ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata 1488
 Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile
 485 490 495

ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga 1518
 Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile
 500 505

<210> 35

<211> 505

<212> PRT

<213> 粉尘螨

<400> 35

Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala
 1 5 10 15

Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp
 20 25 30

Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val
 35 40 45

Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys
 50 55 60

Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn
 65 70 75 80

Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys
 85 90 95

Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu
 100 105 110

Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
 115 120 125

Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr
 130 135 140

Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
 165 170 175

Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
 180 185 190

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro
 195 200 205

Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His
 210 215 220

Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
 245 250 255

Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser
 260 265 270

Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr
 275 280 285

Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile
 290 295 300

Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys
 305 310 315 320

Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu
 325 330 335

Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu
 340 345 350

Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp
 355 360 365

Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn
 370 375 380

Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro
385 390 395 400

Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr
405 410 415

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr
420 425 430

Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro
435 440 445

Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn
450 455 460

Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu
465 470 475 480

Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile
485 490 495

Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile
500 505

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 36

aattacaaac atgagttaga a

21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 37

gaattgttga caatgttcaa a

21

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

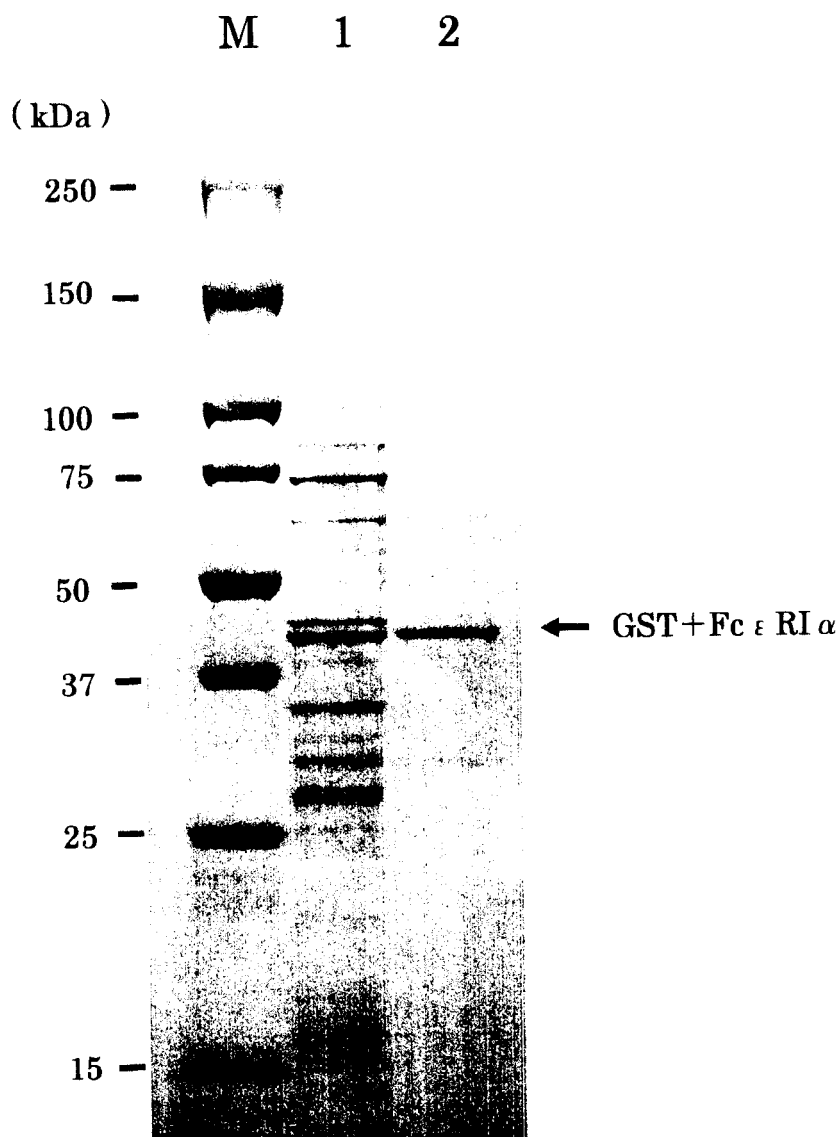
<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 38
gatttcatct ttcaaactg a 21

