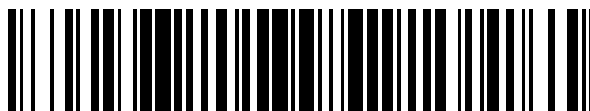


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 868**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007** **E 07861175 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 2106262**

54 Título: **Alérgeno de calicreína de próstata novedoso**

30 Prioridad:

22.12.2006 SE 0602804
22.12.2006 US 876958 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.02.2016

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)
BOX 6460
751 37 UPPSALA, SE

72 Inventor/es:

MATTSSON, LARS;
EVERBERG, HENRIK y
LIDHOLM, JONAS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 560 868 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Alérgeno de calicreína de próstata novedoso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la alergia. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de alérgenos novedosos de mamíferos y al diagnóstico y tratamiento de alergia en mamíferos.

Antecedentes

10 La caspa canina es una causa común de alergia de interior con síntomas que incluyen rinitis, conjuntivitis, inflamación bronquial y asma. Los alérgenos caninos pueden detectarse no solo en las casas donde se tienen perros como mascotas, sino también en otros lugares tales como escuelas y guarderías donde los perros no están presentes regularmente (1).

15 La alergia a los perros está acompañada por y es dependiente de la sensibilización ante proteínas liberadas del pelo y caspa caninos. En caso de sospecha de alergia a los perros, las investigaciones clínicas incluyen la valoración de la sensibilización por punción cutánea o medida de anticuerpo de IgE específico usando extracto de pelo y/o caspa caninos. Un inmunoensayo de laboratorio de IgE específica, tal como ImmunoCAP de Phadia, puede detectar la mayoría de casos de sensibilización al perro usando extracto de caspa canina natural debido a las condiciones de ensayo favorables y a una gran fase sólida disponible para el acoplamiento del alérgeno.

20 Los extractos de pelo y caspa caninos contienen una complejidad de proteínas alergénicas y no alergénicas (2, 3). Se han identificado y estudiado con detalle hasta ahora tres alérgenos caninos: Can f 1, Can f 2 y Can f 3. Can f 1, un miembro de la familia de la proteína lipocalina, con un peso molecular reseñado de 21-25 kDa, se purificó por primera vez por de Groot *et al.* (4) y más tarde se clonó y expresó como proteína recombinante (5).

El documento EP 0.377.229 da a conocer la presencia de actividad enzimática de calicreína y actividad de unión de IgE en orina canina y adelanta la teoría de que estas propiedades residen en una sola proteína denominada Can f 1. Este documento no proporciona sin embargo evidencias en apoyo de esta teoría y más tarde se encontró que Can f 1 no tiene actividad enzimática de calicreína.

25 Can f 2 pertenece a la misma familia de proteínas, pero es una proteína distinta de Can f 1 (4, 5). Can f 3, la seroalbúmina canina, es una proteína relativamente conservada que demuestra una extensa reactividad cruzada con otras albúminas de mamífero (6).

30 De los alérgenos caninos conocidos, Can f 1 es el más importante, uniéndose a anticuerpos de IgE de aproximadamente la mitad de los sujetos alérgicos a los perros (7). Aproximadamente un 20 % de los sujetos alérgicos a los perros exhiben unión de IgE a Can f 2, pero la mayoría de estos están también sensibilizados ante Can f 1. Aunque un 30-40 % de los individuos adultos alérgicos a los perros pueden mostrar unión de IgE a Can f 3 (2, 8), la relevancia clínica específica de las seroalbúminas de mamífero es incierta.

35 Se conoce desde hace mucho tiempo que los alérgenos principales relevantes para la alergia a roedores, tales como ratones y ratas, están presentes en la orina de los animales y estos se han aislado y caracterizado extensamente (9-13). Se ha reseñado también que existe actividad de unión de anticuerpo de IgE en la orina de otros animales, incluyendo gatos y perros (14), pero no se ha purificado ningún alérgeno de la orina de estos animales ni caracterizado a nivel molecular.

Sumario de la invención

40 Como se afirma anteriormente, un inmunoensayo de laboratorio para IgE específica puede detectar la mayoría de casos de sensibilización ante perros usando extracto de caspa canina natural debido a las condiciones de ensayo favorables y a una gran fase sólida disponible para el acoplamiento del alérgeno. Sin embargo, en un inmunoensayo miniaturizado o no de laboratorio, tal como una micromatriz de alérgenos o una prueba en consultorio médico, se ha encontrado que la combinación de condiciones de ensayo menos favorables, menor capacidad de unión a anticuerpo del reactivo alérgénico y un extracto de alérgeno natural de potencia limitada, causa una sensibilidad de diagnóstico insuficiente. Puede existir una situación similar también para inmunoensayos de IgE específicas de otros epitelios animales. Por tanto, existe la necesidad en algunos casos de usar proteínas alergénicas puras para conseguir suficiente sensibilidad en pruebas de diagnóstico para IgE específicas.

Además, una proporción significativa de individuos alérgicos a los perros no reacciona tampoco ante ninguno de los alérgenos caninos identificados conocidos, y esto se demostró recientemente en una población fina (7).

50 Lo anterior condujo a los presentes inventores a buscar alérgenos caninos adicionales aún no identificados. Dichos alérgenos novedosos pueden ser útiles no solo como reactivos para una sensibilidad aumentada en pruebas de diagnóstico rutinario, sino también como complemento de alérgenos caninos conocidos en diferentes tipos de aplicaciones de diagnóstico de componentes resueltos (15,16). Pueden usarse también proteínas alergénicas puras, o fragmentos y variantes de las mismas con propiedades no anafilácticas mejoradas en inmunoterapia de

componentes resueltos (16-20).

Se ha purificado por tanto un nuevo alérgeno principal de orina canina e identificado como calicreína prostática. Es en todos los aspectos distinto de los alérgenos caninos anteriormente conocidos. Adicionalmente, se ha encontrado que existe un alérgeno similar o idéntico e inmunológicamente equivalente en extracto de caspa canina. La calicreína representa una adición importante al panel de alérgenos caninos conocidos y será útil en el diagnóstico de alergia a los perros.

Se ha encontrado que la calicreína prostática existe no solo en la orina sino también en la piel de la caspa canina. Sin embargo, el hecho de que una proteína que se exprese específicamente en tejido de próstata estaría limitada a individuos macho, sugiere los perros hembra carecerían de este alérgeno. Los resultados preliminares en laboratorio apoyan de hecho esta noción y, si se corroboran mediante resultados de estudios más extensos, la implicación sería que los individuos alérgicos a los perros sensibilizados exclusivamente ante calicreína prostática pueden tolerar los perros hembra.

En un informe publicado recientemente, se demostró que la reacción de hipersensibilidad vaginal a la eyaculación estaba asociada a la sensibilización con IgE ante un antígeno específico de próstata humano, PSA, presente en el plasma seminal (21). Como la calicreína prostática canina y humana y el antígeno específico de próstata humano tienen similitud de secuencia parcial, es posible que la sensibilización ante calicreína específica de próstata canina confiera un riesgo elevado de desarrollar dichas reacciones alérgicas. Puede imaginarse también que las reacciones inmunitarias mediadas por IgE ante calicreína específica de próstata pueden desempeñar un papel en ciertos casos de infertilidad en seres humanos.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de calicreína canina en el diagnóstico de alergia de tipo I y al uso de calicreína canina para la fabricación de una composición para el diagnóstico de alergia de tipo I.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición alérgica "enriquecida" con calicreína. Dicha composición alérgica puede ser un extracto alérgico o una mezcla de componentes alérgicos purificados o recombinantes que no tienen calicreína o un bajo contenido, en la que la calicreína canina se añade para unirse a IgE de pacientes cuya IgE no se uniría o se uniría mal a los demás componentes alérgicos de la composición. Este aspecto de la invención se refiere también a un método para producir dicha composición, comprendiendo dicho método la etapa de añadir calicreína canina a una composición alérgica, tal como un extracto alérgico (opcionalmente enriquecido con otros componentes) o una mezcla de componentes alérgicos nativos o recombinantes purificados.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* para diagnosticar una alergia de tipo I en un paciente, en el que se pone en contacto una muestra de fluido corporal tal como una muestra de sangre o suero del paciente con calicreína canina o una composición según el aspecto anterior, y se detecta si la muestra del paciente contiene o no anticuerpos de IgE que se unan específicamente a calicreína canina. Dicho método de diagnóstico puede llevarse a cabo de cualquier manera conocida en la materia. La calicreína canina puede, p.ej., inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como en un inmunoensayo de laboratorio convencional, en una micromatriz o en un ensayo de flujo lateral.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit de diagnóstico para efectuar el método según el aspecto anterior, incluyendo dicho kit calicreína canina.

En los aspectos anteriormente mencionados, la molécula de calicreína canina de tipo silvestre puede reemplazarse por fragmentos o variantes de calicreína, naturales o artificiales, que compartan epítomos por anticuerpos con la calicreína de tipo silvestre, como se define a continuación.

