

[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 200780047710.8

[51] Int. Cl.

A61K 39/35 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101588815A

[22] 申请日 2007.12.21

[21] 申请号 200780047710.8

[30] 优先权

[32] 2006.12.22 [33] SE [31] 0602804-7

[32] 2006.12.22 [33] US [31] 60/876,958

[86] 国际申请 PCT/SE2007/051080 2007.12.21

[87] 国际公布 WO2008/079095 英 2008.7.3

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.22

[71] 申请人 法蒂亚公司

地址 瑞典乌普萨拉

[72] 发明人 L·马特松 H·埃韦堡

J·利德霍尔姆

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 康健 林晓红

权利要求书3页 说明书21页 序列表2页
附图14页

[54] 发明名称

新前列腺激肽释放酶过敏原

[57] 摘要

前列腺激肽释放酶在制备用于诊断/治疗I型过敏反应具体是对犬的过敏反应的诊断组合物或药物组合物中的用途。

1. 激肽释放酶或其具有与野生型激肽释放酶相同的抗体结合表位的变体或片段在制备用于体外诊断 I 型过敏反应的诊断组合物中的用途。

2. 权利要求 1 的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶源自灵长类, 包括人、犬、猫、马、牛、猪、大鼠或小鼠。

3. 权利要求 1 或 2 的激肽释放酶, 特征在于所述激肽释放酶纯化自哺乳动物来源或是重组产生的。

4. 权利要求 1-3 之一的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶是前列腺激肽释放酶。

5. 权利要求 1-4 之一的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。

6. 制备过敏原组合物的方法, 包括将激肽释放酶或其具有与野生型激肽释放酶相同的抗体结合表位的变体或片段加入包含过敏原提取物和/或至少一种纯化的过敏原组分的组合物中。

7. 权利要求 6 的方法, 特征在于所述激肽释放酶源自灵长类, 包括人, 犬, 猫, 马, 牛, 猪, 大鼠或小鼠。

8. 权利要求 6 或 7 的方法, 特征在于所述激肽释放酶纯化自哺乳动物来源或是重组产生的。

9. 权利要求 6-8 之一的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶是前列腺激肽释放酶。

10. 权利要求 6-9 之一的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。

11. 过敏原组合物, 其可通过权利要求 6-10 之一的方法获得。

12. 体外诊断 I 型过敏反应的方法, 包括如下步骤:

-将来自可疑患有 I 型过敏反应的患者的含有免疫球蛋白的体液样品与激肽释放酶或其具有相似 IgE-结合特性的变体或片段接触, 或与权利要求 11 的过敏原组合物接触; 和

-检测所述样品中与所述激肽释放酶特异性结合的 IgE 抗体的存在,

其中所述特异性结合激肽释放酶的 IgE 抗体的存在指示 I 型过敏反应。

13. 权利要求 12 的方法, 特征在于所述激肽释放酶源自灵长类, 包括人, 犬, 猫, 马, 牛, 猪, 大鼠或小鼠。

14. 权利要求 12 或 13 的方法, 特征在于所述激肽释放酶纯化自哺乳动物来源或是重组产生的。

15. 权利要求 12-14 之一的方法, 特征在于所述激肽释放酶是前列腺激肽释放酶。

16. 权利要求 12-15 之一的激肽释放酶, 特征在于所述的激肽释放酶具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。

17. 进行权利要求 12-16 之一的方法的诊断试剂盒, 包含权利要求 1-6 之一的激肽释放酶或权利要求 11 的组合物。

18. 治疗哺乳动物 I 型过敏反应的方法, 包括给予对所述治疗易感的个体来自所述哺乳动物的激肽释放酶或者所述激肽释放酶的经修饰消除或减弱其 IgE 结合反应的形式。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述哺乳动物选自灵长类组成的组, 包括人, 犬, 猫, 马, 牛, 猪, 大鼠或小鼠。

20. 权利要求 18 或 19 的方法, 其中所述修饰的激肽释放酶是 10 kDa 亚基或 18 kDa 亚基。

21. 权利要求 18-20 之一的方法, 其中所述低过敏性激肽释放酶衍生物是通过分子的片段化、截短或串联, 内部片段的缺失, 结构域重排, 氨基酸残基取代, 二硫桥破坏进行修饰的激肽释放酶。

22. 药物组合物, 包含激肽释放酶或所述激肽释放酶的经修饰消除或减弱其 IgE 结合反应的形式, 以及任选的药物可接受的载体、赋形剂, 缓冲液或稀释剂。

23. 权利要求 22 的药物组合物, 其中所述低过敏性激肽释放酶片段是 10 kDa 亚基。

24. 权利要求 22 或 23 的药物组合物, 其中所述低过敏原性激肽释放酶衍生物是通过分子的片段化、截短或串联, 内部片段的缺失, 结构域重排, 氨基酸残基取代, 二硫桥破坏进行修饰的激肽释放酶。

25. 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的激肽释放酶在诊断中的用途, 诸如诊断犬的 I 型过敏反应。

26. 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的激肽释放酶在治疗中的用途, 诸如治疗犬的 I 型过敏反应。

27. 从哺乳动物尿液分离激肽释放酶的方法, 包含以下步骤:

-过滤哺乳动物尿液;

-与适合疏水相互作用层析的缓冲液进行缓冲液交换;

-过滤缓冲液交换后的尿液样品;

-将缓冲液交换后的尿液样品施加于疏水相互作用层析柱上; 和

-收集包含激肽释放酶的流出级分。

28. 权利要求 26 的方法, 其中所述哺乳动物尿液是犬尿。

新前列腺激肽释放酶过敏原

技术领域

本发明涉及过敏反应领域。更具体，本发明涉及新的哺乳动物过敏原的鉴定以及诊断和治疗对哺乳动物的过敏反应。

背景技术

犬的毛皮垢屑是导致室内过敏反应的常见原因，症状包括鼻炎，结膜炎，支气管感染和哮喘。犬过敏原不仅可在饲养宠物犬的室内检测到也可在犬不经常存在的其他地方诸如学校和日托中心检测到(1)。

对犬的过敏反应伴随有并依赖于从犬毛和毛皮垢屑释放的蛋白的致敏作用。在可疑对犬过敏的病例中，临床研究包括利用犬毛和/或毛皮垢屑提取物通过皮肤针刺试验或特异性 IgE 抗体测定进行评估。特异性 IgE 的实验室免疫分析，诸如 Phadia ImmunoCAP，可利用天然犬毛皮垢屑提取物检测出大多数对犬的过敏反应，这是由于实验条件有利并且存在大的允许过敏原附着的固相。

犬毛和毛皮垢屑提取物包含过敏原性和非过敏原性蛋白的复合物(2, 3)。目前鉴定并详细研究了三种犬过敏原：Can f 1, Can f 2 和 Can f 3。Can f 1, 其为脂质运载蛋白家族成员，报道的分子量 21-25 kD, 由 de Groot et al. (4)首次纯化，随后克隆并表达为重组蛋白(5)。Can f 2 属于相同的蛋白家族但与 Can f 1 不同(4, 5)。Can f 3, 犬血清白蛋白，是相对保守的蛋白，对其他哺乳动物白蛋白显示广泛的交叉反应性(6)。

在已知的犬过敏原中，Can f 1 是最为重要的，结合来自大约半数发生犬过敏反应的对象 IgE 抗体(7)。大约 20%发生过敏反应的犬显示与 Can f 2 结合的 IgE，但大多数也对 Can f 1 过敏。尽管 30-40%成年犬过敏反应个体也显示结合 Can f 3 的 IgE(2, 8)，哺乳动物血清白蛋白的特定临床相关性不确定。

很长时间以来，已知与啮齿类诸如小鼠和大鼠过敏反应有关的主要过敏原存在动物尿液中并且它们已经被分离且定性(9-13)。IgE 抗体结合活性

据报道存在其他动物包括猫和犬的尿液中(14), 但没有从这些动物的尿液中纯化出过敏原并在分子水平定性。

发明内容

如上所述, 利用犬毛皮垢屑提取物, 特异性 IgE 的实验室免疫测定可检测大多数对犬的过敏反应, 这是由于实验条件有利并且存在大的允许过敏原附着的固相。但是, 在微型或非实验室免疫测定诸如过敏原微阵列或医生办公室测定中, 检测环境不佳, 抗体结合过敏原试剂结合能力较低, 天然过敏原提取物效力有限, 导致诊断敏感性不足。其他动物表皮的特异性 IgE 的免疫测定也存在类似的情况。因此, 需要在一些情况下使用纯过敏性蛋白来实现足够的特异性 IgE 诊断试验的敏感性。

此外, 对犬过敏个体有很大一部分不对已知的犬过敏原产生任何反应, 并且最近在芬兰人群中得以证实(7)。

上述内容导致本发明人寻找另外的未知犬过敏原。所述新过敏原可用作试剂增加常规诊断试验的敏感性, 也可作为已知的犬过敏原的补充用于不同类型的组分分辨诊断应用中(15, 16)。纯过敏原蛋白质, 或其具有改善的非致敏性的片段或变体也可用于组分分辨免疫治疗中(16-20)。

由此从犬尿液纯化新的主过敏原并鉴定为前列腺激肽释放酶。其在所有方面都和已经知道的犬过敏原不同。此外, 类似或相同的免疫等同的过敏原存在犬毛皮垢屑提取物中。激肽释放酶是已知的犬过敏原的重要补充并且可用于诊断犬过敏反应。还认为其他哺乳动物诸如猫, 马和啮齿类的同源蛋白也有相似的过敏原性质和诊断用途。

前列腺激肽释放酶不仅存在尿液中也存在犬类的毛屑中。然而, 在前列腺组织中特异性表达的蛋白仅限于雄性个体的事实提示雌性犬类缺乏这种过敏原。本实验室的初步结果支持该观点并且如果被大量研究结果证实, 则仅仅对前列腺激肽释放酶过敏的犬类过敏反应个体可耐受雌性犬类。

最近公开的报道中, 证实了阴道对精液的超敏反应与对存在精液中的人前列腺特异性抗原 PSA 的 IgE 敏化作用相关(21)。由于犬类和人前列腺

激肽释放酶以及人前列腺-特异性抗原具有部分序列相似性，有可能对犬类前列腺特异性激肽释放酶过敏导致出现所述过敏反应的可能性增加。也可预期对前列腺特异性激肽释放酶的 IgE 介导的免疫反应对于某些的人类不育有一定影响。

本发明的一方面涉及利用激肽释放酶诊断 I 型过敏反应以及利用激肽释放酶制备诊断 I 型过敏反应的组合物。

本发明的另一方面涉及与激肽释放酶“混合(spiked)”的过敏原组合物。所述过敏原组合物可为过敏原提取物或具有低或无激肽释放酶成分的纯化或重组过敏原组分的混合物，其中加入激肽释放酶以结合来自患者的 IgE，所述患者的 IgE 不结合或几乎不结合组合物中的其他过敏原成分。本发明的该方面还涉及制备所述组合物的方法，包括将激肽释放酶加入过敏原组合物诸如过敏原提取物（任选与其他组分混合）或纯化天然或重组过敏原组分的步骤。

本发明另一方面涉及一种体外诊断方法，用于诊断患者中的 I 型过敏反应，其中体液样品诸如患者的血液或血清样品与激肽释放酶或前一方面的组合物接触，并且检测患者样品是否含有特异性结合激肽释放酶的 IgE 抗体。所述诊断方法可以本领域已知的任何方式进行。所述激肽释放酶可例如固定在固体支持物上，诸如在常规实验室免疫测定中，在微阵列中或在支流测定法中。

本发明另一方面涉及用于进行前一方面所述方法的诊断试剂盒，其中包括激肽释放酶。

上述的方面中，野生型激肽释放酶分子也可用激肽释放酶的片段或变体取代，其可为天然或人工制造的，具有与野生型激肽释放酶相同的抗体结合表位(epitopes for antibodies)，如下所述。

本发明还涉及治疗 I 型过敏反应的方法，包括给予需要所述治疗的患者激肽释放酶或修饰的激肽释放酶，如下所述。本发明的该方面还涉及激肽释放酶在所述免疫治疗包括例如组分分辨的免疫治疗中的应用(16)。该方面的一个实施方案中，激肽释放酶可以天然形式或显示与天然分子相似的免疫性质的重组形式使用。另一实施方案中，激肽释放酶可通过化学或

遗传方法修饰，以消除或减弱其 IgE 抗体结合能力，同时优选能激发经过治疗的个体中的 IgG 反应。修饰的实例包括但不限于，分子的片段化、截短或串联，缺失内部片段，取代氨基酸残基，结构域重排或通过破坏二硫桥或其与其他大分子结构的结合来破坏至少部分三维结构，或消除蛋白质结合钙离子或其他低分子量化合物的能力。该方面的其他实施方案中，与完整分子相比显示降低的 IgE 结合活性的单独的激肽释放酶 10 kDa 和/或 18 kDa 亚基用作修饰的激肽释放酶。

上述本发明的所有方面中，激肽释放酶可源自任何产生可在患者中诱导过敏反应的激肽释放酶的哺乳动物。所述的激肽释放酶可纯化自其天然来源，诸如目的哺乳动物的尿液、唾液或其他体液，或纯化自组织，诸如毛发或毛皮垢屑。也可通过重组 DNA 技术或本领域技术人员已知的化学合成方法制备。