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 39
cttttccaat acatcctggg c 21



M: 分子标记 (由BIO-RAD生产)
1: 用IPTG诱导后的大肠杆菌BL21的可溶级分
2: 与GST蛋白融合的纯化的狗 Fc ϵ RI α 链

图 1

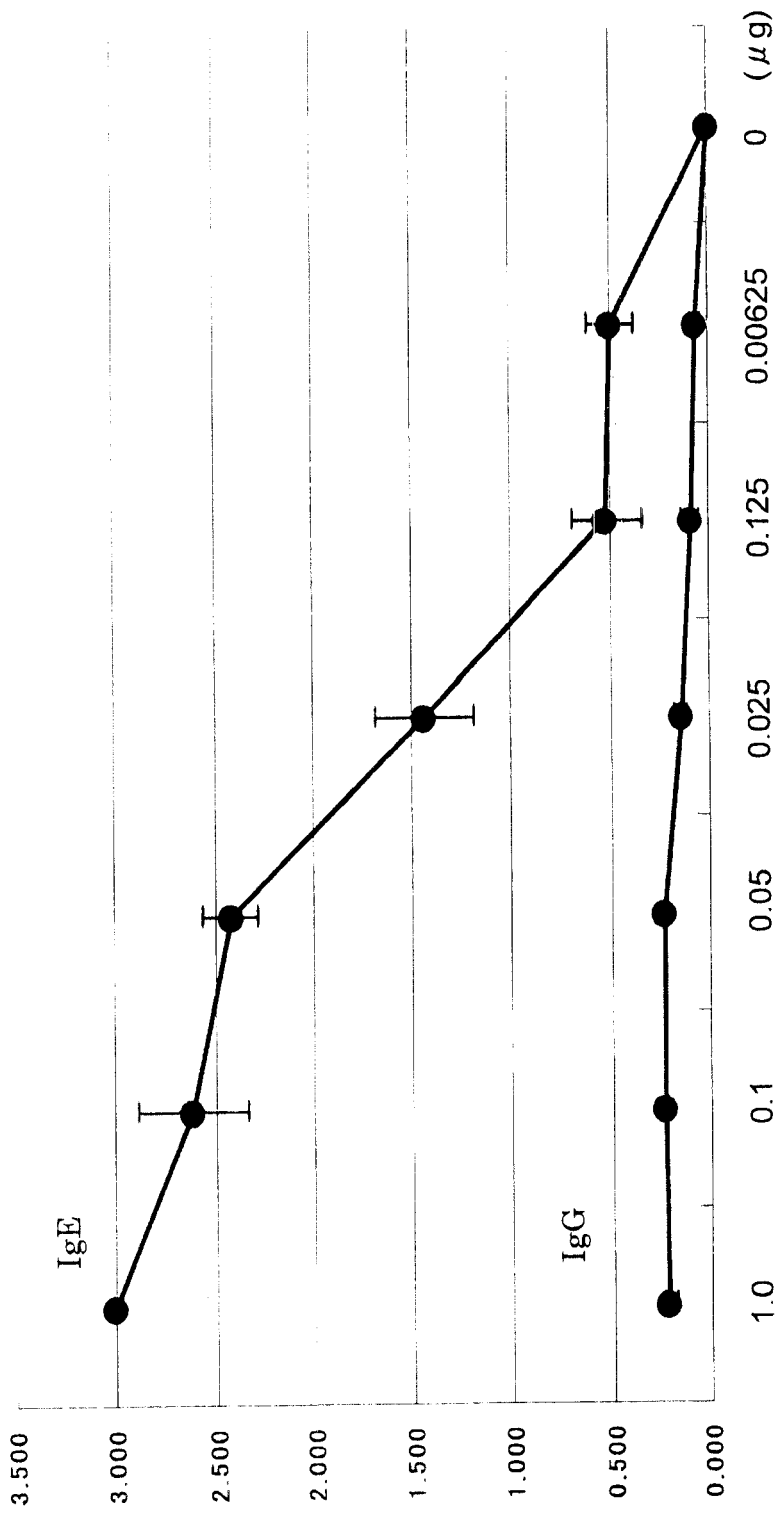


图 2

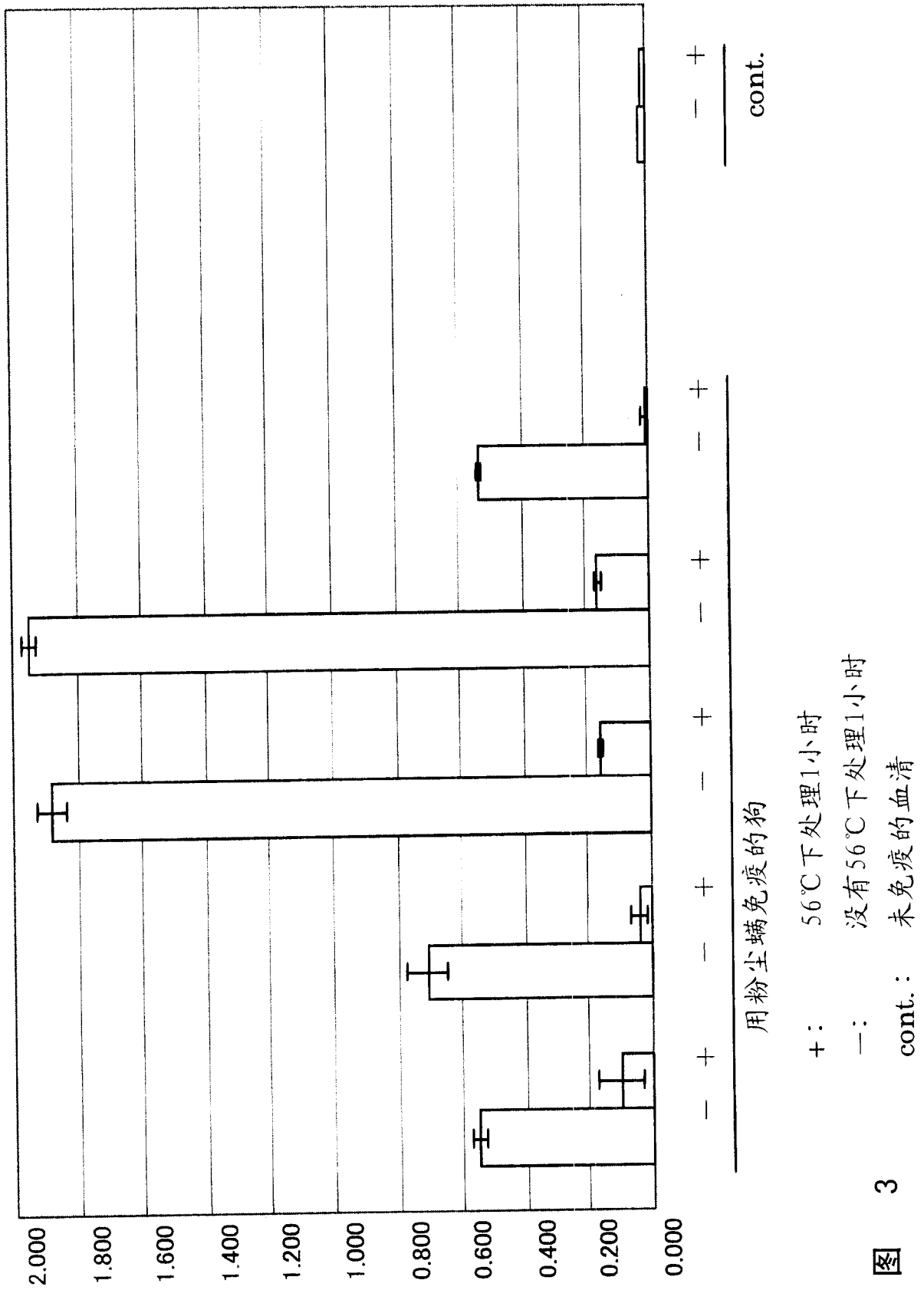


图 3

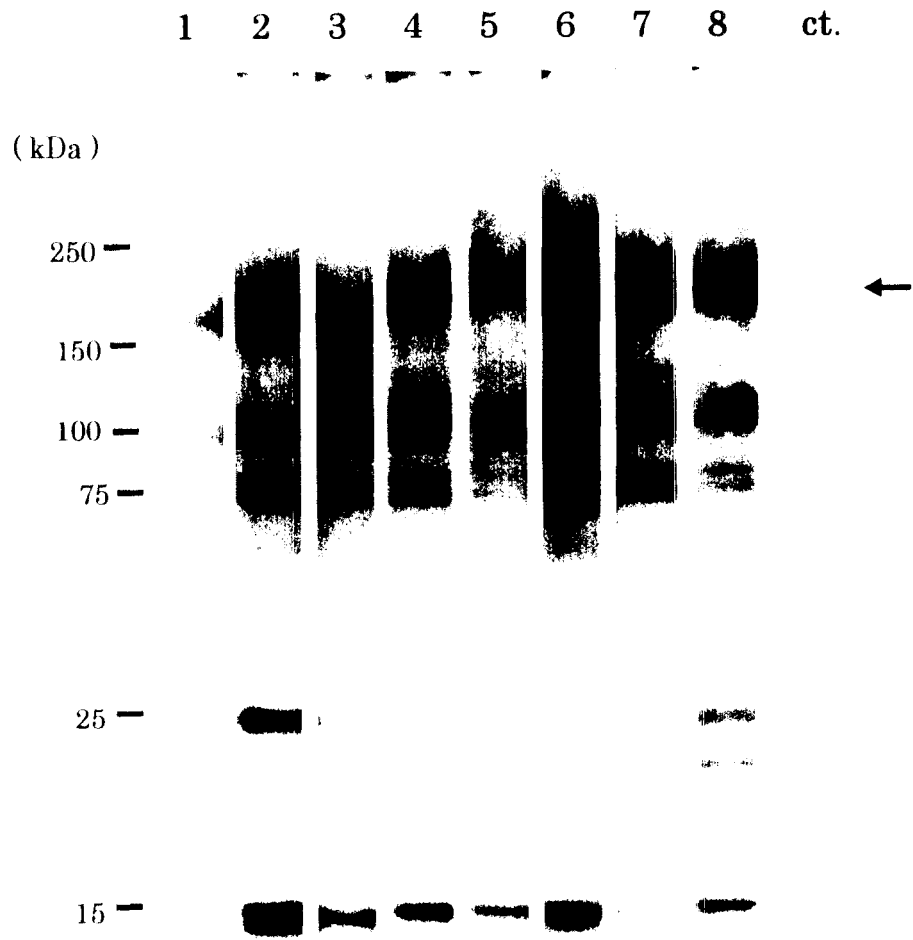


图 4

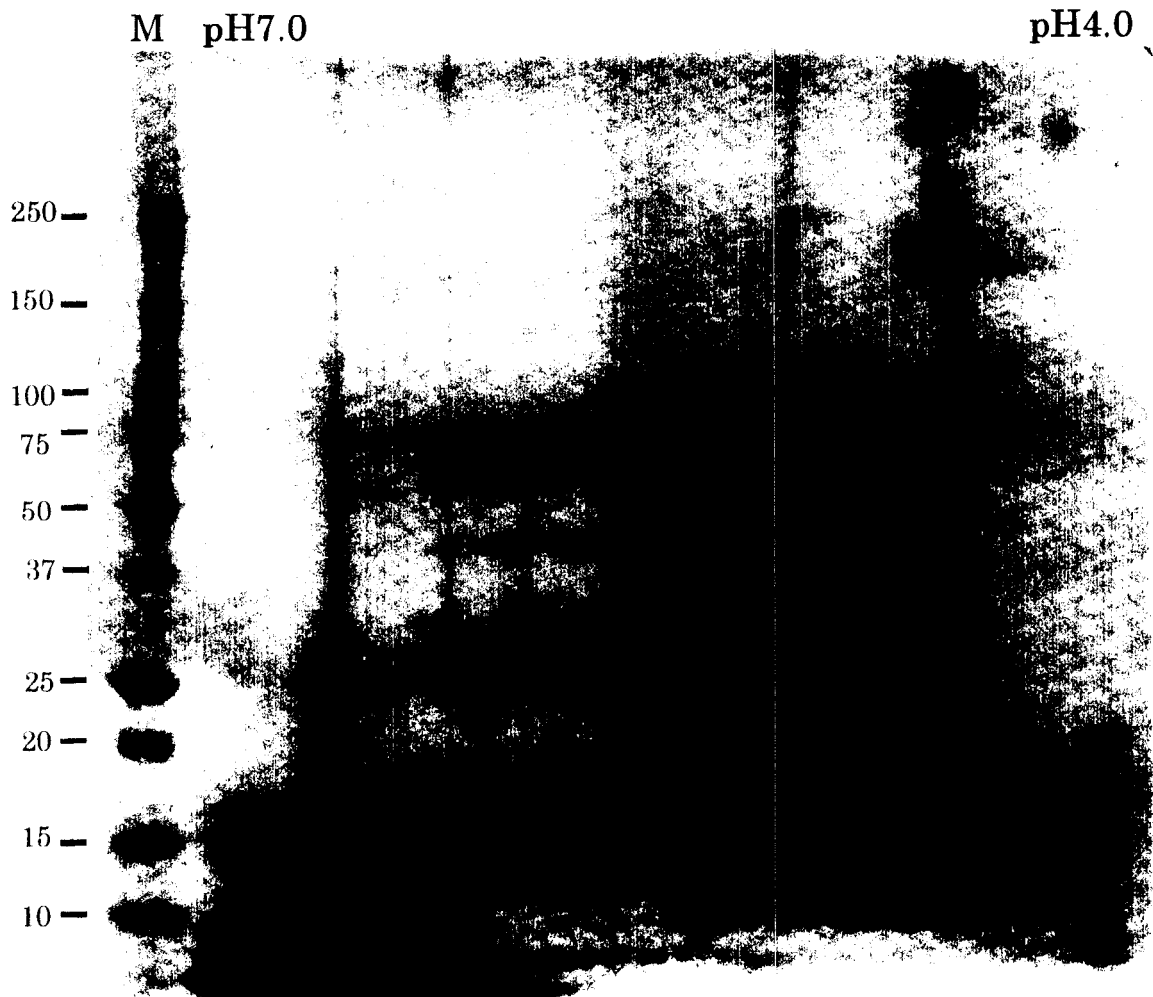


图 5

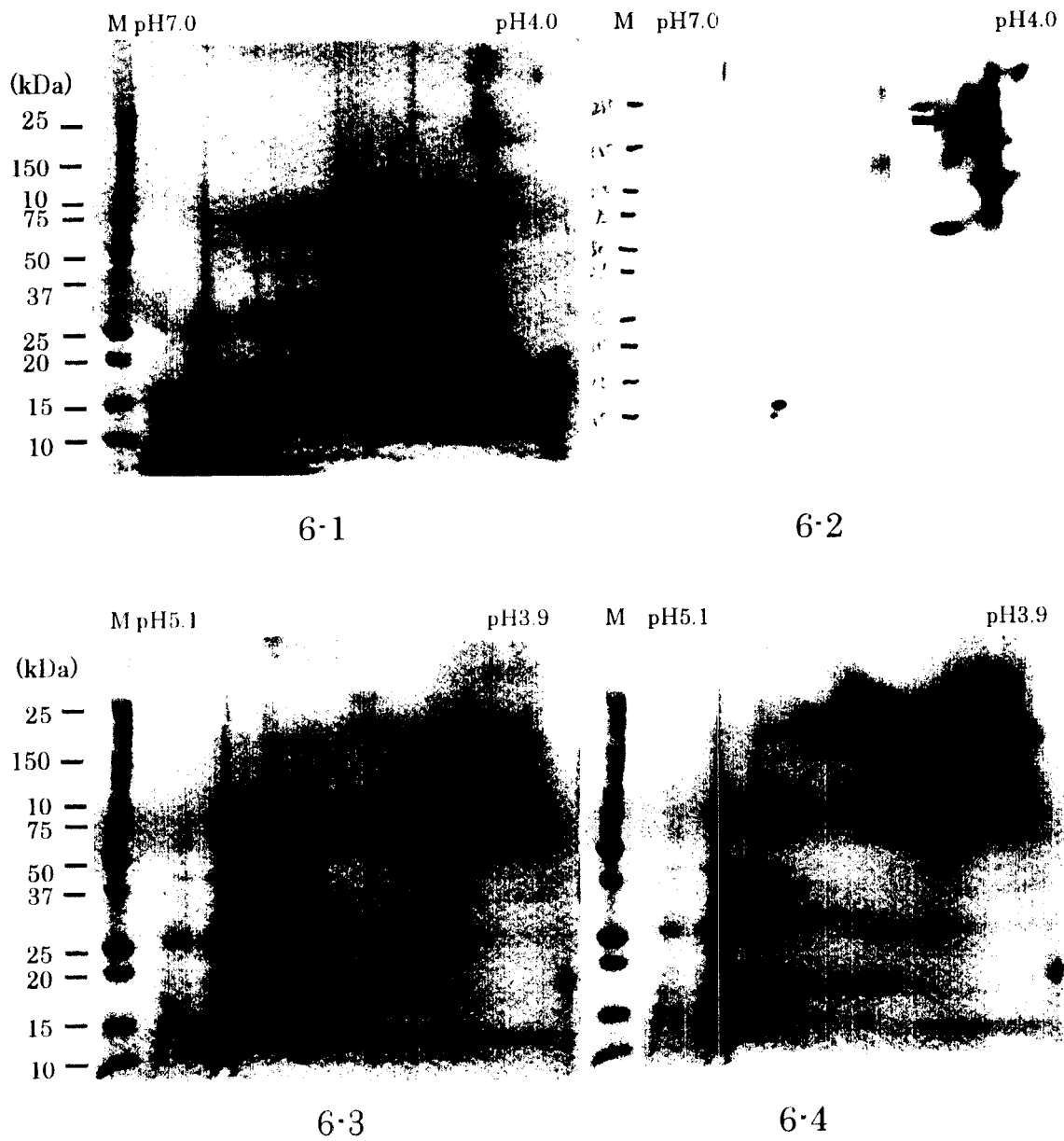


图 6

ccg gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile 180 185 190	576
cac ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro 195 200 205	624
act ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro 210 215 220	672
gaa cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro 225 230 235 240	720
tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr 245 250 255	768
act aag aaa cct aat ccg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu 260 265 270	816
att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu 275 280 285	864
aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His 290 295 300	912
gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser 305 310 315 320	960
gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala 325 330 335	1008
aac gaa ctc ctg aa Asn Glu Leu Leu 340	1022

图 7-2

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca	48
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala	
1 5 10 15	
ggc att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat	96
Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp	
20 25 30	
gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta	144
Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val	
35 40 45	
ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa	192
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys	
50 55 60	
ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat	240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn	
65 70 75 80	
cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa	288
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys	
85 90 95	
aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc ttg	336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu	
100 105 110	
aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca aca	384
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr	
115 120 125	
aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca	432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr	
130 135 140	

图 8-1

aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att	912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile	
290 295 300	
aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa	960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys	
305 310 315 320	
aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag	1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu	
325 330 335	
tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa	1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu	
340 345 350	
ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat	1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp	
355 360 365	
gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat	1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn	
370 375 380	
agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg	1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro	
385 390 395 400	
aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc	1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr	
405 410 415	
act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca	1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr	
420 425 430	

图 8-3

ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg	1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro	
435 440 445	
gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat	1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn	
450 455 460	
agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa	1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu	
465 470 475 480	
ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata	1488
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile	
485 490 495	
ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga	1518
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile Stop	
500 505	