La invención se refiere adicionalmente a un método de tratamiento de alergia de tipo I que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento una calicreína canina o una calicreína canina modificada como se explica a continuación. Este aspecto de la invención se refiere también al uso de calicreína canina en dicha inmunoterapia, incluyendo p.ej. inmunoterapia de componentes resueltos (16). En una realización de este aspecto, puede usarse la calicreína canina en su forma natural o en una forma recombinante que exhiba propiedades bioquímicas e inmunológicas similares a aquellas de la molécula natural. En otra realización, puede usarse calicreína canina en forma modificada, generalmente química o genéticamente, para anular o atenuar su capacidad de unión a anticuerpo de IgE, mientras que es preferiblemente capaz de desencadenar una respuesta de IgG en un individuo tratado. Los ejemplos de modificaciones incluyen, pero sin limitación, fragmentación, truncamiento o tandemización de la molécula, delección de un segmento o segmentos internos, sustitución de un residuo o residuos aminoácidos, redistribución de dominios o alteración al menos en parte de la estructura terciaria mediante la alteración de los puentes disulfuro o su unión a otra estructura macromolecular, o mediante la supresión de la capacidad de la proteína de unirse a iones de calcio u otros compuestos de bajo peso molecular. En aún otra realización de este aspecto, se usan como calicreína modificada las subunidades individuales de 10 kDa y/o 18 kDa de calicreína, que exhiben una actividad de unión a IgE reducida en comparación con la molécula intacta.

En todos los aspectos anteriormente mencionados de la invención, la calicreína puede derivar de cualquier perro productor de calicreína capaz de inducir una respuesta alérgica en un paciente. La calicreína puede purificarse a

partir de su fuente natural, tal como orina, saliva u otros fluidos corporales, o a partir de tejido, tal como pelo o caspa, del perro en cuestión. Puede producirse también mediante tecnología de ADN recombinante o sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos por un especialista en la materia.

La invención se refiere también a calicreína prostática canina para uso en diagnóstico y terapia, tal como diagnóstico y terapia de alergia de tipo I a perros.

Definiciones

Las calicreínas son enzimas proteolíticas de la familia de las serina endopeptidasas encontradas en sangre y orina normales. En el sistema de nomenclatura enzimática de la IUBMB, se le ha asignado a la calicreína plasmática el número EC 3.4.21.34 y a la calicreína de tejido el número EC 3.4.21.35. La calicreína urinaria de perro es una proteína heterodimérica de 28 kDa que comprende dos subunidades de aproximadamente 10±2 y 18±2 kDa, respectivamente, a las que se hace referencia con los fines de esta invención como las subunidades de 10 y 18 kDa, respectivamente. Tiene una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO: 1, nº de acceso a GenBank P09582, y se han descrito proteínas homólogas en un amplio intervalo de especies de mamíferos, incluyendo caballo, vaca, cerdo, ratón, rata y primates (p.ej. nº de acceso AAQ23713-4 (caballo), NP_001008416 (vaca), P00752 (cerdo), P00755-6 y P15947 (ratón), P36373 y P00758 (rata), Q28773 (babuino), XP_001174026 (chimpancé), Q07276 (macaco), P20151, Q07276 y AAM11874 (ser humano)).

Debería considerarse que las variantes y fragmentos de calicreína significan proteínas o péptidos con una longitud de al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 50, aún más preferiblemente al menos 75 o 100 residuos aminoacídicos, y una identidad de secuencia con dicha calicreína de al menos un 50 %, preferiblemente más de un 60, 70, 80, 90 o 95 %.

Debería considerarse en el contexto de la presente invención que una calicreína modificada significa una calicreína que se ha modificado química o genéticamente para cambiar sus propiedades inmunológicas, p.ej. como se ejemplifica anteriormente con relación al aspecto de inmunoterapia de la invención.

Debería considerarse que las variantes y fragmentos de calicreína que comparten epítomos por anticuerpos con la calicreína de tipo silvestre son aquellos fragmentos y variantes cuya unión a anticuerpos de IgE de una muestra sérica de un paciente sensibilizado ante calicreína representativo puede inhibirse significativamente por la calicreína. Dicho ensayo de inhibición puede efectuarse, p.ej., según el protocolo dado a conocer en el Ejemplo 8.

Debería considerarse que una calicreína modificada o variante o fragmento de calicreína hipoalergénico es una calicreína modificada o variante o fragmento de calicreína que no es capaz de unirse a anticuerpos de IgE reactivos con calicreína de una muestra sérica de un paciente sensibilizado ante calicreína representativo como se determina, p.ej., mediante el protocolo según el Ejemplo 3 o que no exhibe actividad alérgica biológica o significativamente reducida, como se determina mediante un ensayo de activación celular tal como el ensayo de liberación de histamina de basófilos (22, 23).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el fraccionamiento de las proteínas urinarias caninas por cromatografía de exclusión por tamaño. Se combinaron las fracciones que comprenden cada uno de los tres picos indicados en la figura (marcados 1-3) como se indica para el análisis de la actividad de unión a IgE.

La Figura 2 muestra la purificación de una proteína de unión a IgE a partir del pico 2 de la Figura 1 mediante cromatografía en fase inversa. El pico que contiene la proteína seleccionado para investigación adicional se indica por una flecha.

La Figura 3 es un análisis de PAGE-SDS de muestras reducidas (red) y no reducidas (ox) de la proteína de unión a IgE purificada a partir de orina canina mediante cromatografía de exclusión por tamaño y en fase inversa. El carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular.

La Figura 4 muestra el efecto de la calicreína como inhibidor en fase fluida de la unión de IgE específica a extracto de caspa canina inmovilizado.

La Figura 5a-b es una valoración por análisis de inmunotinción de la reactividad del anticuerpo de IgE con extracto de caspa canina en 37 sueros de sujetos alérgicos a los perros. Antes de la incubación con las tiras de membrana, se diluyeron las muestras séricas como se indica. El carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular.

La Figura 6 muestra una comparación de la intensidad de señal de inmunotransferencia de una banda de 28 kDa, corregida para dilución sérica, y del nivel de IgE específica de calicreína, como se determina por análisis ImmunoCAP experimental. Los límites de detección de ImmunoCAP e inmunotransferencia aplicados se indican por líneas sombreadas. La intensidad de señal de inmunotransferencia se expresa en unidades arbitrarias (UA).

La Figura 7 muestra la inhibición de inmunotransferencia específica de la banda de proteína de 28 kDa por calicreína urinaria canina purificada. El carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular.

La Figura 8 muestra la primera etapa de purificación de calicreína de caspa canina mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se analizó en 6 fracciones (marcadas 1-6) indicadas en la figura la actividad de unión de IgE.

La Figura 9 muestra la segunda etapa de purificación de calicreína de caspa canina mediante cromatografía en fase inversa. Se analizó en las fracciones superiores de tres picos indicados en la figura (marcados 1-3) la actividad de unión a anticuerpo de IgE.

La Figura 10 muestra un análisis de inmunotransferencia comparativo de la unión de anticuerpo de IgE específica a extracto de caspa canina, calicreína urinaria purificada y calicreína parcialmente purificada de caspa canina. Se usaron dos sueros reactivos con calicreína (nº 6 y 8) y un suero no reactivo con calicreína (nº 11). Se analizaron tanto las formas reducida como no reducida de las preparaciones alergénicas, como se indica en la leyenda. El carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular.

La Figura 11 muestra el análisis de PAGE-SDS de calicreína urinaria canina recombinante purificada.

La Figura 12 muestra el análisis por filtración en gel analítico de calicreína urinaria canina recombinante purificada.

La Figura 13 muestra una comparación de la actividad de unión a anticuerpo de IgE específica de calicreína urinaria canina natural y recombinante.

Descripción detallada de la invención

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con el aislamiento y uso de calicreína de perro. Los ejemplos son solo ilustrativos y no deberían considerarse como limitantes de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1: Detección y aislamiento de una proteína de unión a IgE de orina canina

Para investigar si la orina canina puede contener alérgenos relevantes para la alergia a los perros en seres humanos, se efectuaron los siguientes experimentos. Se recogió orina de un cruce entre husky siberiano y Vorsteh macho de 7 años. Después de filtración a través de un filtro de éster de celulosa mixto de 0,45 mm, se aplicaron 10 ml de orina a una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex 75 (XK26/100, $V_t = 505$ ml, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia) equilibrada con MOPS 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,5 M (MBS) y se efectuó la elución con el mismo tampón a un caudal de 2 ml/min. Se combinaron las fracciones de tres picos como se indica en el cromatograma mostrado en la Figura 1 y se analizó la actividad alergénica. Se inmovilizó el contenido de proteína de cada fracción en la fase sólida de ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) y se ensayó su actividad de unión a anticuerpo de IgE usando 8 sueros de individuos sensibilizados ante caspa canina. Se seleccionaron la mayoría de estos sueros por tener una alta unión de IgE a extracto de caspa canina, pero una unión relativamente baja a rCan f 1, rCan f 2 y rCan f 3. De los tres picos ensayados, se encontró que el pico 2 contiene de lejos el máximo nivel de actividad de unión a IgE (Tabla 1). La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) usando el sistema tampón NuPAGE MES (gel NuPAGE al 10 %, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de una muestra reducida del pico 2 reveló dos bandas proteicas dominantes, con pesos moleculares aparentes de aproximadamente 10 y 18 kDa, respectivamente (no mostrados).