本发明还涉及犬类前列腺激肽释放酶在诊断和治疗中的用途，例如诊断和治疗对犬类的 I 型过敏反应。

本发明还涉及从哺乳动物尿液中纯化激肽释放酶的方法，包括以下步骤

- 过滤哺乳动物尿液;
- 用适合疏水相互作用层析的缓冲液进行缓冲液交换;
- 过滤缓冲液交换后的尿液样品;
- 将缓冲液交换后的尿液样品施加于疏水相互作用层析柱上; 和
- 收集包含激肽释放酶的流出级分。

所述哺乳动物尿液可为犬类的尿液。

定义

激肽释放酶是来自常规血液和尿液的丝氨酸内肽酶家族的蛋白水解酶。在 IUBMB 酶命名法系统中，血浆激肽释放酶编号为 EC 3.4.21.34，组织激肽释放酶编号为 EC 3.4.21.35。犬尿激肽释放酶是 28 kDa 异源二聚体蛋白，包含分别大约为 10 ± 2 和 18 ± 2 kDa 的两个亚基，在本发明中分别记为 10 和 18 kDa 亚基。其具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1, GenBank 登记号 P09582, 并且在很多哺乳动物中描述了其同源蛋白，所述哺乳动物包括

马, 牛, 猪, 小鼠, 大鼠和灵长类(例如登记号 AAQ23713-4 (马), NP_001008416 (牛), P00752 (猪), P00755-6 和 P15947 (小鼠), P36373 和 P00758 (大鼠), Q28773 (狒狒), XP_001174026 (黑猩猩), Q07276 (短尾猿), P20151, Q07276 和 AAM11874 (人)。

激肽释放酶的变体和片段可以是这样的蛋白质或肽, 其长度为至少 10 个氨基酸, 优选至少 50 个, 更优选至少 75 或 100 个氨基酸残基, 并且与所述激肽释放酶具有至少 50 %, 优选超过 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 或 95 % 的序列相同性。

修饰的激肽释放酶在本发明中理解为这样的激肽释放酶, 其通过化学或遗传方法进行修饰而改变了免疫学性质, 例如本发明上文中与免疫治疗方面有关的内容所示。

具有与野生型激肽释放酶相同的抗体结合表位的激肽释放酶的变体和片段应理解为这样的片段和变体, 其与来自代表性激肽释放酶敏化患者的血清样品的 IgE 抗体的结合可被激肽释放酶显著抑制。所述抑制试验可例如根据实施例 8 公开的方案进行。

低过敏性修饰的激肽释放酶或激肽释放酶的变体或片段应理解为这样的修饰的激肽释放酶或激肽释放酶的变体或片段, 其不能结合来自代表性激肽释放酶敏化患者的血清样品的激肽释放酶反应性 IgE 抗体, 例如通过实施例 3 所述的方法测定的那样, 或其显示不具有生物过敏原活性或具有明显降低的生物过敏原活性, 如通过细胞活化实验如嗜碱性粒细胞组胺释放实验测定的那样(22, 23)。

附图简述

图 1 显示通过大小排阻层析对犬尿蛋白进行分级分离。包含图中所示三个峰(标记为 1-3)的每一个的级分被汇集用于分析 IgE 结合活性。

图 2 显示通过反相层析从图 1 的峰 2 纯化 IgE 结合蛋白。含有被选用于进一步分析的蛋白的峰通过箭头标出。

图 3 是对通过大小排阻层析和反相层析纯化自犬尿的 IgE 结合蛋白的还原(red)或非还原(ox)样品进行的 SDS-PAGE 分析。泳道 M 含有分子量标记蛋白。

图 4 显示激肽释放酶作为流体相抑制剂对特异性 IgE 与固定的犬毛皮垢屑提取物的结合的影响。

图 5a-b 是通过对 37 份犬过敏反应对象血清中犬毛皮垢屑提取物的 IgE 抗体反应性的免疫印迹分析进行的评估。在与膜条带保温之前，血清样品如所指示的那样进行稀释。泳道 M 含有分子量标记蛋白。

图 6 显示通过实验性 ImmunoCAP 分析比较相对于血清稀释度校正的 28kDa 条带的免疫印迹信号强度与激肽释放酶-特异性 IgE 的水平。应用的 ImmunoCAP 和免疫印迹检测限用虚线表示。免疫印迹信号强度以任意单位(AU)表示。

图 7 显示纯化的犬尿激肽释放酶对 28kDa 蛋白带的特异性免疫印迹抑制。泳道 M 含有分子量标记蛋白。

图 8 显示通过大小排阻层析从犬毛皮垢屑纯化激肽释放酶的第一步。对图中所示的六个级分(标记为 1-6)进行 IgE 结合活性分析。

图 9 显示通过反相层析从犬毛皮垢屑纯化激肽释放酶的第二步。分析图中所示三个峰(标记为 1-3)的上部级分的 IgE 抗体结合活性。

图 10 显示与犬毛皮垢屑提取物、从犬毛皮垢屑纯化的尿激肽释放酶以及部分纯化的激肽释放酶的特异性 IgE 抗体结合的比较性免疫印迹分析。使用了两种激肽释放酶-反应性血清(第 6 和第 8)以及一种激肽释放酶非反应性血清(第 11)。分析了还原和非还原形式的过敏原制备物，如附图说明中所述。泳道 M 含有分子量标记蛋白。

图 11 显示纯化的重组犬尿激肽释放酶的 SDS Page 分析。

图 12 显示纯化的重组犬尿激肽释放酶的分析型胶体过滤分析法。

图 13 显示天然和重组犬尿激肽释放酶的特异性 IgE 抗体结合活性的比较。

发明详述

以下实施例举例说明了犬激肽释放酶的分离及其用途。所述实施例仅仅用于举例不应被理解为限制权利要求所说明的本发明。

实施例 1: 检测和分离犬尿 IgE 结合蛋白

为了研究犬尿是否含有与人类的犬过敏反应相关的过敏原，进行以下试验。从 7 岁龄雄性 Siberian Husky 与 Vorsteh 杂交犬收集尿液。用 0.45 μm 混合纤维素酯滤膜过滤之后，将 10 mL 尿液加载于 Superdex 75 大小排阻层析(SEC)柱(XK26/100, $V_t=505$ mL, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden)，该柱用 20 mM MOPS pH 7.6, 0.5 M NaCl (MBS)平衡，并用相同的缓冲液以 2 mL/min 的流速洗脱。收集来自图 1 所示的层析图中所示的三个峰的级分，分析过敏原活性。每种级分的蛋白成分固定在 ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)固相上，利用来自犬毛皮垢屑敏化的 8 名对象的血清检测其 IgE 抗体结合活性。选择的这些血清中大部分具有高 IgE 与犬毛皮垢屑提取物的结合，但与 rCan f 1, rCan f 2 和 nCan f 3 的结合相对较低。在三个检测的峰中，峰 2 含有目前最高水平的 IgE 结合活性（表 1）。利用 NuPAGE MES 缓冲液系统(10% NuPAGE gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)对峰 2 的还原样品的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示两条明显的蛋白带，其表观分子量分别为大约 10 和 18 kDa（未显示）。

从对应峰 2 的汇集物进一步纯化蛋白是利用 Source 15 反相层析(RPC)柱(ST4.6/100, $V_t=1.66$ mL, GE Healthcare Biosciences)进行的。加入三氟乙酸(TFA)至终浓度为 0.065%之后，将该汇集物施加在柱上，然后利用 9 倍柱体积的 0.065% TFA 水溶液洗涤。利用 0-45%含有 0.05% TFA 的乙腈水溶液的线性梯度洗脱，产生一个独特但有些不对称的峰（图 2，用箭头指示峰）。含有该峰的级分的还原样品的 SDS-PAGE 显示存在 10 和 18 kDa 带，似乎不能分开(图 3)。覆盖整个峰的级分由此收集在一起，在图 2 中用横条标示。该汇集物的非还原样品的 SDS-PAGE 显示另外的 28 kD 条带以及 10 kDa 和 18 kDa 带的迁移率略有偏移(图 3)。还原态中也可见大约 55 kDa 的蛋白带，其可能是 28kDa 蛋白的二聚体。非还原状态中出现 28kDa 带提示该蛋白可能是 10 和 18 kDa 多肽通过一或多个半胱氨酸桥连接而成的。随后的线性质谱分析（数据未显示）显示 28 kDa 蛋白在还原和烷基化之后解离进一步支持了这一观点。

实施例 2: 鉴定犬尿 IgE 结合蛋白为前列腺 激肽释放酶

利用质谱法和 N 末端测序确定分离自犬尿的 IgE 结合蛋白。

通过 MALDI-TOF 进行肽质量指纹分析

为了对 PRC 纯化的尿蛋白进行溶液内消化, 通过依次分别以大约 45-和 100-倍摩尔过量加入样品 DTT 和碘代乙酰胺进行还原和烷基化。胰蛋白酶消化随后在 37°C 进行过夜, 其中利用猪胰蛋白酶(Trypsin Gold, 质谱级, Promega, Madison, WI, USA)。含有消化的肽的样品点样在 MALDI 靶标板上, 加入含 50%乙腈, 10 mM NH₄[H₂PO₄], 0.1 % TFA 的 α -氰基基质溶液。蒸发溶剂之后, 在 Bruker Daltonics Autoflex 2 仪(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)上进行肽质量指纹(PMF)。为了鉴定匹配获得的 PMF 结果的蛋白质, 利用 Mascot 服务器(Matrixscience, London, UK)搜索 MSDB 数据库。对所选的肽进行源后裂解(Post source decay) (PSD)分析。利用肽校准标准品(Bruker Daltonics)进行外部校准。

对 SDS-PAGE 的单个蛋白带的凝胶内消化分析基本上按照 Shevchenko (24)进行。从考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶切下实施例 1 中所述的 10, 18 和 28 kDa 条带。凝胶片依次用含有 50%乙腈的 50 mM 碳酸氢铵洗涤然后在纯乙腈中收缩。用 50 mM 碳酸氢铵再水化该凝胶片之后, 加入乙腈至 50%并再次用乙腈洗涤, 真空离心干燥所述的凝胶片。利用 50 mM 碳酸氢铵中的 45 mM DTT 和 100 mM 碘代乙酰胺依次进行离析和烷基化。用 50 mM 碳酸氢铵中的 50%乙腈重复洗涤, 最后用 100%乙腈洗涤, 然后再再次通过真空离心干燥凝胶颗粒。利用猪胰蛋白酶如上所述在 37°C 消化过夜。消化的样品随后经超声处理并在含有 0.1% TFA 的 50%乙腈中从凝胶颗粒提取肽。样品制备和肽质量指纹如上所述进行。

溶液内消化的尿蛋白的 PMF 分析的结果显示与犬前列腺激肽释放酶(登记号 P09582)高度明显匹配 ($p < 0.05$)。两种肽的 PSD 分析, $m/z=1224.6$ 和 $m/z=1632.8$, 其也存在 18kDa 带的凝胶内消化分析中, 显示与具有相同蛋白质数据库入口的氨基酸序列 FMLCAGVLEGK 和 SHDLMLLHLEPAK 显著匹配, 分别对应残基 194-204 和 117-130。

由于 28 kDa 带的 PMF 也与犬激肽释放酶 (P09582) 有非常显著的数据库匹配($p < 0.05$), 对其进行的凝胶内消化的蛋白带分析也支持上述分析结果。10kDa 带的凝胶内消化样品的分析也进一步证实了分离的尿蛋白的鉴定, 该肽的 PSD 分析结果 $m/z=1004.6$ 显示其与氨基酸序列 SFIHPLYK 高度显著($p < 0.05$)数据库匹配, 对应 P09582 的残基 95-102。

N-末端氨基酸测序

为了进行 *N*-末端测序, 从 SDS-PAGE 凝胶分别切下还原的 10 kDa 和 18 kDa 蛋白带, 并在 6 M 盐酸胍, 20 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl 中利用塑料棒搅匀进行提取。提取的 10 kDa 和 18 kDa 带的 *N*-末端测序利用 Hewlett-Packard G1000A 仪(Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)进行, 分别产生氨基酸序列 IIGGREXLKN 和 AVIRPGEDRS, 其与登记号 P09582 的犬前列腺激肽释放酶前体序列中的残基 25-34 和 108-117 残基匹配。

总而言之, 本实施例中描述的结果证实了纯化的犬尿蛋白的主要成分(对应还原 SDS-PAGE 分析中的 10 和 18 kDa 带)与犬前列腺激肽释放酶相同。此外, 观察到的结果提示该 10 和 18 kDa 多肽通过最初的基因产物的翻译后切割形成, 并由二硫桥连接形成非还原条件下所见的 28 kDa 蛋白质, 与先前对于人激肽释放酶所述的情况相似(25)。