图 8-4

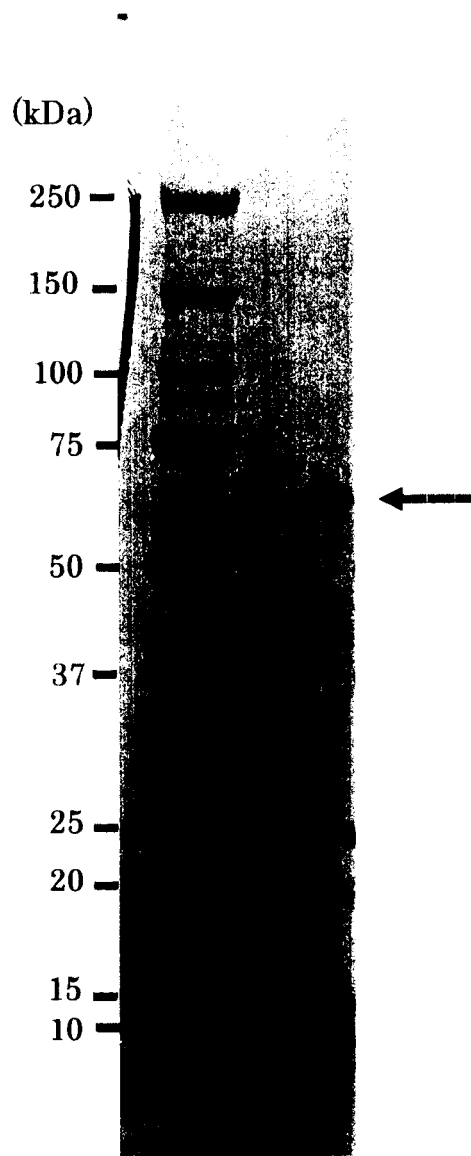


图 9

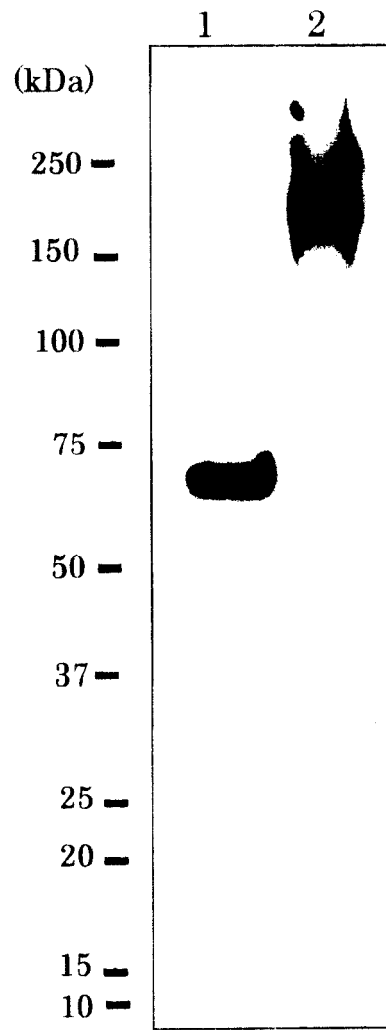


图 10

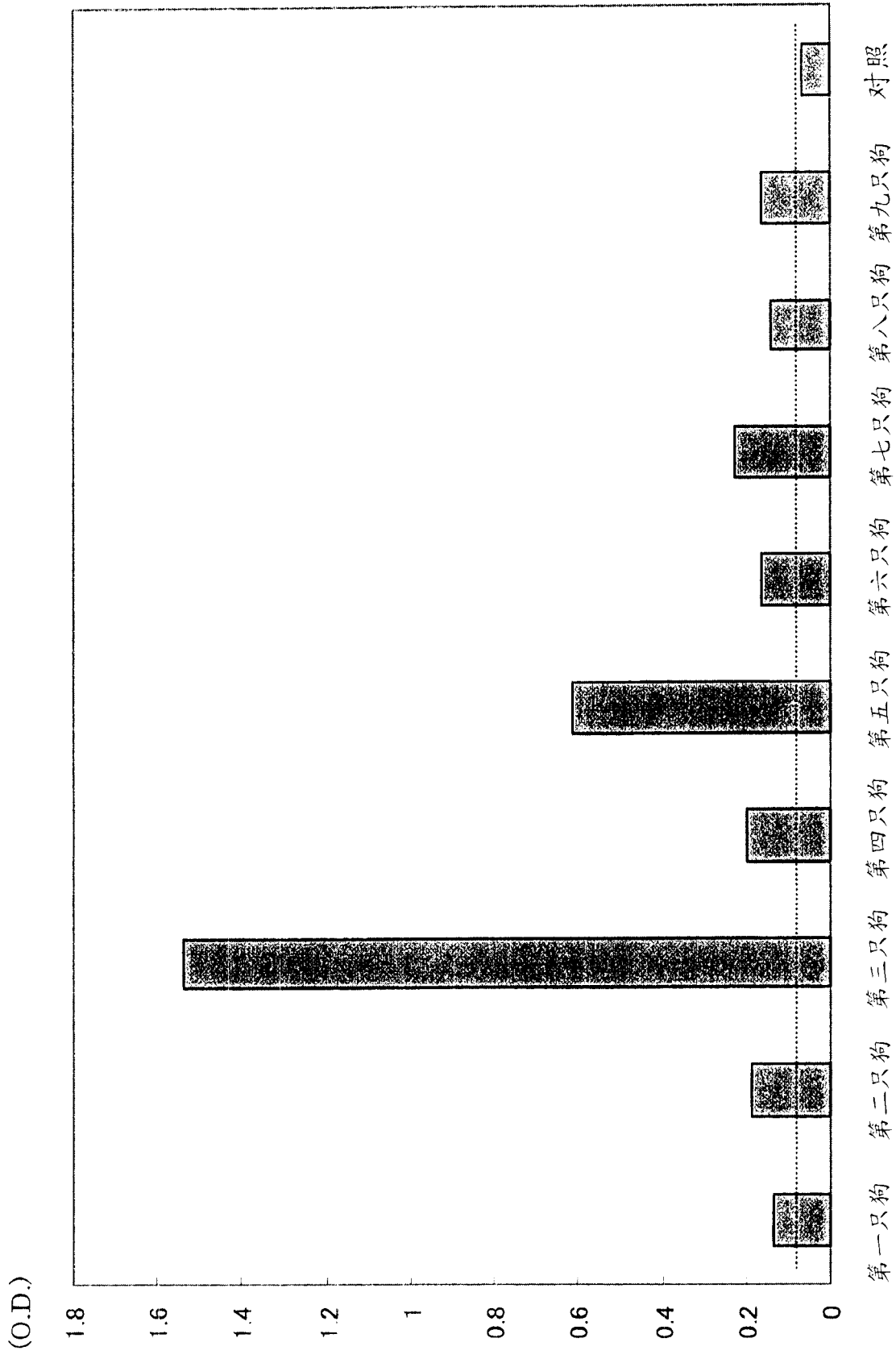


图 11

专利名称(译)	新的螨变应原		
公开(公告)号	CN1997741A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580018846.7	申请日	2005-04-07
[标]发明人	津久井利广 辻本元 岩渊成紘		
发明人	津久井利广 辻本元 岩渊成紘		
IPC分类号	C12N15/12 A61K39/35 A61K49/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/04 A61P27/14 A61P37/08 C07K14/435 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 C12P21/08 A61K39/00 