Se efectuó la purificación de proteína adicional del conjunto correspondiente al pico 2 usando una columna de cromatografía en fase inversa (RPC) Source 15 (ST4.6/100, $V_t = 1,66$ ml, GE Healthcare Biosciences). Después de la adición de ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0,065 %, se aplicó el conjunto a la columna, seguido de lavado con 9 volúmenes de columna de TFA al 0,065 % en agua. Se efectuó la elución con un gradiente lineal de 0-45 % de acetonitrilo en agua que contiene 0,05 % de TFA, dando como resultado un pico distintivo pero algo asimétrico (Figura 2, pico indicado por una flecha). La PAGE-SDS de las muestras reducidas de fracciones que contienen este pico reveló la presencia de ambas bandas de 10 y 18 kDa, que parecen inseparables (Figura 3). Se combinaron por lo tanto las fracciones que cubren el pico completo como se indica por las barras horizontales de la Figura 2. La PAGE-SDS de una muestra no reducida de este conjunto reveló una banda adicional de 28 kDa y un ligero desplazamiento en la movilidad de las bandas de 10 y 18 kDa (Figura 3). Puede verse también una débil banda de proteína de aproximadamente 55 kDa en el estado no reducido, que puede ser un dímero de la proteína de 28 kDa. La aparición de la banda de 28 kDa en el estado no reducido sugería que esta proteína puede estar constituida por los polipéptidos de 10 y 18 kDa, unidos entre sí por uno o más puentes de cisteína. El hecho de que el análisis espectrométrico de masas lineal (datos no mostrados) mostrara posteriormente la disociación del componente de 28 kDa tras reducción y alquilación sumó evidencias adicionales a esta idea.

EJEMPLO 2: Identificación de la proteína de unión a IgE de orina canina como calicreína prostática

Se usaron la espectrometría de masas y secuenciación N-terminal para determinar la identidad de la proteína de unión a IgE aislada de orina canina.

Análisis de huella peptídica por MALDI-TOF

Para la digestión en disolución de la proteína urinaria purificada por RPC, se efectuaron la reducción y alquilación

mediante la adición secuencial a la muestra de DTT y yodoacetamida a un exceso molar de aproximadamente 45 y 100 veces, respectivamente. Se efectuó entonces la digestión con tripsina durante una noche a 37 °C, usando tripsina porcina (Trypsin Gold, pureza de espectrometría de masas, Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se situaron muestras que contenían los péptidos digeridos sobre la placa objetivo de MALDI y se añadió matriz de α -ciano en 50 % de acetonitrilo, $\text{NH}_4[\text{H}_2\text{PO}_4]$ 10 mM, 0,1% de TFA. Después de la evaporación del disolvente, se efectuó la huella peptídica (PMF) en un instrumento Bruker Daltonics Autoflex 2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para identificar las proteínas coincidentes con los resultados de PMF obtenidos, se buscó en la base de datos MSDB usando un servidor Mascot (Matrixscience, Londres, RU). Se efectuó el análisis de la descomposición después de la fuente (PSD) en péptidos seleccionados. Se efectuó la calibración externa usando un patrón de calibración peptídica (Bruker Daltonics).

Se efectuó el análisis de digestión en gel de las bandas de proteína individuales de PAGE-SDS esencialmente según Shevchenko (24). En resumen, se cortaron las bandas de 10, 18 y 28 kDa descritas en el Ejemplo 1 anterior de un gel de PAGE-SDS teñido con azul brillante de Coomassie. Se lavaron secuencialmente los trozos de gel con bicarbonato de amonio 50 mM que contenía 50 % de acetonitrilo, seguido de contracción en acetonitrilo puro. Después de la rehidratación del trozo de gel con bicarbonato de amonio 50 mM, se añadió acetonitrilo al 50 % y, después de una segunda etapa de lavado con acetonitrilo, se secaron los trozos de gel en una centrífuga a vacío. Se efectuaron la reducción y alquilación secuencialmente usando DTT 45 mM y yodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 50 mM. Después de lavados repetidos con 50 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 50 mM y un lavado final con acetonitrilo al 100 %, se secaron de nuevo las partículas de gel en una centrífuga a vacío. Se efectuó la digestión con tripsina durante una noche a 37 °C usando tripsina porcina como se describe anteriormente. Se sometió a sonicación entonces la muestra digerida y se extrajeron los péptidos de las partículas de gel con acetonitrilo al 50 % que contenía un 0,1 % de TFA. La preparación de muestra y huella peptídica se efectuaron como se describe anteriormente.

El análisis por PMF de la proteína urinaria digerida en disolución dio como resultado una coincidencia altamente significativa ($p < 0,05$) con la calicreína prostática de perro (nº de acceso P09582). El análisis por PSD de dos péptidos, de $m/z = 1224,6$ y $m/z = 1632,8$, que estaban también presentes en el análisis de digestión en gel de la banda de 18 kDa, dio coincidencias de base de datos significativas con las secuencias aminoácidas FMLCAGVLEK y SHDLMLLHLEPAK, correspondientes a los residuos 194-204 y 117-130, respectivamente, de la misma entrada de base de datos de proteínas.

Se obtuvieron resultados confirmatorios a partir del análisis de bandas de proteína digeridas en gel, ya que el PMF de la banda de 28 kDa procuró también una coincidencia de base de datos altamente significativa ($p < 0,05$) con la calicreína de perro (P09582). Surgieron evidencias adicionales de la identidad de la proteína urinaria aislada del análisis de las muestras digeridas en gel de la banda de 10 kDa, el análisis de PSD del péptido de $m/z = 1004,6$ dio una coincidencia de base de datos altamente significativa ($p < 0,05$) con la secuencia aminoácida SFIHPLYK, correspondiente a los residuos 95-102 de P09582.

Secuenciación N-terminal de aminoácidos

Para la secuenciación N-terminal, se cortaron las bandas de proteínas de 10 y 18 kDa reducidas separadamente de un gel de PAGE-SDS y se extrajeron con HCl-guanidinio 6M, Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, usando una varilla de plástico para homogeneización. El análisis de secuencia N-terminal de las bandas extraídas de 10 y 18 kDa, efectuado usando un instrumento Hewlett-Packard G1000A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), procuró las secuencias aminoácidas IIGGREXLKN y AVIRPGEDRS, respectivamente, que se encontró que coincidían con los residuos 25-34 y 108-117 en la secuencia precursora de calicreína prostática canina de nº de acceso P09582.

Tomados en conjunto, los resultados descritos en este ejemplo demuestran que el constituyente principal de la proteína urinaria canina purificada, correspondiente a las bandas de 10 y 18 kDa en análisis de PAGE-SDS reductor, es idéntico a la calicreína prostática de perro. Adicionalmente, las observaciones sugieren que se forman polipéptidos de 10 y 18 kDa mediante escisión postraducciona del producto génico primario y se mantienen juntos por puentes disulfuro, formando la proteína de 28 kDa vista en condiciones no reductoras, similar a lo descrito anteriormente para calicreína humana (25).

La calicreína prostática es también conocida como arginina esterasa y lleva esa denominación en las entradas de base de datos que describen secuencias aminoácidas idénticas o casi idénticas, incluyendo NP_001003284, CAA68720 y AAA30831. Adicionalmente, se observa que se ha identificado otra variante de calicreína, expresada en tejidos renal, pancreático y de glándula salivar, en perro (nº de acceso CAA53210) y comparte un 68 % de identidad aminoácida con la calicreína prostática.

EJEMPLO 3: Valoración de la actividad de unión a IgE de calicreína, rCan f1, rCan f2 y rCan f3

Se examinó la actividad de unión a IgE *in vitro* de alérgenos caninos recombinantes y naturales purificados usando ImmunoCAP® (Phadia, Uppsala, Suecia), un sistema de inmunoensayo usado para la medida de anticuerpo de IgE específico en el diagnóstico clínico de alergia atópica. Se clonaron Can f 1 y Can f 2 recombinantes (5) y se expresaron en *E. coli* esencialmente como se ha descrito (26). Se purificó albúmina canina a partir de suero usando

cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad con Blue Sepharose, esencialmente como se ha descrito (27). Se prepararon pruebas de ImmunoCAP experimentales y se usaron para análisis sérico como se ha descrito (26).

Se usaron en el estudio sueros de 37 pacientes alérgicos a los perros de Suecia (n= 9), España (n= 23) y América del Norte (n= 4). Todos los pacientes tenían la prueba de punción positiva de extracto de caspa canina y un diagnóstico médico de alergia a los perros con síntomas de asma, rinoconjuntivitis y/o urticaria. Todos los sueros tenían una prueba de IgE específica positiva (ImmunoCAP) de extracto de caspa canina.

Se muestran en la Tabla 2 los niveles de IgE específica ante extracto de caspa canina, rCan f 1, rCan f 2, rCan f 3 y calicreína purificada y se muestra en la Tabla 3 un resumen de los resultados. De los sueros ensayados, 29 mostraron reactividad de IgE por calicreína y 18 por rCan f 1. Tanto rCan f 2 como rCan f 3 aparecieron como alérgenos minoritarios entre los sujetos ensayados, uniéndose a IgE de solo 8 y 6 de 37, respectivamente. 14 de los 37 sueros (38 %) reaccionaron solo ante calicreína. De media entre los sueros reactivos ante calicreína, el nivel de unión de IgE a calicreína ascendía a un 64 % de la unión de IgE a caspa canina. Los correspondientes niveles relativos de unión de IgE a rCan f 1, rCan f 2 y rCan f 3 eran de un 45, 25 y 47 %, respectivamente, entre los sueros específicamente reactivos ante estos alérgenos. Solo 2 de los 37 sueros ensayados carecían de reactividad de IgE ante los 4 alérgenos caninos. La unión de IgE a calicreína no mostró correlación con ninguno de los otros alérgenos caninos, demostrando que la respuesta inmunitaria ante calicreína es una variable independiente y no el resultado de reactividad cruzada con Can f 1, Can f 2 o Can f 3.

Los resultados obtenidos demostraron claramente que la calicreína prostática de perro es un alérgeno principal y único entre los sujetos alérgicos a los perros estudiados aquí. Tanto por la prevalencia como por la magnitud de la unión a IgE, se encontró que la calicreína era el alérgeno canino más importante descrito hasta ahora, y entre los sujetos estudiados más de un tercio reaccionaron ante calicreína pero ante ninguno de los demás alérgenos ensayados.