前列腺激肽释放酶也已知为精氨酸酯酶并且在描述相同或基本相同的氨基酸序列的数据库入口中携带该标签, 所述的氨基酸序列包括 NP_001003284, CAA68720 和 AAA30831。此外, 我们注意到在肾、胰腺和唾液腺组织中表达的激肽释放酶的另一变体, 已经在犬中鉴定(登记号 CAA53210)并且与前列腺激肽释放酶具有 68%的氨基酸相同性。

实施例 3: 评估激肽释放酶, rCan f 1, rCan f 2 和 nCan f 3 的 IgE 结合活性

纯化的重组和天然犬过敏原的体外 IgE 结合活性利用 ImmunoCAP[®] (Phadia, Uppsala, Sweden)检测, ImmunoCAP[®] 为临床诊断遗传性过敏反应中使用的特异性 IgE 抗体检测的免疫测定系统。克隆重组 Can f 1 和 Can f 2 (5)并在大肠杆菌中表达(26)。犬白蛋白利用以离子交换层析和蓝色琼脂

糖层析自血清纯化，如(27)所述。利用试验性 ImmunoCAP 检测进行血清分析(26)。

本研究利用来自瑞典(n=9)、西班牙(n=23)和北美洲 (n=4)的 37 名犬过敏反应患者的血清。所有的患者都对犬毛皮垢屑提取物具有阳性皮肤针刺试验结果并且经过医生诊断为患有犬过敏反应，症状为哮喘、过敏性鼻-结膜炎和/或风疹。所有血清对犬毛皮垢屑提取物的特异性 IgE 试验 (ImmunoCAP)都呈阳性。

对犬毛皮垢屑提取物，rCan f 1, rCan f 2, nCan f 3 以及纯化的激肽释放酶的特异性 IgE 水平显示于表 2，结果总结于表 3。在受试血清中，29 份显示对激肽释放酶的 IgE 反应性，18 份显示对 rCan f 1 的 IgE 反应性。rCan f 2 和 nCan f 3 对于受试者而言表现为较弱的过敏原，仅仅分别结合 37 份中的 8 和 6 份。37 份血清中的 14 份(38%)仅仅与激肽释放酶反应。激肽释放酶-反应性血清平均而言，结合激肽释放酶的 IgE 水平达到结合犬毛皮垢屑的 IgE 的 64%。在对于那些过敏原有特异性反应的血清中，结合 rCan f 1, rCan f 2 和 nCan f 3 的 IgE 相应的相对水平分别为 45%，25%和 47%。37 份受试血清中仅仅有 2 份缺乏对所有四种犬过敏原的 IgE 反应性。IgE 与激肽释放酶的结合显示与其他任何犬过敏原没有关系，证实了对激肽释放酶的免疫反应是独立变量并且不是与 Can f 1, Can f 2 或 Can f 3 交叉反应的结果。

所得结果明显说明犬前列腺激肽释放酶是本文所研究犬过敏反应对象的主要独特过敏原。通过研究发病率和 IgE 结合程度，发现激肽释放酶是目前最为重要的犬过敏反应过敏原，并且在所研究的对象中，超过三分之一对激肽释放酶有反应但对其他检测的过敏原都没有反应。

实施例 4: 证实犬毛皮垢屑提取物中激肽释放酶-特异性 IgE 抗体结合活性

进行 IgE 抑制试验检验犬毛皮垢屑是否含有能结合激肽释放酶反应性 IgE 抗体的表位。具有对激肽释放酶的 IgE 反应性的来自三名对犬过敏的对象(A-C)的血清样品首先在室温与终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的纯化的激肽释放酶

保温，同时作为阴性对照，与稀释的血清或大肠杆菌非过敏原性麦芽糖结合蛋白(MBP)保温。所有样品随后一式双份进行分析，分析 IgE 与携带固定的犬毛皮垢屑提取物的 ImmunoCAP 检测系统的结合以研究与激肽释放酶预先保温是否阻止 IgE 与附着于固相的毛皮垢屑蛋白结合。作为激肽释放酶抑制作用的特异性的对照，对 Can f 1 和 Can f 2 过敏但对激肽释放酶不过敏的个体 (D) 的血清,与其他血清一并包括在试验内。

抑制试验的结果显示于图 4。纯化自犬尿的激肽释放酶完全抑制 IgE 结合三份激肽释放酶反应性血清中的两份 (A 和 B) 的犬毛皮垢屑并且部分抑制第三份血清 (C) 中的结合，已知第三份血清也对其他犬过敏原有反应性。阴性对照蛋白 MBP 与稀释的血清相比没有显示明显的抑制效应。此外，激肽释放酶对于 Can f 1-和 Can f 2-反应性血清 (D) 的 IgE 结合没有抑制作用。

结果表明能结合激肽释放酶-反应性 IgE 抗体的表位结构存在犬毛皮垢屑中，而限于尿液中。

实施例 5: 利用免疫印迹分析评估 IgE 与来自犬毛皮垢屑提取物的激肽释放酶-样 28 kDa 蛋白的结合

为了鉴定存在犬毛皮垢屑中的蛋白(其可能产生观察到的激肽释放酶样过敏原活性),将具有已知水平的激肽释放酶反应性 IgE 的 37 份血清用于免疫印迹实验中。对通过 SDS-PAGE (12.5% Excel 2-D gel, GE Healthcare Biosciences)分离的非还原犬毛皮垢屑提取物进行免疫印迹分析，并电印迹 (electroblot)到硝酸纤维素膜(Hybond ECL, GE Healthcare Biosciences)。蛋白质印迹在室温利用封闭缓冲液(50 mM 磷酸盐 pH 7.4, 0.1 % (v/v) Tween-20, 0.9% (w/v) NaCl, 0.3% (w/v) Dextran T10)封闭 1h，然后与每份患者血清保温过夜，在封闭缓冲液中稀释 1.5 到 20 倍。每份血清的稀释因子显示在图 5 中其相应膜条带的上方括号中。在封闭缓冲液中利用 0.5 % (v/v) Tween-20 洗涤之后，在室温将膜与封闭缓冲液中的 ^{125}I -标记的抗人 IgE 抗体保温，并利用储存磷光质屏(storage phosphor screen)和 Variable Mode Imager, Typhoon 9410 (GE Healthcare Biosciences)对结合的 IgE 进行放射图像检测。

实验结果显示于图 5a-b。在使用的 37 份血清中，有 30 份显示 IgE 与 28 kDa 蛋白结合，21 份显示 IgE 与 23 kDa 带结合，所述的 23kDa 带对应 Can f 1 和/或可能对应 Can f 2。免疫印迹信号强度利用 Phoretix 1D 软件 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) 定量。每种血清中 IgE 与每条带的反应水平通过用信号强度乘以血清稀释因子来计算。图 6 显示免疫印迹分析中 IgE 与 28 kDa 带结合水平与实施例 3 中所述激肽释放酶 ImmunoCAP 测定的比较，显示密切相关。

为了直接检验尿激肽释放酶与犬毛皮垢屑中 28 kDa 带的关系，进行免疫印迹抑制试验。将与 28 kDa 带产生免疫反应的血清在室温与纯化的尿激肽释放酶或 rCan f 1 预保温 2hr，终浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，或与血清稀释物预保温。携带免疫印迹的非还原犬毛皮垢屑提取物的膜条带随后与预保温的血清样品接触，如上所述分析 IgE 结合。试验显示犬毛皮垢屑中 28kDa 带的 IgE 结合完全被血清与激肽释放酶的预保温消除，但与单独的 rCan f 1 和缓冲液预保温仍然保持所述的结合(图 7)。

总而言之，本实施例的结果显示犬毛皮垢屑提取物中存在电泳以及免疫学性质方面与尿激肽释放酶非常相似的蛋白质。

实施例 6: 犬毛皮垢屑中激肽释放酶的部分纯化和鉴定

犬毛皮垢屑的激肽释放酶-样蛋白通过 SEC 和 RPC 纯化，进行生化定性。将 3 克犬毛皮垢屑(Allergon, Välinge, Sweden)在室温在 100 mL MBS 中通过持续滚动(end-over-end rotation)3 hr 进行提取。20,000 x g 离心并用 Amicon 滤膜(PM-10, Millipore, Billerica, MA, USA)浓缩后，提取物施加在 XK50/100 Superdex 75 柱(GE Healthcare Biosciences)上并用 MBS 洗脱(图 8)。汇集来自 6 个峰的级分(在图 8 中表示为 1-6)并分析过敏原活性。每个级分的蛋白成分固定在 ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)固相上并且利用来自犬毛皮垢屑敏化的对象的 8 份血清检测 IgE 抗体结合活性，如表 4 所示。这些血清中大多数对犬毛皮垢屑提取物具有高 IgE 结合但对 rCan f 1, rCan f 2 或 nCan f 3 的结合相对较低。从表 4 可见，SEC 分离的 3 个峰含有的 IgE 水平是测试的 6 个峰中最高的。选择该汇集物进一步纯化。

加入 TFA 至终浓度 0.065%，将该汇集物施加在 ST4.6/100 Source 15 RPC 柱(GE Healthcare Biosciences)上，利用含有 0.05% TFA 的 0-54%线性梯度乙腈水溶液进行洗脱(图 8)。图 9 所示的三个峰的过敏原反应性分析利用上述标准选出的 5 份血清进行。分析结果(表 5)明显表明第 1 个峰具有最高的 IgE 抗体结合水平。该峰的还原 SDS-PAGE 分析显示存在 10 kDa, 18 kDa 和 23 kDa 蛋白带(未显示)。

峰 1 中存在的三条带从凝胶切下，并进行凝胶内消化和质谱分析，如实施例 2 所述。对选择的肽的 PSD 分析($m/z=1004.52$ 和 $m/z=1632.98$)之后，23 kDa 条带鉴定为 Can f 1, 10 kDa 和 18 kDa 带鉴定为犬前列腺激肽释放酶(登记号 P09582)。

此外，从切下的凝胶带中洗脱 10 kDa 和 18 kDa 带，进行 N 末端氨基酸测序。所得序列为 xIGGRExLKN 和 AVxRPGEDRx(其中“x”表示不确定残基)匹配犬前列腺激肽释放酶前体序列(登记号 P09582)的残基 25-34 和 108-117。

本实施例的结果表明具有与前列腺激肽释放酶相同或非常相关的一级结构的蛋白存在犬毛皮垢屑中。

实施例 7: 对来自犬毛皮垢屑和尿的激肽释放酶的相似的 IgE 抗体反应性

为比较犬尿和毛皮垢屑激肽释放酶的 IgE 抗体结合活性，在犬毛皮垢屑提取物的非还原样品、纯化的尿激肽释放酶以及部分纯化的犬毛皮垢屑激肽释放酶的免疫印迹分析中使用两份激肽释放酶-反应血清(表 2 中的 6 和 8 号血清)以及一种激肽释放酶非反应性血清(11 号)。两份激肽释放酶-反应性血清显示对所有 3 份制备物中的 28 kDa 带的 IgE 结合，表明犬毛皮垢屑提取物中 28 kDa 的 IgE 结合是由于激肽释放酶导致的。此外，很明显对纯化尿激肽释放酶中 28 kDa 带的显著反应性与相同制备物的考马斯染色的蛋白带的情况一致。与非还原激肽释放酶制备物中大约 55kDa 的带的 IgE 结合与实施例 1 中推定的激肽释放酶二聚体的情况一致。根据

ImmunoCAP 是非激肽释放酶反应性的血清显示与分析的三种过敏原制备物中的 28 kDa 带都没有 IgE 结合。

对还原的含激肽释放酶样品的免疫印迹反应性明显弱于非还原样品中的情况。仅仅纯化的尿激肽释放酶制备物(其激肽释放酶浓度高于其他分析的制备物)产生与还原时形成的 18 kDa 带的可检出的 IgE 反应。

观察到对免疫印迹分析中纯化的尿激肽释放酶的免疫反应性针对 28 kDa 的主要蛋白带的情况, 支持实验性激肽释放酶 ImmunoCAP 检测的正确性, 其 IgE 结合不是所用蛋白质制备物中的污染物导致的。结果进一步显示激肽释放酶上的至少一些 IgE 结合表位对于分子的还原敏感, 如 10 kDa 和 18 kDa 亚基的结合比与 28 kDa 非还原分子的结合弱也表明了这一点。

实施例 8: 评估修饰的激肽释放酶或激肽释放酶的变体或片段(分析物)的 IgE 结合性质

将分析物固定于固体支持物, 诸如 ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)。来自至少三个对相关物种过敏的代表性人患者并显示对该物种激肽释放酶的 IgE 反应性的血清样品在室温与终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的激肽释放酶保温 3h, 同时与单独的缓冲液和大肠杆菌非过敏性麦芽糖结合蛋白(MBP)保温作为阴性对照。随后分析样品的 IgE 与携带固定的分析物的 ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)检测的结合来研究与激肽释放酶预保温是否特异性已知或明显降低 IgE 结合。

实施例 9: 通过疏水相互作用层析(HIC)从犬尿纯化激肽释放酶

犬尿汇集样品用 5 μm 和 0.45 μm 滤膜在氮压下过滤。所有层析操作均用 ÄKTA Explorer 100 Air system (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden)进行。4 等份的 120 ml 过滤犬尿利用 Sephadex G-25 柱(GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) (column volume 461 ml)进行缓冲液交换, 每次在走柱后洗涤该柱。使用的缓冲液为:50 mM 磷酸钠, 1 M