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6854 A61K39/35 C07K14/43531 G01N33/56905 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/04 A61P27/14		
代理人(译)	李波 梁谋		
优先权	2004116089 2004-04-09 JP		
其他公开文献	CN1997741B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

安全和有效的不含诱导过敏的杂质的变应原，其作为螨变态反应性疾病的治疗剂或诊断剂。提供了以下重组蛋白：(a)由SEQ ID NO：2或35所示氨基酸序列组成的蛋白；或(b)包含通过对SEQ ID NO：2或35所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列的蛋白，其具有螨变应原活性。

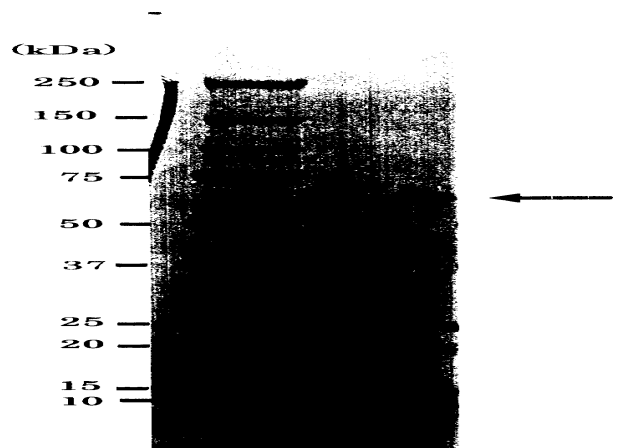


图 9