EJEMPLO 4: Demostración de la actividad de unión de anticuerpo de IgE específico de calicreína en extracto de caspa canina

Se efectuó un experimento de inhibición de IgE para examinar si la caspa canina contiene epítomos capaces de unirse a anticuerpos de IgE reactivos con calicreína. Se incubaron en primer lugar durante 2 h a temperatura ambiente muestras séricas de 3 sujetos sensibilizados ante perros (A-C) con reactividad de IgE ante calicreína con calicreína purificada a una concentración final de 100 µg/ml y, en paralelo como controles negativos, con diluyente sérico o proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* no alergénica. Se analizó entonces en todas las muestras por duplicado la unión de IgE a pruebas ImmunoCAP portadoras de extracto de caspa canina para estudiar si la preincubación con calicreína evitaría específicamente la unión de IgE a proteína de caspa conectada a la fase sólida. Como control para la especificidad de calicreína como inhibidor, se incluyó un suero de un sujeto (D) sensibilizado ante Can f 1 y Can f 2 pero no calicreína, junto todos los demás sueros del experimento.

Se muestran en la Figura 4 los resultados del experimento de inhibición. Se encontró que la calicreína purificada de orina canina inhibía completamente la unión de IgE a caspa canina de 2 (A y B) de los tres sueros reactivos con calicreína y parcialmente la unión del tercer suero (C), que era conocido por ser también reactivo con otros alérgenos caninos. La proteína de control negativo, MBP, no mostró un efecto inhibidor significativo en comparación con el diluyente sérico. Además, no se observó inhibición por calicreína en la unión de IgE del suero reactivo con Can f 1 y Can f 2 (D).

Los resultados demostraron que están presentes en la caspa canina estructuras epitópicas capaces de unirse a anticuerpos de IgE reactivos con calicreína y, por ello, no están confinadas a la orina.

EJEMPLO 5: Valoración de la unión de IgE a proteína de 28 kDa similar a calicreína de extracto de caspa canina usando análisis de inmunotransferencia

Con el objetivo de identificar una proteína presente en caspa canina a la que puede atribuirse la actividad alérgica similar a calicreína observada, se usaron 37 sueros con niveles conocidos de IgE reactiva con calicreína en un experimento de inmunotransferencia. Se efectuó el análisis de inmunotransferencia en extracto de caspa canina no reducido separado por PAGE-SDS (gel Excel 2-D al 12,5 %, GE Healthcare Biosciences) y se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare Biosciences). Se bloquearon las transferencias de proteína durante 1 h a temperatura ambiente usando tampón de bloqueo (fosfato 50 mM, pH 7,4, 0,1 % (v/v) de Tween-20, 0,9 % (p/v) de NaCl, 0,3% (p/v) de dextrano T10) y se incubaron entonces durante una noche con el suero de cada paciente, diluido 1,5 a 20 veces en tampón de bloqueo. Se indica en la Figura 5 el factor de dilución para cada suero entre paréntesis sobre sus correspondientes tiras de membrana. Después de lavar con tampón de bloqueo con 0,5 % (v/v) de Tween-20, se incubó la membrana durante 4 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de IgE anti-humano marcado con ¹²⁵I en tampón de bloqueo y se detectó entonces radiográficamente la IgE unida usando una pantalla de fósforo de almacenamiento y un Variable Mode Imager, Typhoon 9410 (GE Healthcare Biosciences).

Se muestran los resultados del experimento en la Figura 5a-b. De los 37 sueros usados, 30 mostraron unión de IgE a una proteína de 28 kDa, mientras que 21 mostraron unión de IgE a una banda de 23 kDa, correspondiente a Can f

1 y/o posiblemente Can f 2. Se cuantificaron las intensidades de señal de inmunotransferencia usando el software Phoretix 1D (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tyne, RU). Se calculó el nivel de reactividad de IgE en cada suero por bandas individuales multiplicando la intensidad de señal por el factor de dilución sérica. La Figura 6 muestra una comparación del nivel de unión de IgE con la banda de 28 kDa en análisis de inmunotransferencia y las medidas de ImmunoCAP de calicreína descritas en el Ejemplo 3 anterior, revelando una estrecha correlación.

Para examinar directamente la relación entre calicreína urinaria y la banda de 28 kDa en caspa canina, se efectuó un experimento de inhibición de inmunotransferencia. Se preincubó un suero monorreactivo con la banda de 28 kDa durante 2 h a temperatura ambiente con calicreína urinaria purificada o rCan f 1, ambas a una concentración final de 100 µg/ml, o con diluyente sérico. Se sometieron entonces tiras de membrana portadoras de extracto de caspa canina no reducida inmunotransferida a las muestras de suero preincubadas y se analizó la unión de IgE como se describe anteriormente. El experimento reveló que la unión de IgE a la banda de 28 kDa en caspa canina se anulaba completamente por preincubación sérica con calicreína, mientras que permanecía intacta por preincubación tanto con rCan f 1 como con tampón solo (Figura 7).

Tomados en conjunto, los resultados descritos en este ejemplo demostraban la presencia en extracto de caspa canina de una proteína que exhibe una estrecha similitud electroforética e inmunológica con la calicreína urinaria.

EJEMPLO 6: Purificación parcial e identificación de calicreína en caspa canina

Se purificó la proteína similar a calicreína de caspa canina por SEC y RPC para identificación bioquímica. Se extrajeron 3 g de caspa canina (Allergon, Välinge, Suecia) en 100 ml de MBS mediante rotación con inversión durante 3 h a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 20.000 x g y concentrar usando un filtro Amicon (PM-10, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), se aplicó el extracto a una columna XK50/100 Superdex 75 (GE Healthcare Biosciences) y se eluyó usando MBS (Figura 8). Se combinaron fracciones de 6 picos (indicados 1-6 en la Figura 8) y se analizó la actividad alérgica. Se inmovilizó el contenido de proteína de cada fracción sobre la fase sólida de ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) y se ensayó su actividad de unión a anticuerpo de IgE usando 8 sueros de individuos sensibilizados ante caspa canina, como se indica en la Tabla 4. La mayoría de estos sueros se seleccionaron por tener una alta unión de IgE a extracto de caspa canina, pero una unión relativamente baja a cualquiera de rCan f 1, rCan f 2 y nCan f 3. A partir de la Tabla 4 es evidente que el pico 3 de la separación de SEC contenía el nivel máximo de actividad de unión a IgE de los 6 picos ensayados. Se seleccionó este conjunto para purificación adicional.

Después de añadir TFA a una concentración final de 0,065 %, se aplicó el conjunto a una columna ST4.6/100 Source 15 RPC (GE Healthcare Biosciences) y se efectuó la elución usando un gradiente lineal de 0-54 % de acetonitrilo en agua que contiene un 0,05 % de TFA (Figura 8). Se efectuó el análisis de la reactividad alérgica de los tres picos indicados en la Figura 9 usando 5 sueros, seleccionados por los criterios descritos anteriormente. Los resultados del análisis (Tabla 5) mostraron claramente que el pico 1 contenía el nivel máximo de unión a anticuerpo de IgE. El análisis por PAGE-SDS reductora de este pico reveló la presencia de bandas de proteína de 10, 18 y 23 kDa (no mostradas).

Se cortaron las tres bandas presentes en el pico 1 del gel y se sometieron a digestión en gel y análisis espectrométrico de masas como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Mientras que la banda de 23 kDa se identificó como Can f 1, ambas bandas de 10 y 18 kDa se identificaron como calicreína prostática canina (nº de acceso P09582) después del análisis por PSD de los péptidos seleccionados de m/z= 1004,52 y m/z= 1632,98, respectivamente.

Adicionalmente, se eluyeron las dos bandas de 10 y 18 kDa de bandas de gel cortadas y se sometieron a secuenciación aminoacídica N-terminal. Las secuencias resultantes, xIGGRExLKN y AVxRPGEDRx, en que "x" representa residuos no resueltos, coincidían con los residuos 25-34 y 108-117 de la secuencia precursora de calicreína prostática canina, nº de acceso P09582.

Los resultados descritos en este ejemplo demostraban que está presente en caspa canina una proteína con una estructura primaria idéntica o estrechamente relacionada con la calicreína prostática.

EJEMPLO 7: Reactividad similar de anticuerpo de IgE ante calicreína de caspa y orina caninas

Para comparar la actividad de unión a anticuerpo de IgE de calicreína de orina y caspa caninas, se usaron dos sueros reactivos con calicreína (sueros nº 6 y 8 de la Tabla 2) y un suero no reactivo con calicreína (nº 11) en análisis de inmunotransferencia de muestras no reducidas de extracto de caspa canina, calicreína urinaria purificada y calicreína parcialmente purificada de caspa canina (Figura 10). Los dos sueros reactivos con calicreína exhibían unión de IgE a una banda de 28 kDa en las tres preparaciones, indicando que la unión de IgE a 28 kDa en extracto de caspa canina es debida a la calicreína. Además, resultaba evidente que la reactividad dominante de la banda de 28 kDa en calicreína urinaria purificada coincidía con las bandas de proteína teñidas con Coomassie de la misma preparación. La unión de IgE a una banda de aproximadamente 55 kDa en las preparaciones de calicreína no reducida es concordante con la idea del Ejemplo 1 anterior de un presunto dímero de calicreína. El suero que era no reactivo con calicreína según ImmunoCAP no mostró unión de IgE a la banda de 28 kDa en ninguna de las tres preparaciones alérgicas analizadas.