(NH₄)₂SO₄, 0.02% NaN₃, pH = 7。样品（大约 505 ml）随后通过 0.45 μm 滤膜过滤，施加在 HIC 柱(HiPrep Phenyl FF (high sub), 20ml, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden)上。用于 HIC 分离的缓冲液为: A) 50 mM 磷酸钠, 1 M (NH₄)₂SO₄, 0.02% NaN₃, pH = 7, 和 B) 50 mM 磷酸钠, 0.02% NaN₃, pH = 7。流出级分（含有激肽释放酶）以流速 5 ml/min 收集在 10 ml 级分 (Frac 950)中，汇集流出级分。吸收的物质利用 100%缓冲液 B 在梯度中洗脱。

所述级分利用 BCA (bicinchoninic acid)测定和 SDS-PAGE (非还原样品, 含银)分析。非还原条件下的 SDS-PAGE 显示激肽释放酶存在流出级分中，随后汇集所述级分用于进一步处理。

两等份的大约 125 ml 和一等份大约 87 ml 的汇集 HIC 流出级分随后利用 Sephadex G-25 SF 柱(GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden)进行缓冲液交换，所用缓冲液为 20 mM 磷酸钠, 0.02% NaN₃, pH = 8。激肽释放酶汇集物(456 ml)随后在 Amicon cell (350 ml, Millipore 滤膜, PBCC, 截留值 5000 kDa, 直径 76 mm)上浓缩到体积约为 43 ml。利用 BCA 测定法，测定最终的汇集物中的蛋白浓度为 0.9 mg/ml (in 43 ml = 共 38,7 mg)。施加于 HIC-柱的样品含有 101 mg 蛋白质，其在 HIC 纯化后的激肽释放酶回收率为 38%。

激肽释放酶制备物的纯度通过在 Superdex 75 HR 10/30 柱上在 ÄKTA purifier XT10 系统中进行分析凝胶过滤来评估。对于该试验，样品体积为 100 μl，缓冲液为 10 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, pH = 7.4。

实施例 10: 利用电泳和质谱法鉴定并定性犬尿激肽释放酶

利用电泳在相同的凝胶上比较下述样品，应用胶体考马斯亮蓝(CBB)染色:

1. 标准分子量标记物
2. 犬尿
3. HIC-洗脱物（还原型）
4. HIC 流出级分（还原型）

5. HIC 流出级分（非还原型）

6. HIC-洗脱物（非还原型）

对于样品 2, 3 和 6, 检出大量蛋白。但是在样品 4（还原型 HIC 流出级分）中, 仅仅可见两条主带。这两条主带通过利用 MALDI-TOF(-TOF) 分析（参见下文）, 发现对应激肽释放酶的两种不同的变体（由于精氨酸酯酶活性在 R107 的蛋白水解产生的）。样品 5（非还原 HIC 流出级分）中, MALDI-TOF(-TOF)分析检测到 7 个不同的带（见下文）, 其对应激肽释放酶蛋白的不同变体。激肽释放酶包含 12 个半胱氨酸残基, 由此可能在非还原条件下由于形成半胱氨酸-半胱氨酸桥形成不同变体。因此, 可能在非还原条件下形成二聚体、三聚体等。

SDS-PAGE 条件, 胰蛋白酶消化和 MDI-TOF-TOF 分析

稀释样品利用 SDS-PAGE cleanup 试剂盒根据产品说明(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)制备。凝胶在 MES 缓冲液中在 200 V、35 分钟。还原和非还原样品在分离的聚集体中跑胶。利用胶状 CBB 染色过夜(随后在水中浸泡大约 5 小时脱色)。利用移液管尖端从凝胶人工选出样品, 根据标准方案处理（利用乙醇取代乙腈）, 与 12.5 ng/ μ l 胰蛋白酶在 37 摄氏度保温过夜。将 0.5 μ l 消化样品施加在 MALDI 系统的靶标板上并与 0.5 μ l MALDI 基质溶液混合(HCCA 在 50%乙腈, 0.1% TFA 中的饱和溶液)。利用 MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)质谱仪分析所有样品。为了鉴定匹配所得 PMF 结果的蛋白, 利用 Mascot 服务器(Matrixscience, London, UK)搜索 MSDB 数据库。对所选肽进行 MS-MS 分析。利用肽校准标准品(Bruker Daltonics)进行外部校准。利用如下搜索标准进行数据库搜索:

分类: 哺乳动物

质量允差: 100 ppm

允许氧化的蛋氨酸和 1 个缺失的裂解。

数据库中的激肽释放酶序列:

MWFLALCLAMSLGWTGAEPHFQPRIIGGRECLKNSQPWQVAVYHNGEF
 ACGGVLVNPEWVLTAAHCA~~NSNCEVWLGRHNLSESE~~DEGQLVQVRKS
FIHPLYKTKVPR-----
AVIRPGEDRSHDLMLLHLEEPAKITKAVRVMDLPKKEPPLGSTCYVSG
 WGSTDPETIFHPGSLQCVDLKLSSNNQCAKVYTQKVTK**FMLCAGVLEG**
KKDTCKGDSGGPLICDGELVGITSWGATPCGKQPMPSLYTR**VMPHLMW**
IKDTMKANT (SEQ ID NO: 1)

(斜粗体是通过 MALDI-TOF (/TOF) MS (/MS)鉴定的肽序列)

实施例 11: 克隆、纯化和评估在巴斯德毕赤酵母中表达的重组犬激肽释放酶的 IgE 结合活性

为了证实尿激肽释放酶作为犬过敏原的性质和重要性, 制备所述蛋白作为重组过敏原利用巴斯德毕赤酵母作为表达宿主, 纯化并分析 IgE 抗体结合活性。

制备编码犬尿激肽释放酶的合成基因构建体

合成犬尿激肽释放酶基因通过将犬前列腺精氨酸酯酶的报道的氨基酸序列中对应成熟蛋白的部分回翻译成核苷酸序列设计(尿激肽释放酶, 登记号 P09582)。核苷酸序列设计为最优密码子翻译并且经同义修饰最小化二级结构并消除或增加合意的限制酶位点。获得并组装对应最终编码序列的寡核苷酸, PCR 扩增全长合成基因, 并克隆入载体 pPICZ A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)的 *XhoI* 和 *SalI* 位点, 添加 C 末端六组氨酸标记以使得能通过固定金属离子亲和层析 (IMAC)纯化蛋白。通过 *Sac I* 消化使得质粒 DNA 构建体线性化, 并转化进入巴斯德毕赤酵母 X-33 以同源重组进入染色体 AOX1 基因座。

表达和纯化重组犬激肽释放酶-2

重组蛋白在巴斯德毕赤酵母 X-33 (Invitrogen)中利用 7 L 生物反应器 (Belach Bioteknik, Solna, Sweden)产生。使用丰富肉汤培养基(20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物, 3.4 g/L 酵母氮源, 10 g/L 硫酸铵, 0.4 mg/L 生物素和 0.1

M 磷酸钾)在 30°C 培养。诱导表达并通过向培养物中加入甲醇到稳态浓度 0.1% (v/v)进行保持。发酵 70 hr 之后, 在+4°C 在 10 000 g 离心 10 min 收获培养物并回收上清用于蛋白纯化。

根据说明, 通过加入咪唑至 5 mM 以及加入 NaCl 至 15 M 调节上清以纯化, 利用 Tris base 调节 pH 到 7.2, 然后将其施加到通过 NiSO₄ 带电的 Streamline 25 螯合柱 (GE Healthcare Biosciences)。加样后, 在分离的步骤中用 20 mM 和 60 mM 咪唑洗柱, 用 500 mM 咪唑洗脱重组蛋白, 均在包含 20 mM Tris-HCl pH 8.0 和 0.15 M NaCl 的缓冲液中进行。

利用阳离子交换层析进一步纯化重组蛋白。含有重组激肽释放酶的 IMAC 级分通过 SDS-PAGE 鉴定, 汇集并用 2 个体积的 20 mM MES pH 6.0 稀释。调节 pH 到 6.0, 稀释的汇集物施加在 XK26/100 SP 琼脂糖 FF 柱(GE Healthcare Biosciences)上。该柱随后用 2 倍柱体积的 20 mM MES pH 6.0 中的 0.15 M NaCl 洗涤, 用相同缓冲液中的 0.30 M NaCl 洗脱重组蛋白。测定所得蛋白在 280 nm 的吸光度, 所用的计算的消光系数为 1.46 per mg/mL。

尽管合成激肽释放酶基因构建体被设计为指导单多肽链的产生, 从培养基中纯化的蛋白部分裂解成 18 kDa 和 12 kDa 链 (图 11), 类似天然尿激肽释放酶的加工。事实上, N 末端测序显示重组激肽释放酶的裂解位置与天然分子的相同 (数据未显示)。

为了评估重组蛋白在生理条件下的聚合状态和完整度, 对制备样品进行分析性大小排阻层析。如图 12 所示, 层析图主要包括单个对称峰, 通过 LMW 校准试剂盒(GE Healthcare Biosciences)确定对应分子量为 34 kDa。该分析显示重组蛋白尽管部分被加工, 但在溶液中仍保持在一起并为均质的很可能是单体的聚合状态。

重组激肽释放酶的 IgE 结合活性

产生的重组激肽释放酶的免疫活性通过与纯化自犬尿的天然蛋白进行比较来评估。两种蛋白分别固定在 ImmunoCAP[®]固相, 并且利用 37 份犬过敏反应个体血清检验体外 IgE 结合能力, 如实施例所述。

如图 13 所示，两组数据显示非常强的相关性($r=0.9988$)，表明产生的重组激肽释放酶与天然尿激肽释放酶在 IgE 抗体结合方面非常相似。由于重组蛋白制备物中完全没有任何其他犬来源蛋白，因此所述结果消除了任何关于上述实施例中的天然激肽释放酶制备物的活性组分的疑问。

参考文献

1. Custovic A, Green R, Taggart SCO, Smith A, Pickering CAC, Chapman MD et al. Domestic allergens in public places II: dog (Can f 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in dust and mite, cat, dog and cockroach allergens in the air in public buildings. *Clinical & Experimental Allergy* 1996;**26**:1246-1252.
2. Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, Ebner C, Scheiner O, Kraft D et al. Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting. *International Archives of Allergy and Immunology* 1993;**100**:60-67.
3. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: At the borderline between foreign and self? [Review]. *International Archives of Allergy and Immunology* 1999;**120**:259-269.
4. de Groot H, Goei KGH, van Swieten P, Aalberse RC. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f I and of Can f I-depleted extract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1991;**87**:1056-1065.
5. Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF et al. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology* 1997;**92**:577-586.
6. Boutin Y, Hebert H, Vrancken ER, Mourad W. Allergenicity and cross-reactivity of cat and dog allergenic extracts. *Clinical Allergy* 1988;**18**:287-293.
7. Saarelainen S, Taivainen A, Rytkonen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantyjarvi R et al. Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 2004;**34**:1576-1582.
8. Cabanas R, Lopez-Serrano MC, Carreira J, Ventas P, Polo F, Caballero MT et al. Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2000;**10**:71-77.
9. Bayard C, Holmquist L, Vesterberg O. Purification and identification of allergenic alpha (2u)-globulin species of rat urine. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1290**:129-134.
10. Ohman JL. Allergy in man caused by exposure to mammals. *J Am Vet Med Assoc* 1978;**172**:1403-1406.
11. Schumacher MJ. Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice. *Mol Immunol* 1980;**17**:1087-1095.
12. Siraganian RP, Sandberg AL. Characterization of mouse allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1979;**63**:435-442.
13. Taylor AN, Longbottom JL, Pepys J. Respiratory allergy to urine proteins of rats and mice. *Lancet* 1977;**2**:847-849.
14. Hoffman DR. Dog and cat allergens: urinary proteins or dander proteins? *Annals of Allergy* 1980;**45**:205-206.
15. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB Journal* 2002;**16**:414-416.
16. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clinical & Experimental Allergy* 1999;**29**:896-904.
17. Cromwell O, Fiebig H, Suck R, Kahlert H, Nandy A, Kettner J et al. Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;**26**:261-281, vii.
18. Gafvelin G, Thunberg S, Kronqvist M, Gronlund H, Gronneberg R, Troye-Blomberg M et al. Cytokine and antibody responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1. *International Archives of Allergy and Immunology* 2005;**138**:59-66.

19. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005;**116**:608-613.
20. Mahler V, Vrtala S, Kuss O, Diepgen TL, Suck R, Cromwell O et al. Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Clinical & Experimental Allergy* 2004;**34**:115-122.
21. Weidinger S, Mayerhofer A, Raemsch R, Ring J, Kohn FM. Prostate-specific antigen as allergen in human seminal plasma allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006;**117**:213-215.
22. Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Allergen-induced mediator release tests. *Allergy* 2003;**58**:553-558.
23. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? [Review]. *Clinical & Experimental Allergy* 2004;**34**:332-339.
24. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1996;**68**:850-858.
25. Frenette G, Deperthes D, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY. Purification of enzymatically active kallikrein hK2 from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1334**:109-115.
26. Marknell DeWitt Å, Niederberger V, Lehtonen P, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P et al. Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clinical & Experimental Allergy* 2002;**32**:1329-1340.
27. van Eijk HM, Rooyackers DR, van Acker BA, Soeters PB, Deutz NE. Automated isolation of high-purity plasma albumin for isotope ratio measurements. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1999;**731**:199-205.