La reactividad de inmunotransferencia con muestras que contienen calicreína reducidas era considerablemente menor que con muestras no reducidas. Solo la preparación de calicreína urinaria purificada, que tenía una mayor concentración de calicreína que las otras preparaciones analizadas, dio lugar a una unión de IgE detectable a la banda de 18 kDa formada tras la reducción.

- 5 La observación de que la reactividad inmunitaria con calicreína urinaria purificada en análisis de inmunotransferencia estaba dirigida hacia la banda de proteína principal de 28 kDa servía para apoyar la validez de la prueba de ImmunoCAP de calicreína experimental, porque su unión a IgE no estaba causada por un contaminante de la preparación de proteína usada. Los resultados muestran adicionalmente que al menos algunos epítomos de unión a IgE en calicreína son sensibles a la reducción de la molécula, como se indica por la menor unión de anticuerpo a las subunidades de 10 y 18 kDa, en comparación con la molécula de 28 kDa no reducida.

EJEMPLO 8: Valoración de las propiedades de unión a IgE de una calicreína modificada o una variante o fragmento de calicreína (analito)

- 15 Se inmoviliza el analito en un soporte sólido tal como ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia). Se incuban muestras séricas de al menos 3 pacientes humanos representativos sensibilizados ante la especie relevante y que muestran reactividad de IgE con calicreína de esa especie durante 3 h a temperatura ambiente con calicreína a una concentración final de 100 µg/ml y, en paralelo como controles negativos, con tampón solo y la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* no alergénica. Se analiza entonces en las muestras la unión de IgE a pruebas de ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) portadoras de analito inmovilizado para estudiar si la preincubación con calicreína inhibe específicamente o reduce significativamente la unión de IgE.

EJEMPLO 9: Purificación de calicreína de orina canina por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

- 20 Se filtró una muestra combinada de orina canina a través de un filtro de 5 µm y un filtro de 0,45 µm bajo presión de nitrógeno. Se efectuaron todas las operaciones cromatográficas con un sistema ÄKTA Explorer 100 Air (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia). Se intercambió el tampón de 4 alícuotas de 120 ml de orina canina filtrada usando una columna Sephadex G-25 (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia) (volumen de columna 25 461 ml), con limpieza de la columna después de cada tanda. Tampón usado: fosfato de sodio 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 M, 0,02 % de NaN₃, pH= 7. Se filtró entonces la muestra (aproximadamente 505 ml) a través de un filtro de 0,45 µm y se aplicó a la columna de HIC (HiPrep Phenyl FF (high sub), 20 ml, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia). Los tampones usados para la separación por HIC fueron: A) fosfato de sodio 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 M, 0,02 % de NaN₃, pH= 7, y B) fosfato de sodio 50 mM, 0,02 % de NaN₃, pH= 7. Se recogió la fracción de circulación (que 30 contiene calicreína) en fracciones de 10 ml (Frac 950) a un caudal de 5 ml/min y se combinaron entonces las fracciones de circulación. Se eluyó el material adsorbido en un gradiente por etapas usando 100 % de tampón B.

Se analizaron las fracciones usando un ensayo de BCA (ácido bicinonínico), así como PAGE-SDS (muestras no reducidas, tinción con plata). La PAGE-SDS en condiciones no reductoras reveló que la calicreína se encontraba en las fracciones de circulación, que por tanto se combinaron para procesamiento adicional.

- 35 Se intercambió el tampón de 2 alícuotas de aproximadamente 125 ml y 1 alícuota de aproximadamente 87 ml de las fracciones de circulación de HIC combinadas con una columna Sephadex G-25 SF (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia) por un tampón de composición fosfato de sodio 20 mM, 0,02 % de NaN₃, pH= 8. Se concentró entonces el conjunto de calicreína (456 ml) en una celda Amicon (350 ml, filtro Millipore, PBCC, corte de 5000 kDa, diámetro 76 mm) hasta un volumen de aproximadamente 43 ml. Usando el ensayo de BCA, se determinó que la 40 concentración de proteína en el conjunto final era de 0,9 mg/ml (en 43 ml= en total a 38,7 mg). La muestra aplicada a la columna de HIC contenía 101 mg de proteína, lo que procuraba una recuperación del 38 % de la calicreína después de la purificación por HIC.

- 45 Se valoró la pureza de la preparación de calicreína mediante filtración en gel analítica en una columna Superdex 75 HR 10/30 en un sistema XT10 purificador de ÄKTA. Para este experimento, el volumen de muestra era de 100 µl y el tampón era fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, 0,02 % de NaN₃, pH= 7,4.

EJEMPLO 10: Identificación y caracterización de calicreína de orina canina mediante el uso de electroforesis y espectrometría de masas

Usando electroforesis, se compararon las siguientes muestras en el mismo gel, aplicando tinción con azul brillante de Coomassie coloidal (CBB):

- 50 1. Un patrón marcador de peso molecular
2. Orina canina
3. Material eluido por HIC (reducido)
4. Fracción de circulación de HIC (reducida)
5. Fracción de circulación de HIC (no reducida)

6. Material eluido por HIC (no reducido)

Para las muestras 2, 3 y 6, se detectó un gran número de proteínas. Sin embargo, en la muestra 4 (fracción de circulación de HIC reducida) pudieron verse solo dos bandas principales. Se encontró más tarde, mediante el uso de análisis de MALDI-TOF (TOF) (véase a continuación), que estas dos bandas correspondían a dos variantes diferentes de la proteína calicreína (como resultado de la proteólisis en R107 debida a la actividad arginina esterasa). En la muestra 5 (fracción de circulación de HIC no reducida), se detectaron 7 bandas distintas, y se encontró que todas las bandas correspondían a diferentes variantes de la proteína calicreína mediante el uso de análisis MALDI-TOF (TOF) (véase a continuación). La calicreína comprende 12 residuos de cisteína, por lo tanto es posible la formación de diferentes variantes en condiciones no reductoras debido a la formación de puentes de cisteína-cisteína. Por tanto, es probable que ocurra la formación de, por ejemplo, dímeros, trímeros, etc. en condiciones no reductoras.

Condiciones de PAGE-SDS, digestión con tripsina y análisis MALDI-TOF-TOF:

Se prepararon muestras diluidas usando un kit de limpieza de PAGE-SDS según el procedimiento recomendado en el manual del suministrador (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se procesaron los geles en tampón MES a 200 V durante 35 minutos. Se procesaron las muestras reducidas y no reducidas en montajes separados. Se realizó la tinción durante una noche con CBB coloidal (se realizó más tarde la destinción usando inmersión en agua durante aproximadamente 5 horas). Se sacaron manualmente las muestras del gel usando una punta de pipeta y se trataron según un protocolo estándar (usando etanol en lugar de acetonitrilo), se incubaron con tripsina 12,5 ng/μl durante una noche a 37 °C. Se aplicaron 0,5 μl de las muestras digeridas a la placa objetivo del sistema MALDI y se mezclaron con 0,5 μl de solución matriz de MALDI (solución saturada de HCCA en 50 % de acetonitrilo y 0,1 % de TFA). Se analizaron todas las muestras usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para identificar las proteínas que coinciden con los resultados de PMF obtenidos, se buscó en la base de datos MSDB usando un servidor Mascot (Matrixscience, Londres, RU). Se efectuó el análisis de EM-EM en péptidos seleccionados. Se efectuó la calibración externa usando un patrón de calibración de péptidos (Bruker Daltonics). Se procesaron las búsquedas de base de datos usando los siguientes criterios de búsqueda:

Taxonomía: mamíferos

Tolerancia de masa: 100 ppm

Se permiten metioninas oxidadas y 1 escisión faltante

Secuencia de calicreína de la base de datos:

MWFLALCLAMSLGWTGAEPHFQPRIIGGRECLKNSQPWQVAVYHNGEFACGGVLV
NPEWVLTAAH**CANSNCEVWLGR**HNLSESEDEGQLVQVRK**SFIHPLYKTKVPR**-----
-

AVIRPGEDRSHDLMLLHLEEPAKITKAVRVMDLPKKEPPLGSTCYVSGWGSTD PETI
FHPGSLQCVDLKLLSNNQCAKVYTQKVTK**FMLCAGVLEGK**KDTCCKGDSGGPLICD
GELVGITSWGATPCGKPQMPSLYTR**VMPHLMWIKDTMKANT** (SEQ ID NO: 1)

(Secuencias peptídicas identificadas por MALDI-TOF (TOF) y EM(EM) en cursiva).

EJEMPLO 11: Clonación, purificación y valoración de la actividad de unión a IgE de calicreína canina recombinante expresada en *Pichia pastoris*

Para verificar la identificación e importancia de la calicreína urinaria como alérgeno canino, se produjo la proteína en forma de un alérgeno recombinante usando *Pichia pastoris* como hospedador de expresión, se purificó y se analizó la actividad de unión a anticuerpo de IgE.

Preparación de un constructo génico sintético que codifica calicreína urinaria canina

Se diseñó un gen de calicreína urinaria canina sintética mediante retrotraducción a secuencia nucleotídica de la parte de la secuencia aminoacídica reseñada de arginina esterasa prostática canina (calicreína urinaria, nº acc. P09582) correspondiente a la proteína madura. Se diseñó la secuencia nucleotídica para un uso de codón óptimo y se ajustó al mismo tiempo para minimizar estructuras secundarias y eliminar o añadir sitios de enzima de restricción como se desee. Se obtuvieron y ensamblaron los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de codificación final y se amplificó el gen sintético completo por PCR y se clonó en los sitios *XhoI* y *SalI* del vector pPICZ A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), añadiendo un marcaje de hexahistidina C-terminal para posibilitar la purificación de proteína por cromatografía de afinidad iónica por metal inmovilizado (IMAC). Se linealizó el constructo de ADN

plasmídico mediante digestión con Sac I y se transformó en la cepa X-33 de *P. pastoris* para recombinación homóloga en el locus cromosómico AOXI.

Expresión y purificación de calicreína canina recombinante 2

- 5 Se produjo la proteína recombinante en la cepa X-33 de *Pichia pastoris* (Invitrogen) usando un biorreactor de 7 l (Belach Bioteknik, Solna, Suecia). Se usó un medio de caldo rico (peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, base nitrogenada de levadura 3,4 g/l, sulfato de amonio 10 g/l, biotina 0,4 mg/l y fosfato de potasio 0,1 M) y se llevó a cabo el cultivo a 30 °C. Se indujo la expresión y se mantuvo alimentando metanol al cultivo hasta una concentración en estado estacionario de 0,1 % (v/v). Después de 70 h de fermentación, se recolectó el cultivo por centrifugación a 10.000 g durante 10 min a +4 °C y se recuperó el sobrenadante para purificación de proteína.
- 10 Se acondicionó el sobrenadante para purificación añadiendo imidazol 5 mM y NaCl 0,15 M y ajustando el pH a 7,2 usando una base o bases Tris antes de aplicar a una columna quelante Streamline 25 (GE Healthcare Biosciences) cargada con NiSO₄ según la recomendación del fabricante. Después de cargar, se lavó la columna en etapas separadas con imidazol 20 mM y 60 mM y se eluyó entonces la proteína recombinante con imidazol 500 mM, todos en un tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y NaCl 0,15 M.
- 15 Se efectuó la purificación adicional de la proteína recombinante usando cromatografía de intercambio catiónico. Se identificaron las fracciones de IMAC que contenían calicreína recombinante por PAGE-SDS, se combinaron y se diluyeron con 2 volúmenes de MES 20 mM a pH 6,0. Después de ajustar el pH a 6,0, se aplicó el conjunto diluido a una columna XK26/100 SP Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Se lavó entonces la columna con 2 volúmenes de columna de NaCl 0,15 M en MES 20 mM a pH 6,0 y se eluyó la proteína recombinante con NaCl 0,30 M en el mismo tampón. Se determinó la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm, usando un coeficiente de extinción calculado de 1,46 por mg/ml.

25 Aunque el constructo génico de calicreína sintético se diseñó para dirigir la producción de una sola cadena polipeptídica, se encontró que la proteína purificada a partir del medio de cultivo ha experimentado una escisión parcial en cadenas de 18 y 12 kDa (Fig. 11), similar al procesamiento de la calicreína urinaria natural. Es más, la secuenciación N-terminal reveló que la calicreína recombinante se había escindido en la misma posición que la molécula natural (datos no mostrados).

30 Para valorar el estado de agregación e integridad de la proteína recombinante en condiciones fisiológicas, se sometió una muestra de la preparación a cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Como se muestra en la Figura 12, el cromatograma estaba dominado por un solo pico simétrico, correspondiente al peso molecular de 34 kDa como se define por el kit de calibración LMW (GE Healthcare Biosciences). El análisis demostró que la proteína recombinante, a pesar de su procesamiento parcial, se mantenía en solución y existía en un estado de agregación homogéneo lo más probablemente monomérico.

Actividad de unión a IgE de calicreína recombinante

35 Se valoró la actividad inmunológica de la calicreína recombinante producida en comparación con la proteína natural purificada de orina canina. Se inmovilizaron las dos proteínas separadamente en la fase sólida de ImmunoCAP® y se examinó su capacidad de unión a IgE *in vitro* usando las 37 muestras de suero de sujetos alérgicos a los perros descritas en el Ejemplo 3 anterior.

40 Como puede verse en la Figura 13, los dos conjuntos de datos mostraban una correlación muy fuerte ($r=0,9988$), demostrando que la calicreína recombinante producida se parecía estrechamente a la calicreína urinaria natural con respecto a la unión a anticuerpo de IgE. Partiendo de la completa ausencia de cualquier otra proteína derivada de perro en la preparación de proteína recombinante, puede observarse adicionalmente que los resultados eliminan cualquier posible duda en cuanto a la identidad del componente activo de las preparaciones de calicreína natural descritas en los ejemplos anteriores.

Referencias

- 45 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.
- 50 3. Spitzauer S. "Allergy to mammalian proteins: At the borderline between foreign and self?" [Revisión]. 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.
- 5 6. Boutin Y, Hebert H, Vrancken ER, Mourad W. "Allergenicity and crossreactivity of cat and dog allergenic extracts". Clinical Allergy 1988; 18: 287-293.
7. Saarelainen S, Taivainen A, Rytönen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantylä 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.
- 10 8. Cabanas R, López-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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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?" [Revisión]. Clinical & Experimental Allergy 2004; 34: 332-339.
- 45 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, Rooyakkers 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Phadia AB
Mattsson, Lars Everberg, Henrik
Lidholm, Jonas

5 <120> Alérgeno novedoso

<130> P07 62 9/HAM

<150> SE0602084-7

<151> 2006-12-22

10 <150> US60/87 6958
<151> 2006-12-22

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1 <211> 260

<212> PRT

15 <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

ES 2 560 868 T3

	130		135		140												
	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Thr	Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Thr	Asp	
	145					150					155					160	
	Pro	Glu	Thr	Ile	Phe	His	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Cys	Val	Asp	Leu	Lys	
					165					170					175		
5	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					
10	Ile	Thr	Ser	Trp	Gly	Ala	Thr	Pro	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Met	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
	Leu	Tyr	Thr	Arg	Val	Met	Pro	His	Leu	Met	Trp	Ile	Lys	Asp	Thr	Met	
					245					250					255		
	Lys	Ala	Asn	Thr													
				260													

15

REIVINDICACIONES

1. Uso de calicreína canina, o una variante o fragmento de la misma que comparte epítomos por anticuerpos con la calicreína de tipo silvestre, para el diagnóstico *in vitro* de alergia de tipo I.
2. Uso de calicreína según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha calicreína se purifica a partir de un perro o se produce recombinantemente.
3. Uso de calicreína según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque dicha calicreína es calicreína prostática.
4. Uso de calicreína según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque dicha calicreína tiene una secuencia aminoacídica según los aminoácidos 25-260 de SEQ ID NO: 1.
5. Método para producir una composición alérgica, que comprende la etapa de añadir una calicreína canina, o una variante o fragmento de la misma que comparte epítomos por anticuerpos con la calicreína de tipo silvestre, a una composición que comprende un extracto alérgico y/o al menos un componente alérgico purificado, en el que la composición que comprende un extracto alérgico y/o al menos un componente alérgico purificado no tiene calicreína o un bajo contenido antes de la adición de la calicreína canina.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha calicreína canina es calicreína canina prostática con una secuencia aminoacídica según los aminoácidos 25-260 de SEQ ID NO: 1.
7. Método para el diagnóstico *in vitro* de alergia de tipo I que comprende las etapas de
 - poner en contacto una muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina de un paciente sospechoso de tener alergia de tipo I con calicreína canina, o una variante o fragmento de la misma que tiene propiedades de unión de IgE similares; y
 - detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos de IgE que se unen específicamente a dicha calicreína canina,en el que la presencia de dichos anticuerpos de IgE que se unen específicamente a dicha calicreína canina es indicativa de alergia de tipo I.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque dicha calicreína se purifica a partir de un perro o se produce recombinantemente.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, caracterizado porque dicha calicreína es calicreína prostática.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, caracterizado porque dicha calicreína tiene una secuencia aminoacídica según los aminoácidos 25-260 de SEQ ID NO: 1.
11. Calicreína canina, o la subunidad de 10 kDa o la subunidad de 18 kDa de la misma, para uso en tratamiento de inmunoterapia de alergia de tipo I en un mamífero susceptible de dicho tratamiento.
12. Calicreína canina o una subunidad de la misma para uso según la reivindicación 11, en la que dicho mamífero se selecciona preferiblemente del grupo consistente en primates, incluyendo seres humanos, gato, caballo, vaca, cerdo, rata o ratón.