<110> 法蒂亚公司 (Phadia AB)
 Mattsson, Lars
 Everberg, Henrik
 Lidholm, Jonas

<120> 新前列腺激肽释放酶过敏原

<130> P07629/HAM

<150> SE0602084-7

<151> 2006-12-22

<150> US60/876958

<151> 2006-12-22

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 1

Met Trp Phe Leu Ala Leu Cys Leu Ala Met Ser Leu Gly Trp Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Glu Pro His Phe Gln Pro Arg Ile Ile Gly Gly Arg Glu Cys Leu
 20 25 30

Lys Asn Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Val Tyr His Asn Gly Glu Phe
 35 40 45

Ala Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ala Asn Ser Asn Cys Glu Val Trp Leu Gly Arg His Asn Leu
 65 70 75 80

Ser Glu Ser Glu Asp Glu Gly Gln Leu Val Gln Val Arg Lys Ser Phe

85	90	95
Ile His Pro Leu Tyr Lys Thr Lys Val Pro Arg Ala Val Ile Arg Pro 100	105	110
Gly Glu Asp Arg Ser His Asp Leu Met Leu Leu His Leu Glu Glu Pro 115	120	125
Ala Lys Ile Thr Lys Ala Val Arg Val Met Asp Leu Pro Lys Lys Glu 130	135	140
Pro Pro Leu Gly Ser Thr Cys Tyr Val Ser Gly Trp Gly Ser Thr Asp 145	150	155
Pro Glu Thr Ile Phe His Pro Gly Ser Leu Gln Cys Val Asp Leu Lys 165	170	175
Leu Leu Ser Asn Asn Gln Cys Ala Lys Val Tyr Thr Gln Lys Val Thr 180	185	190
Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Val Leu Glu Gly Lys Lys Asp Thr Cys 195	200	205
Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Cys Asp Gly Glu Leu Val Gly 210	215	220
Ile Thr Ser Trp Gly Ala Thr Pro Cys Gly Lys Pro Gln Met Pro Ser 225	230	235
Leu Tyr Thr Arg Val Met Pro His Leu Met Trp Ile Lys Asp Thr Met 245	250	255
Lys Ala Asn Thr 260		

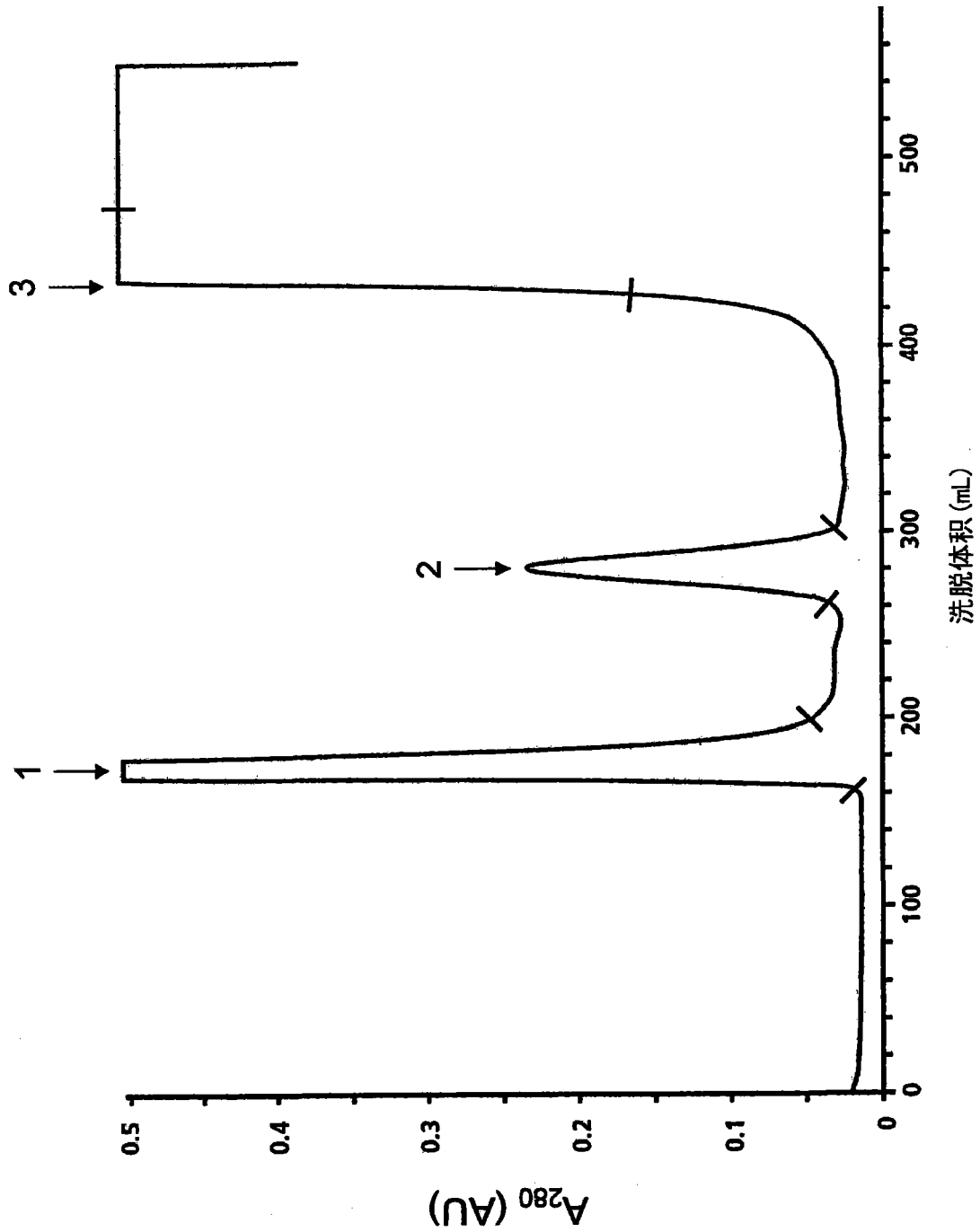


图1

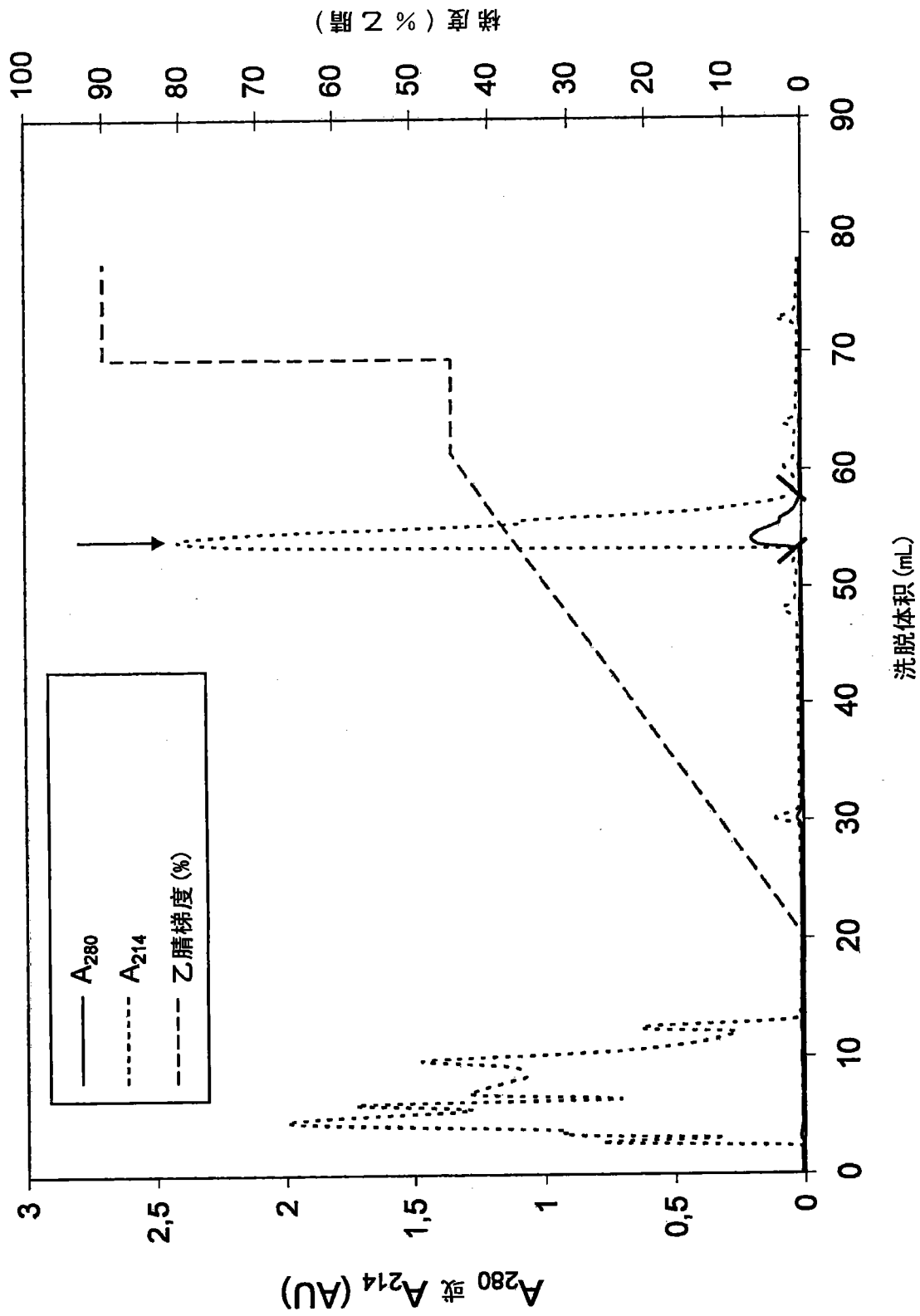


图2

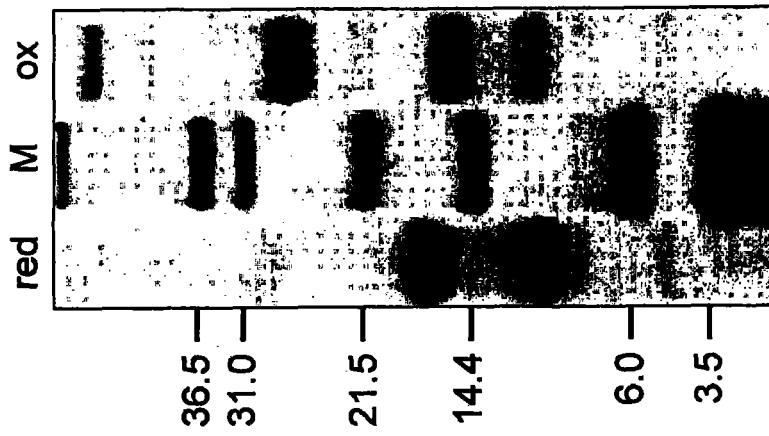
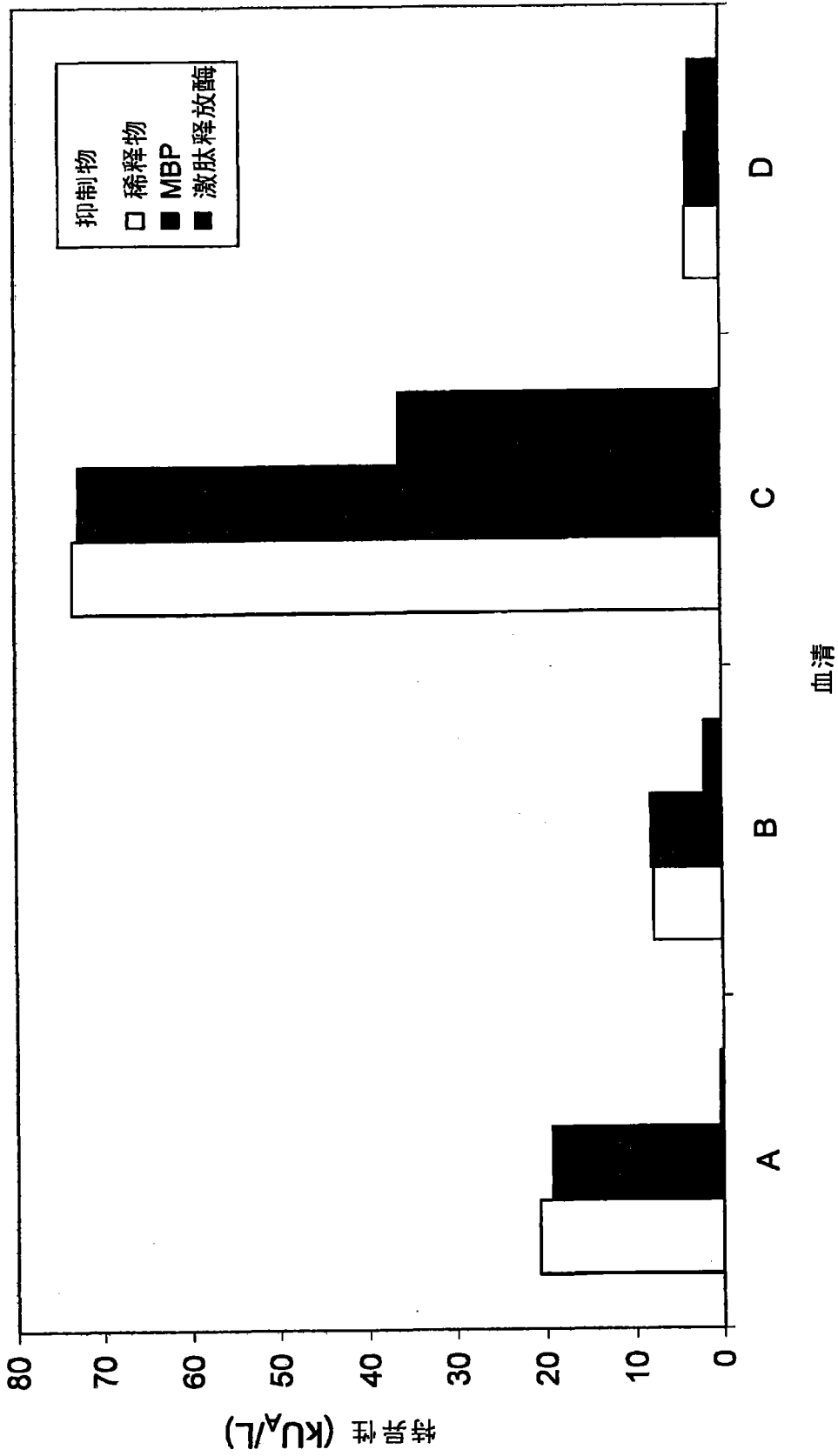