Figura 1

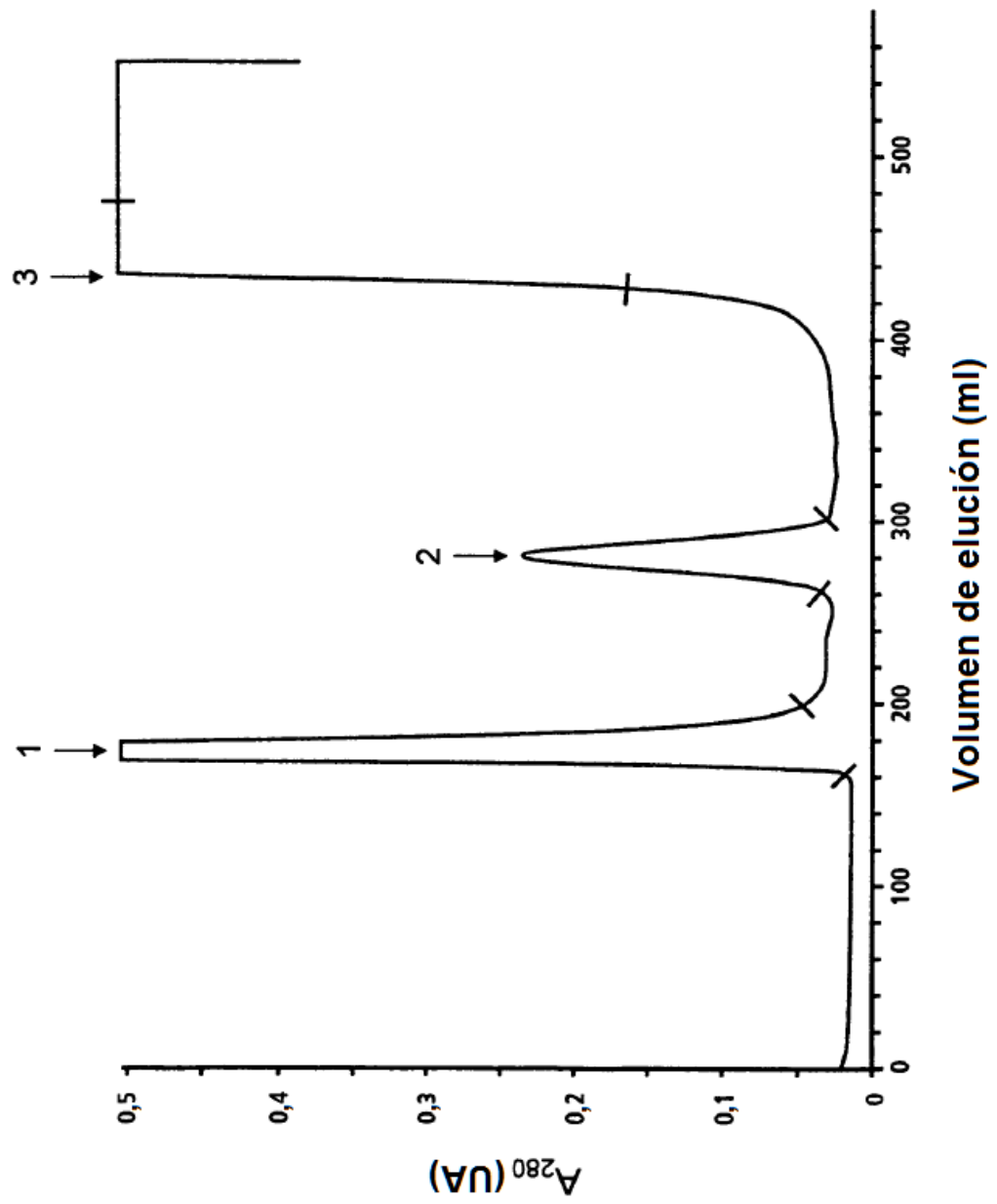


Figura 2

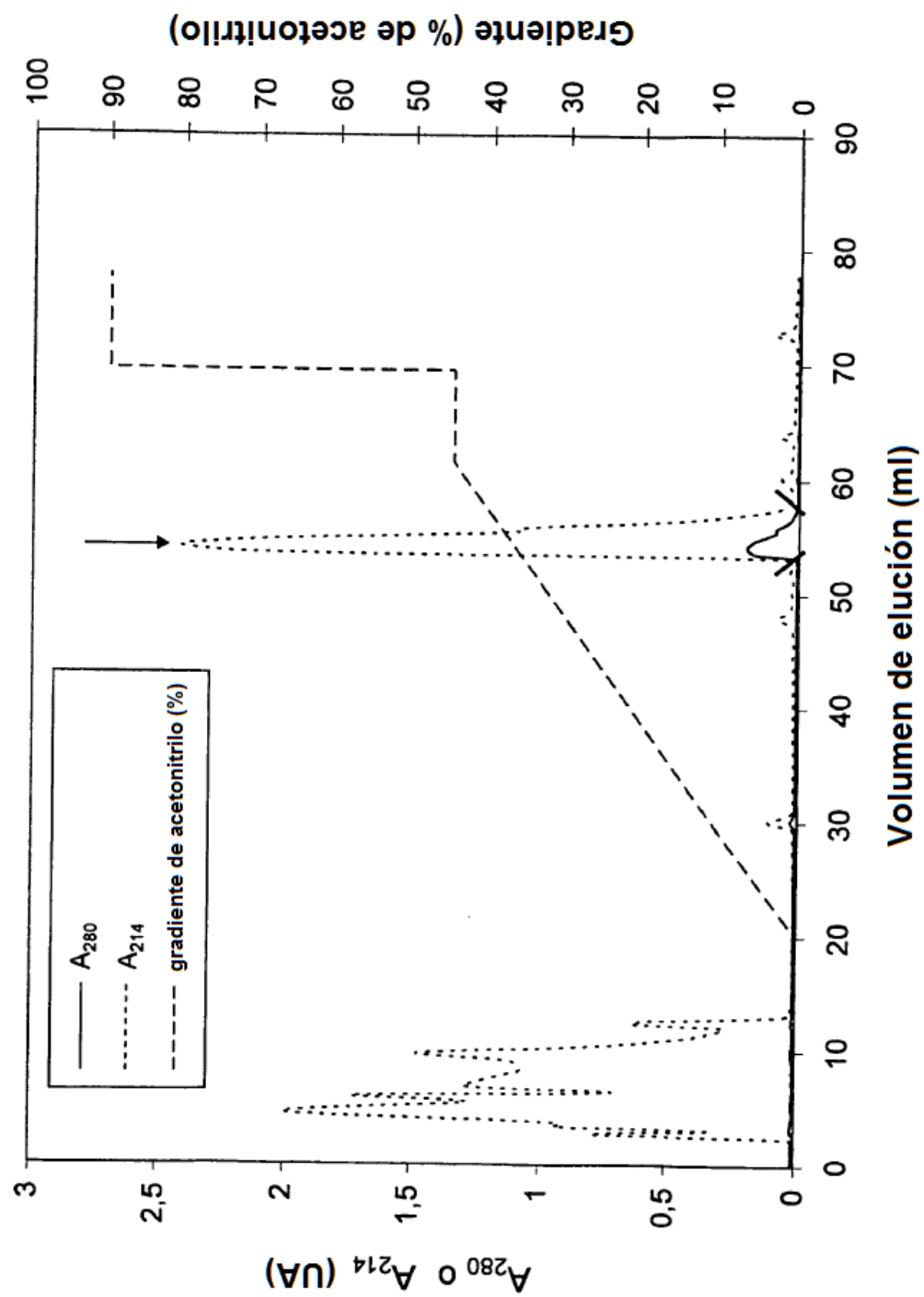


Figura 3

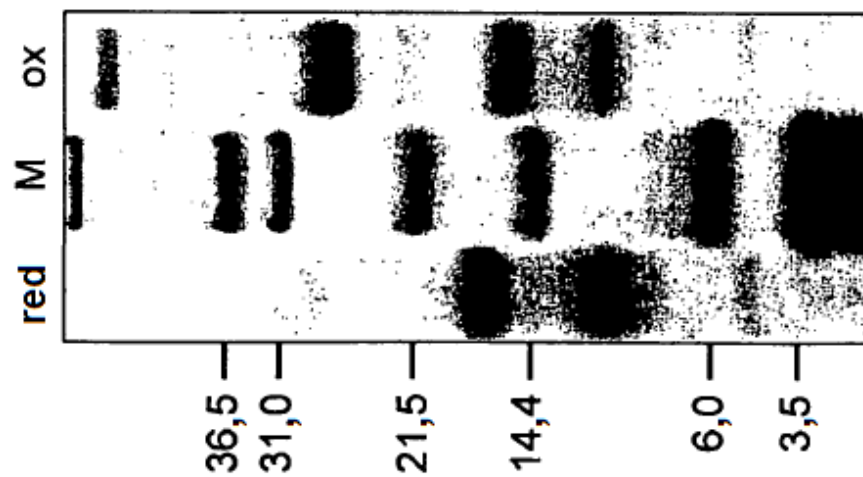