图3



血清 图4

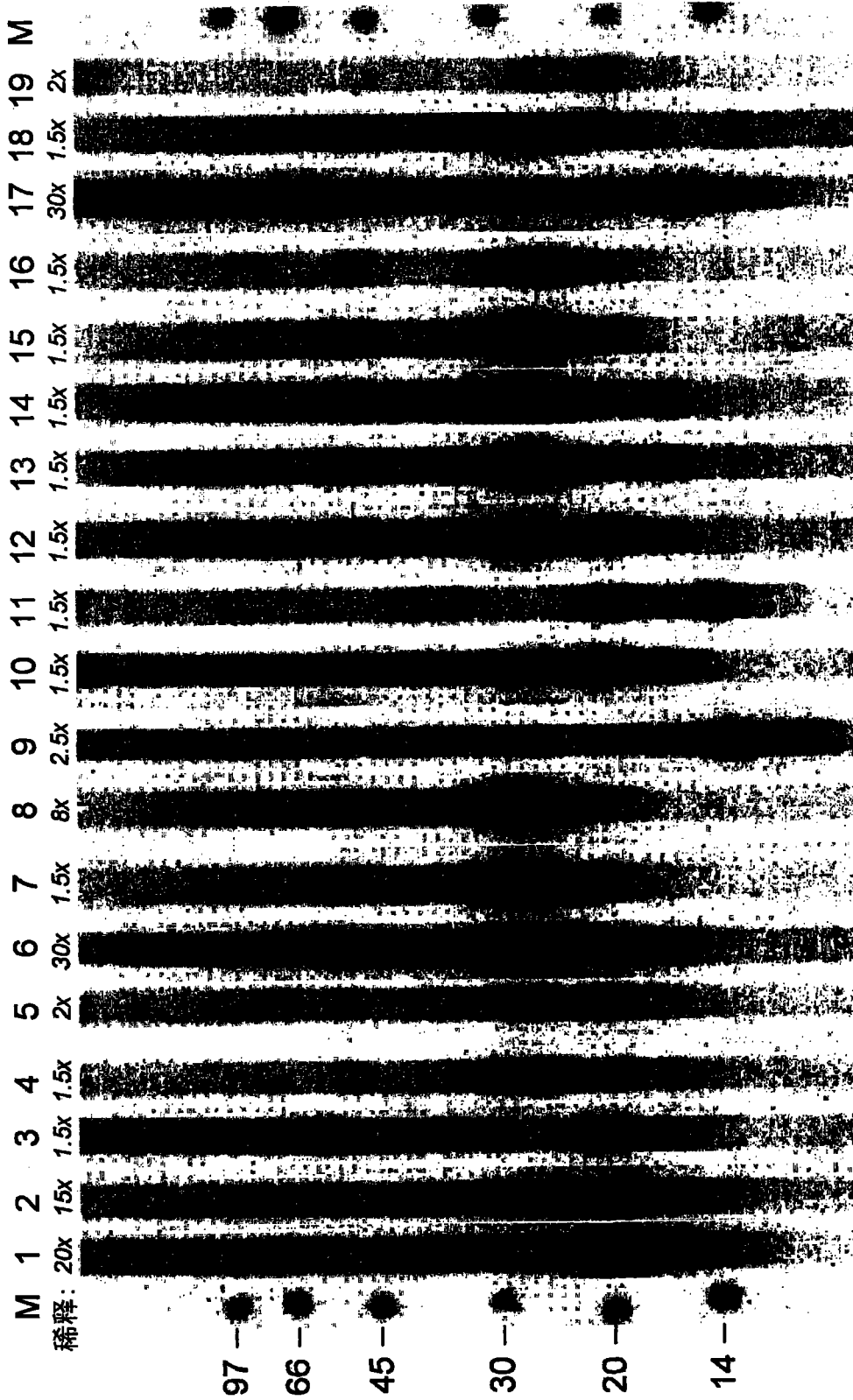


图 5a

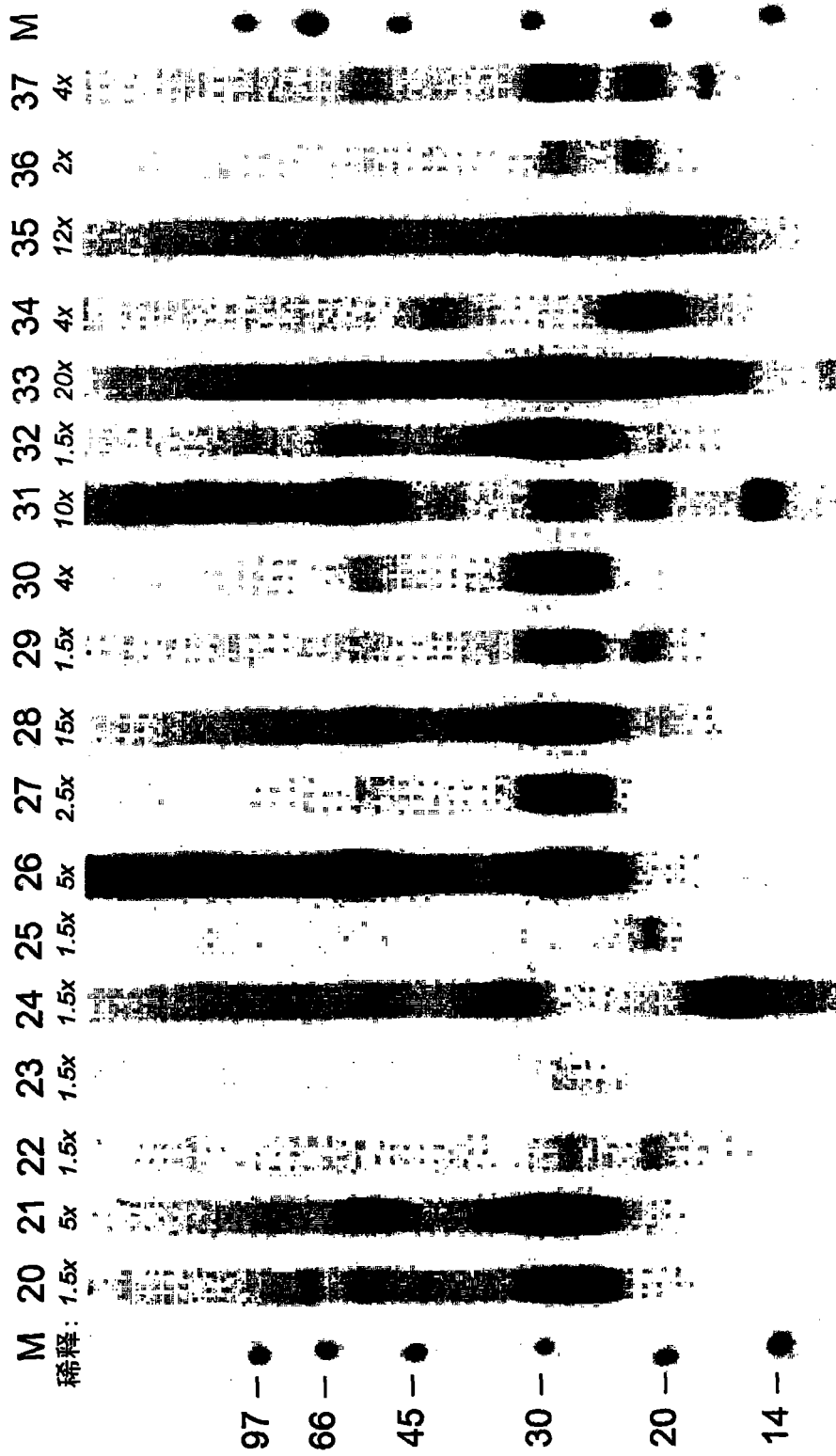


图 5b

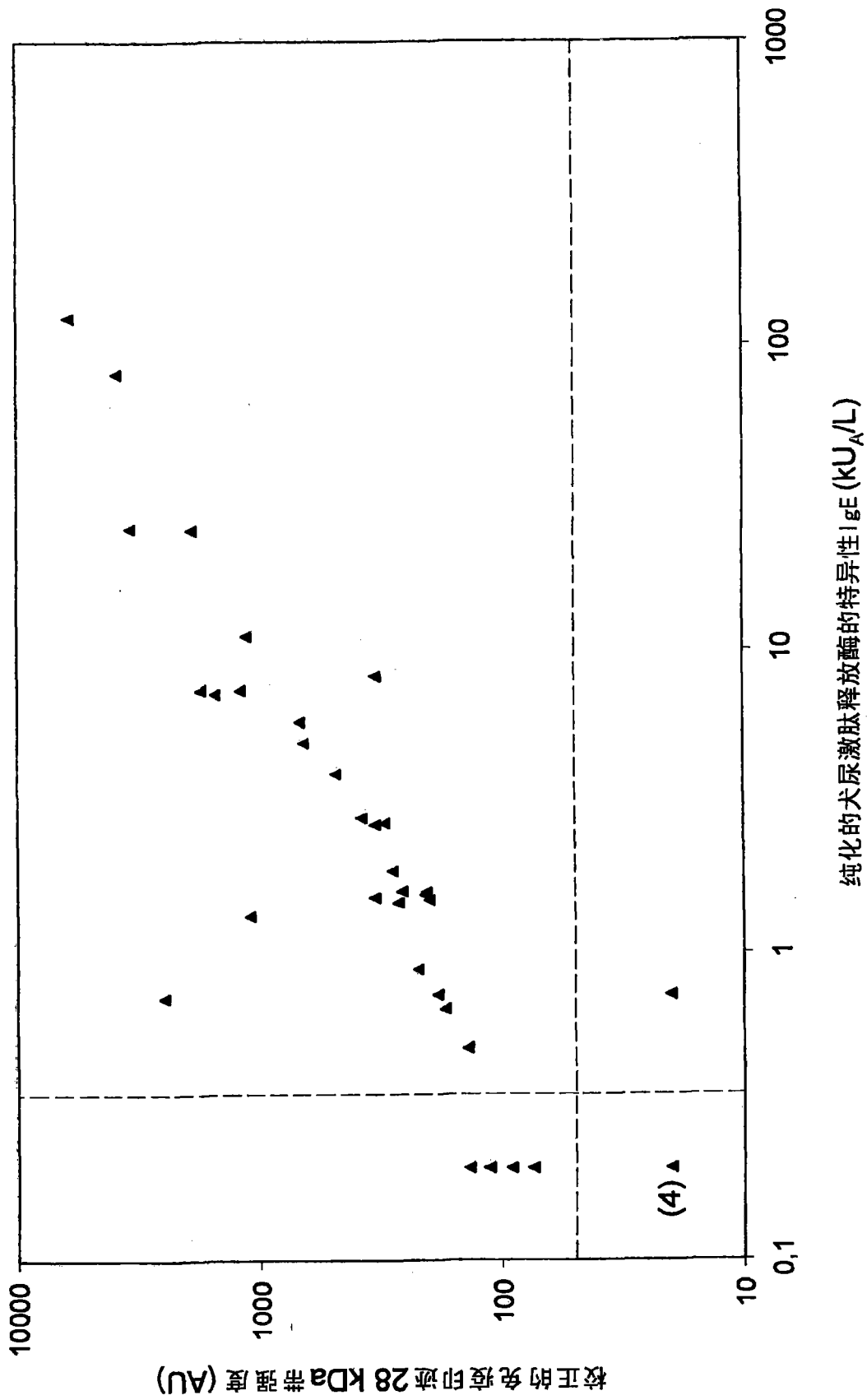


图6

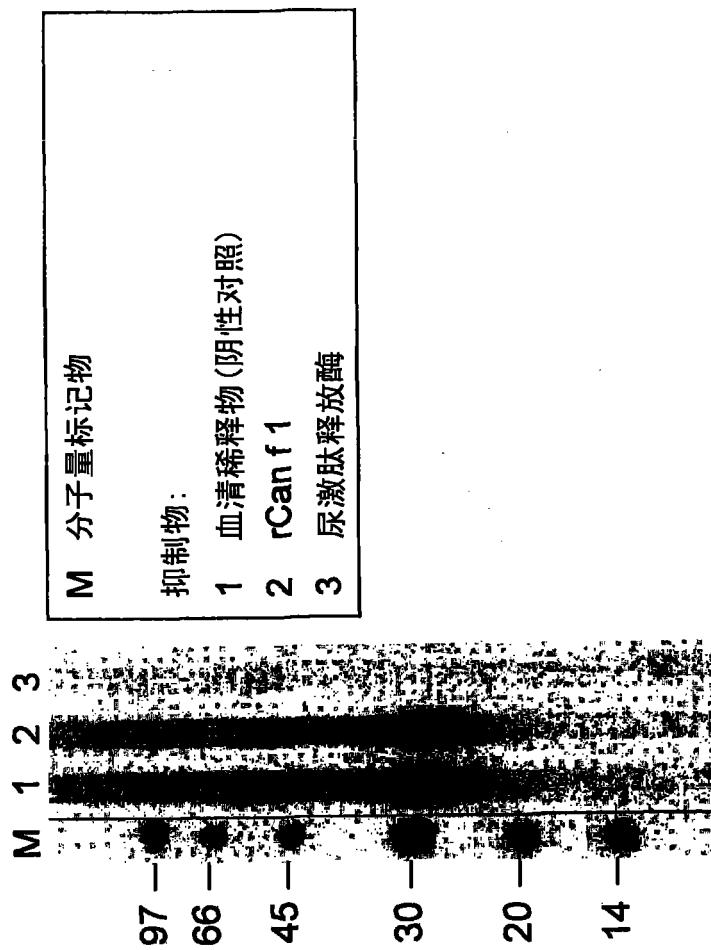
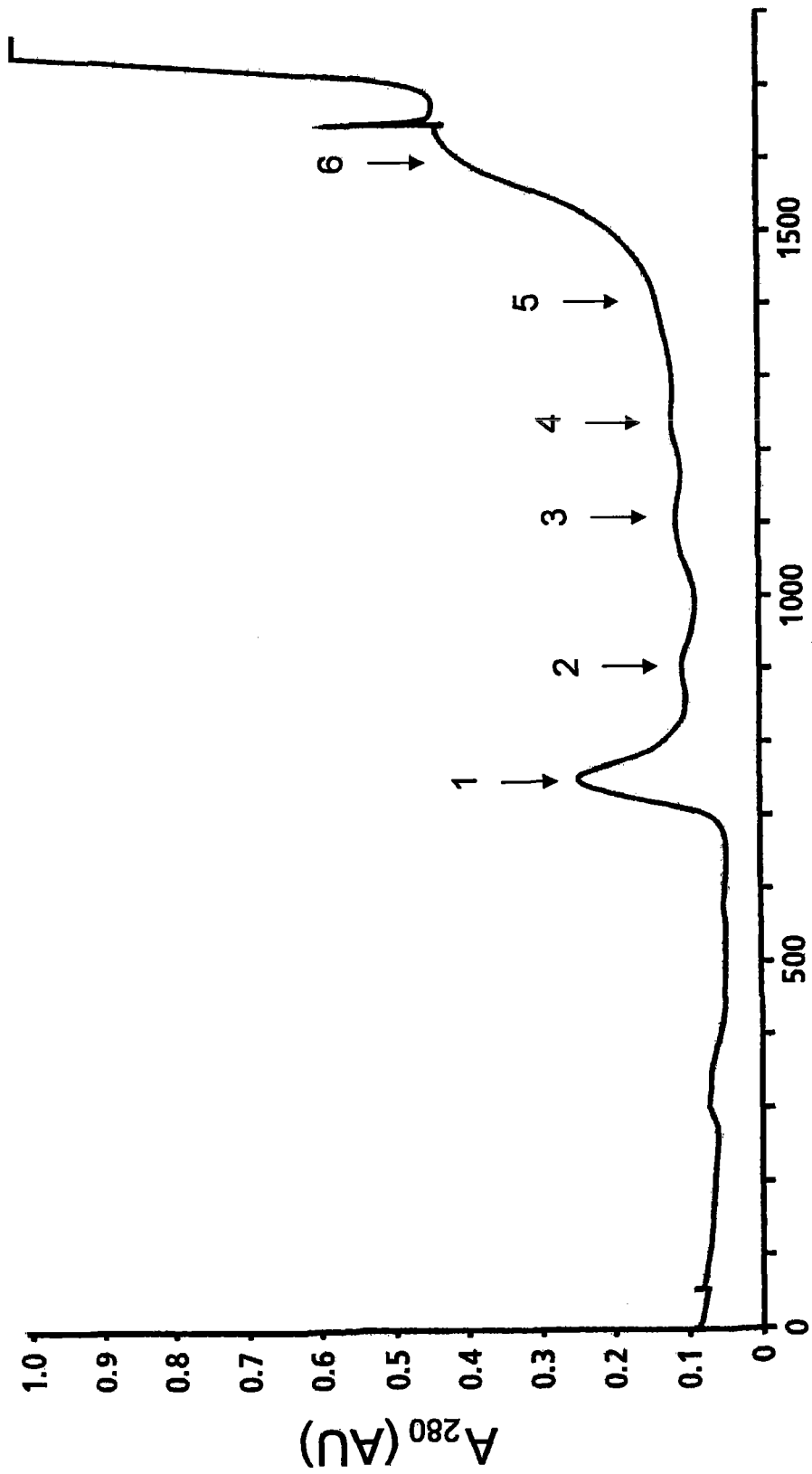


图7



洗脱体积 (mL)

图 8

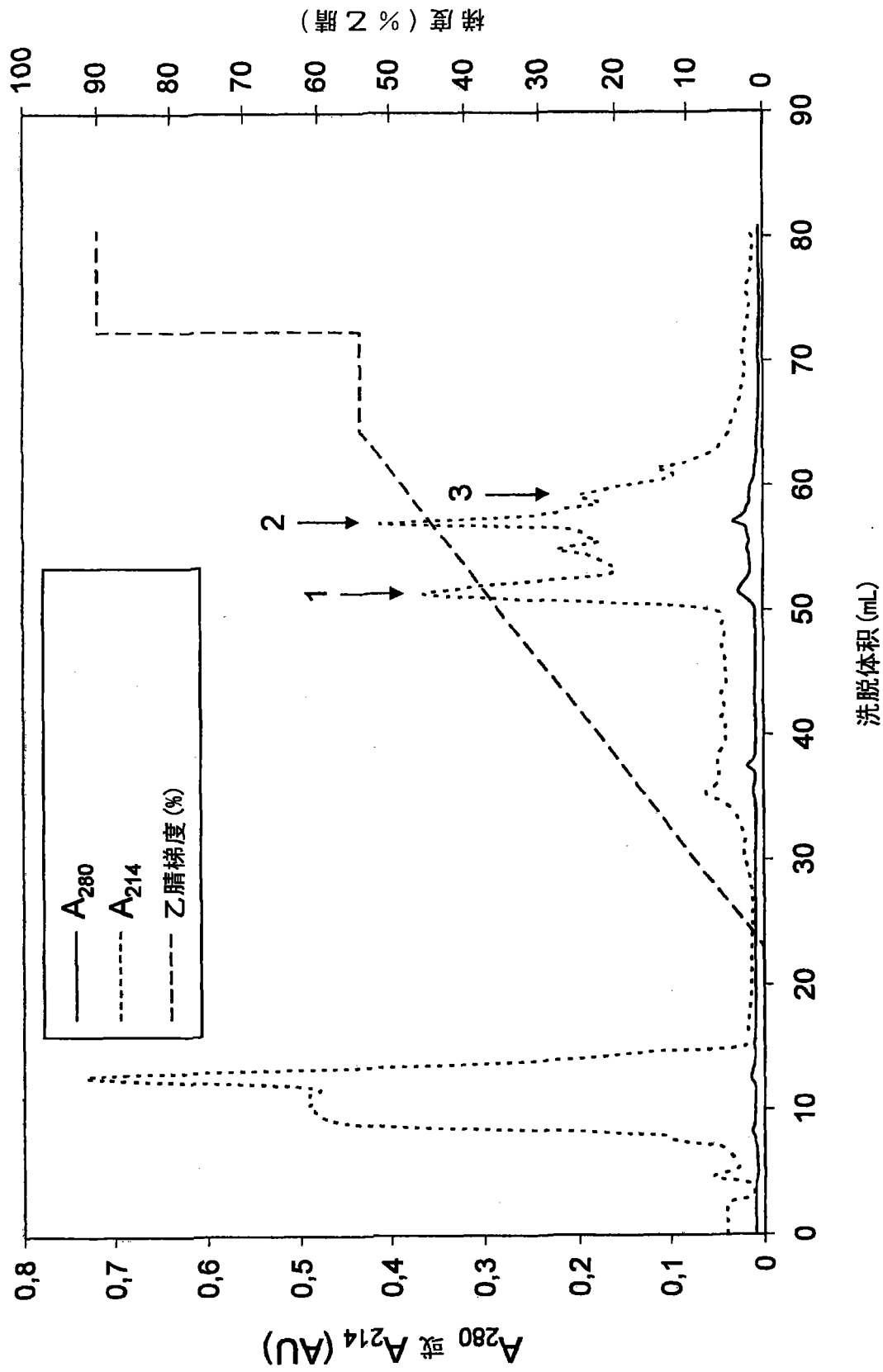


图9

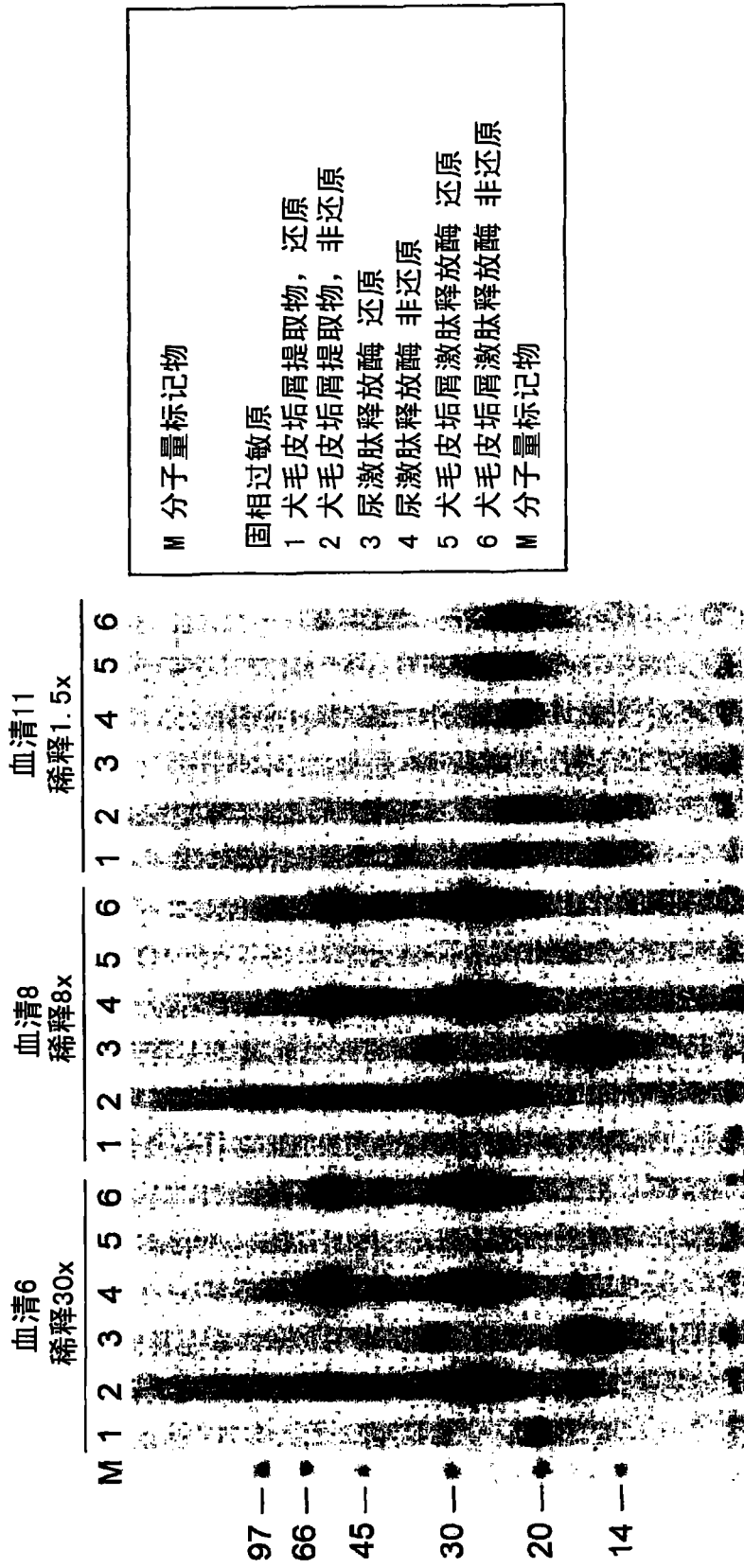


图10

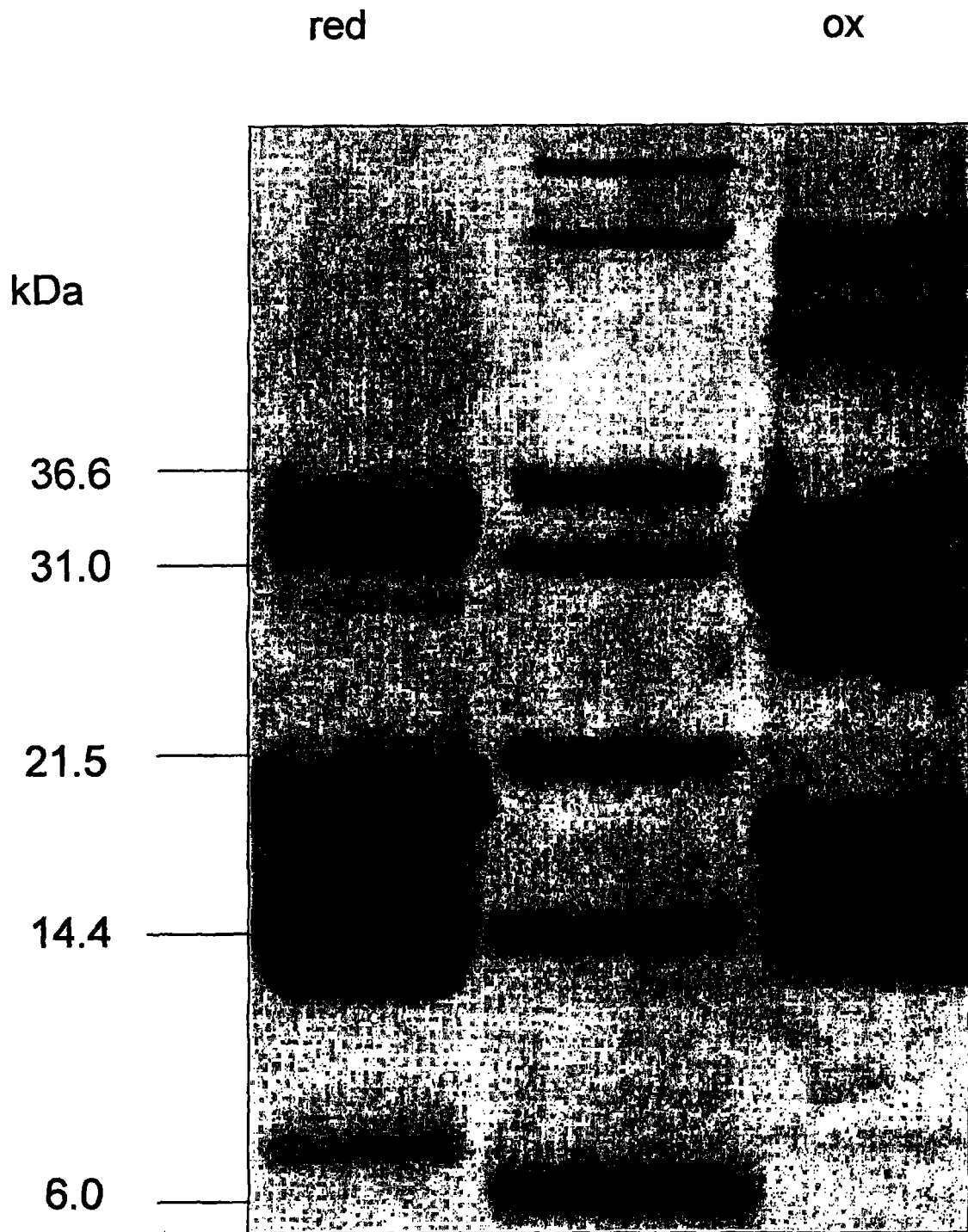


图11

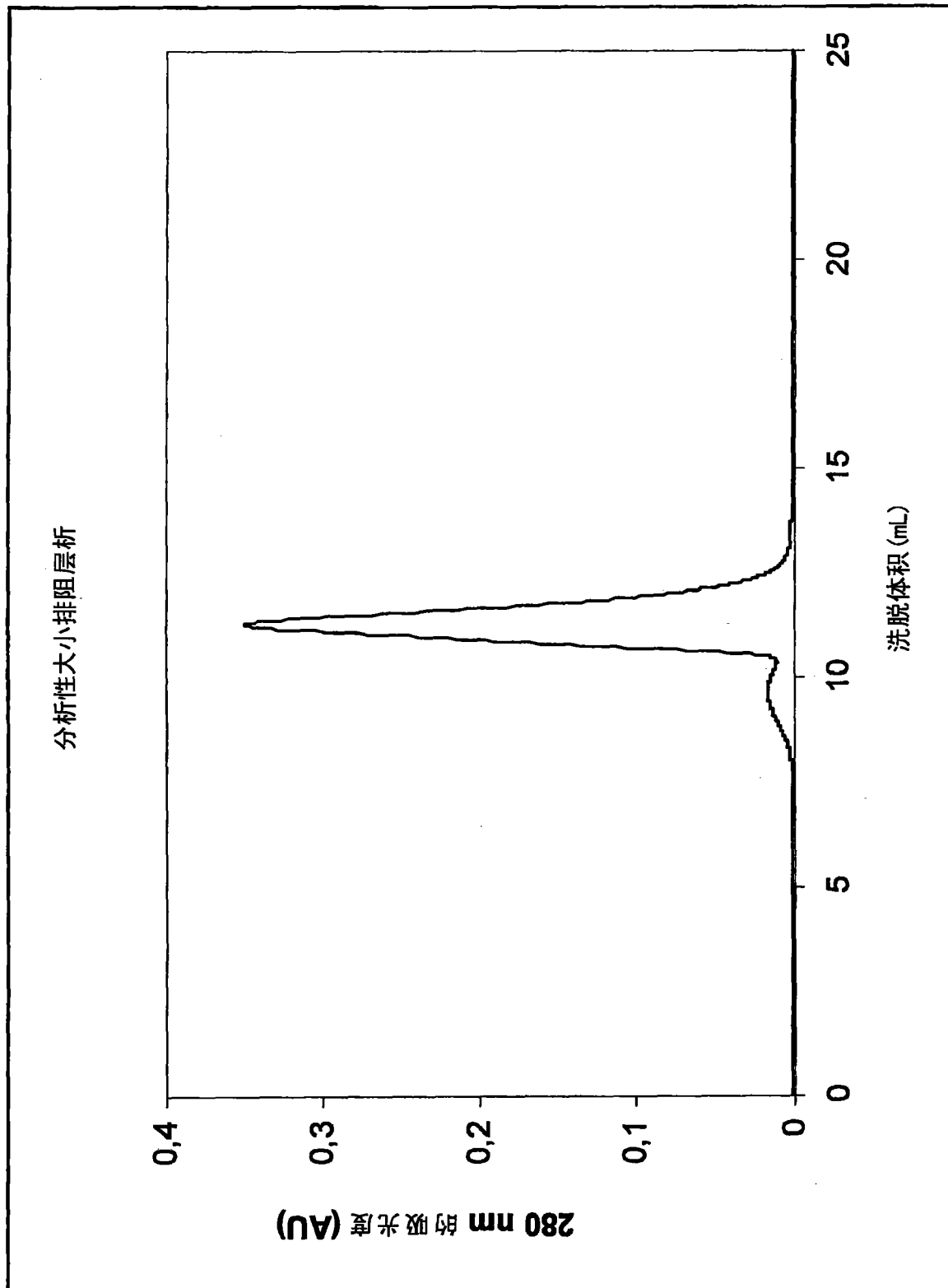


图12

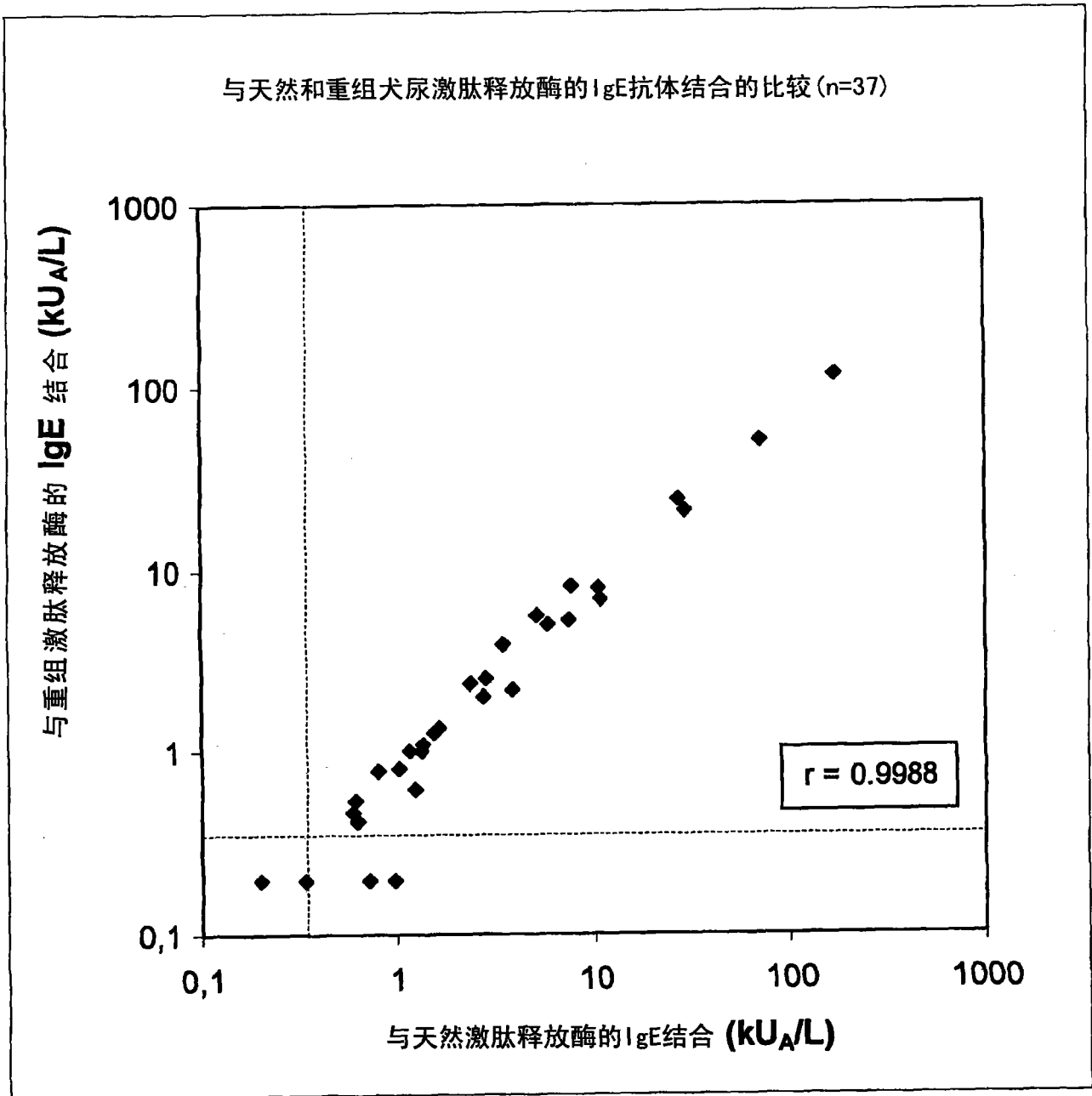


图13

专利名称(译)	新前列腺激肽释放酶过敏原		
公开(公告)号	CN101588815A	公开(公告)日	2009-11-25
申请号	CN200780047710.8	申请日	2007-12-21
申请(专利权)人(译)	法蒂亚公司		
当前申请(专利权)人(译)	法蒂亚公司		
[标]发明人	L·马特松 H·埃韦堡 J·利德霍尔姆		
发明人	L·马特松 H·埃韦堡 J·利德霍尔姆		
IPC分类号	A61K39/35 G01N33/531 A61P37/00		
CPC分类号	G01N33/573 A61K39/35 C07K16/18 G01N33/6854 G01N2333/47 G01N2333/96455		
代理人(译)	康健 林晓红		
优先权	0602804 2006-12-22 SE 60/876958 2006-12-22 US		
其他公开文献	CN101588815B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

前列腺激肽释放酶在制备用于诊断/治疗I型过敏反应具体是对犬的过敏反应的诊断组合物或药物组合物中的用途。