Figura 4

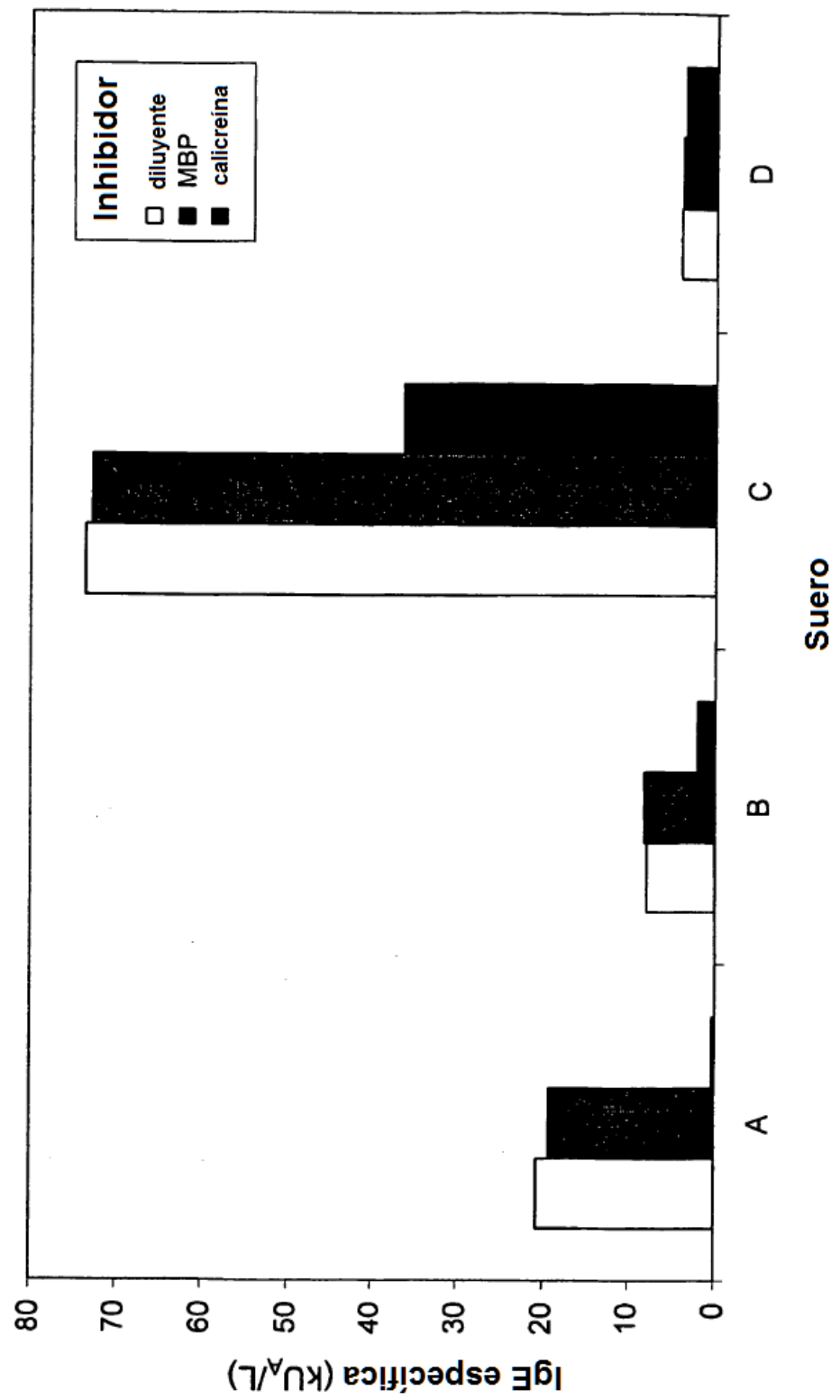


Figura 5a

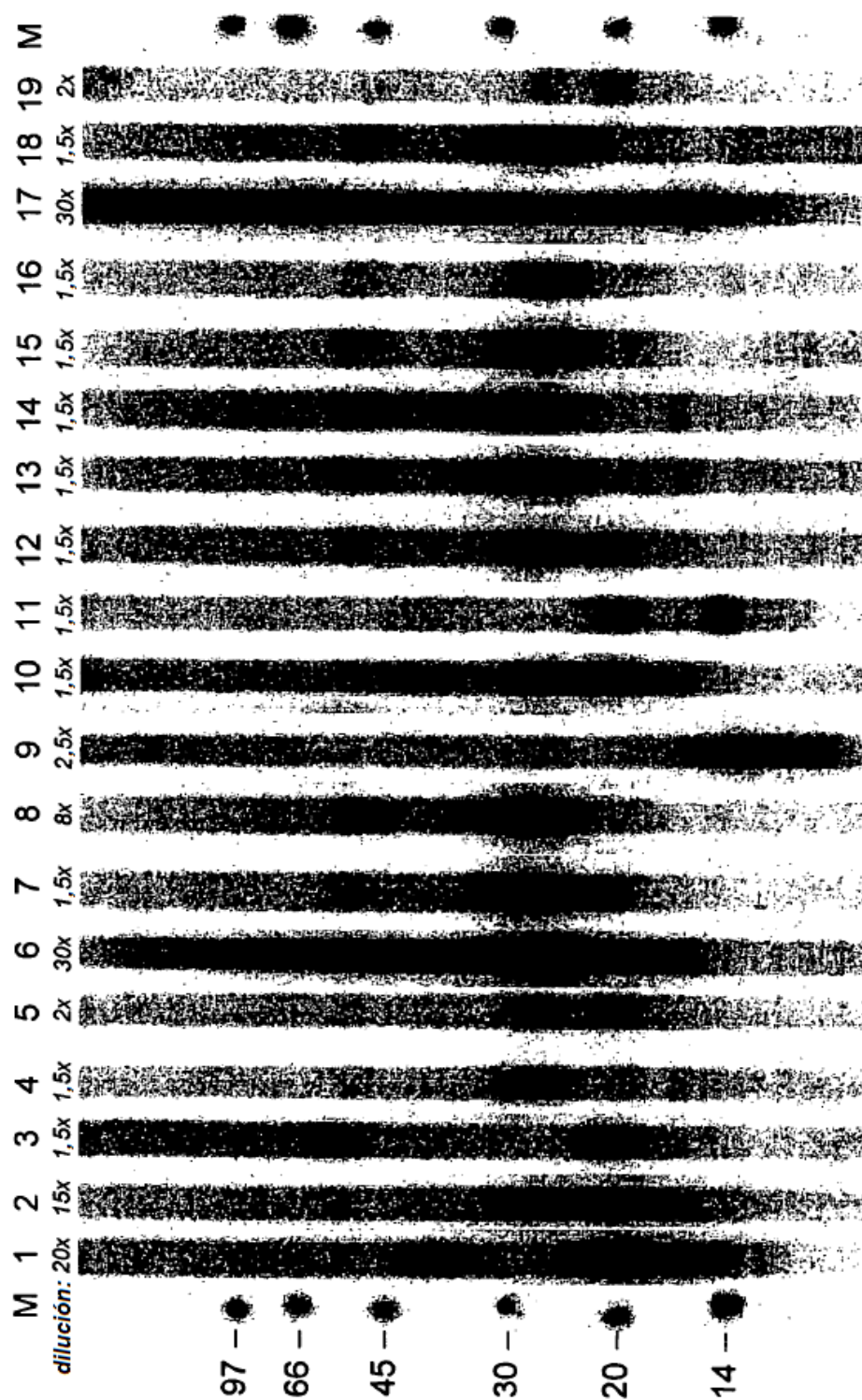
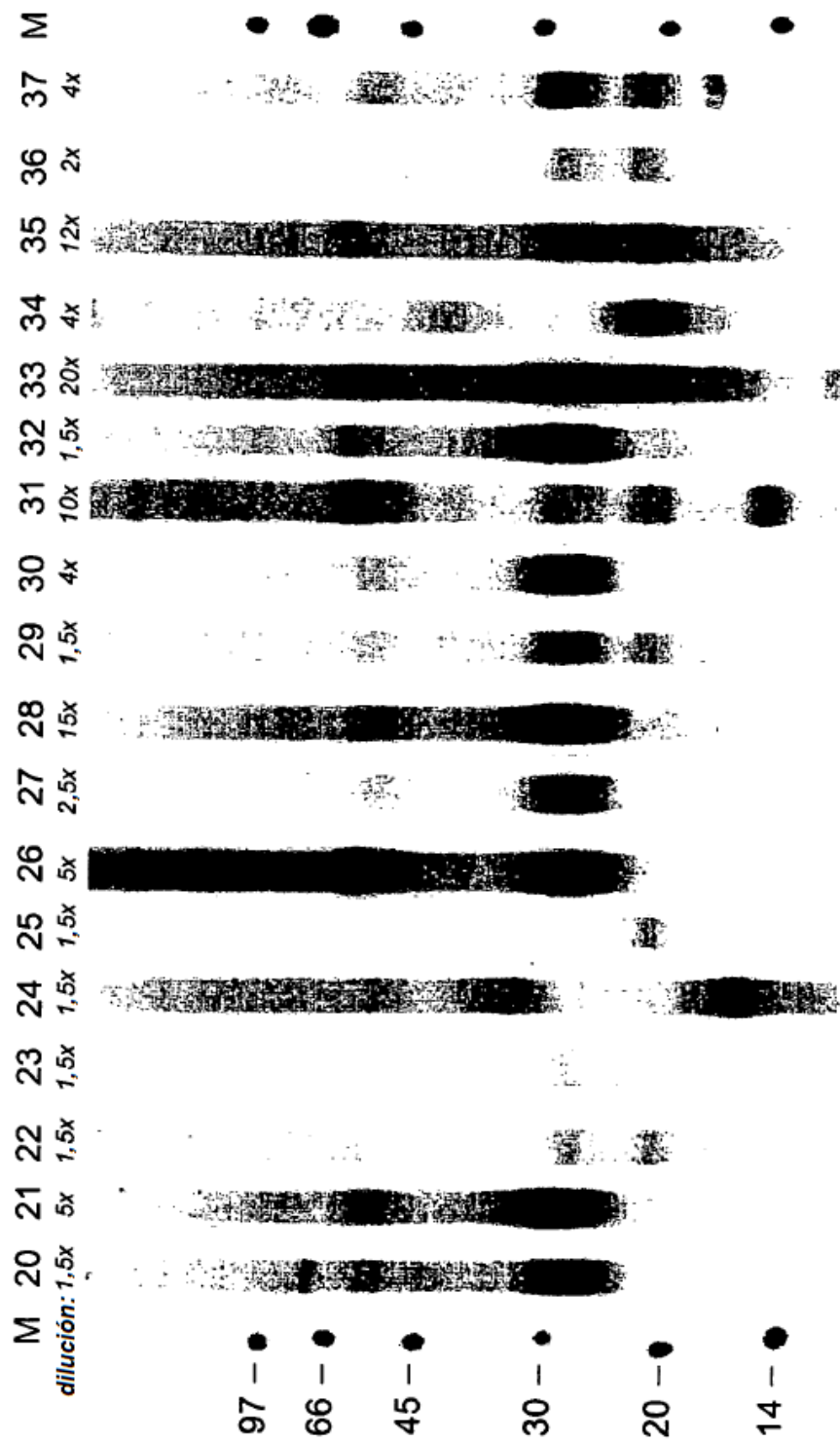


Figura 5b



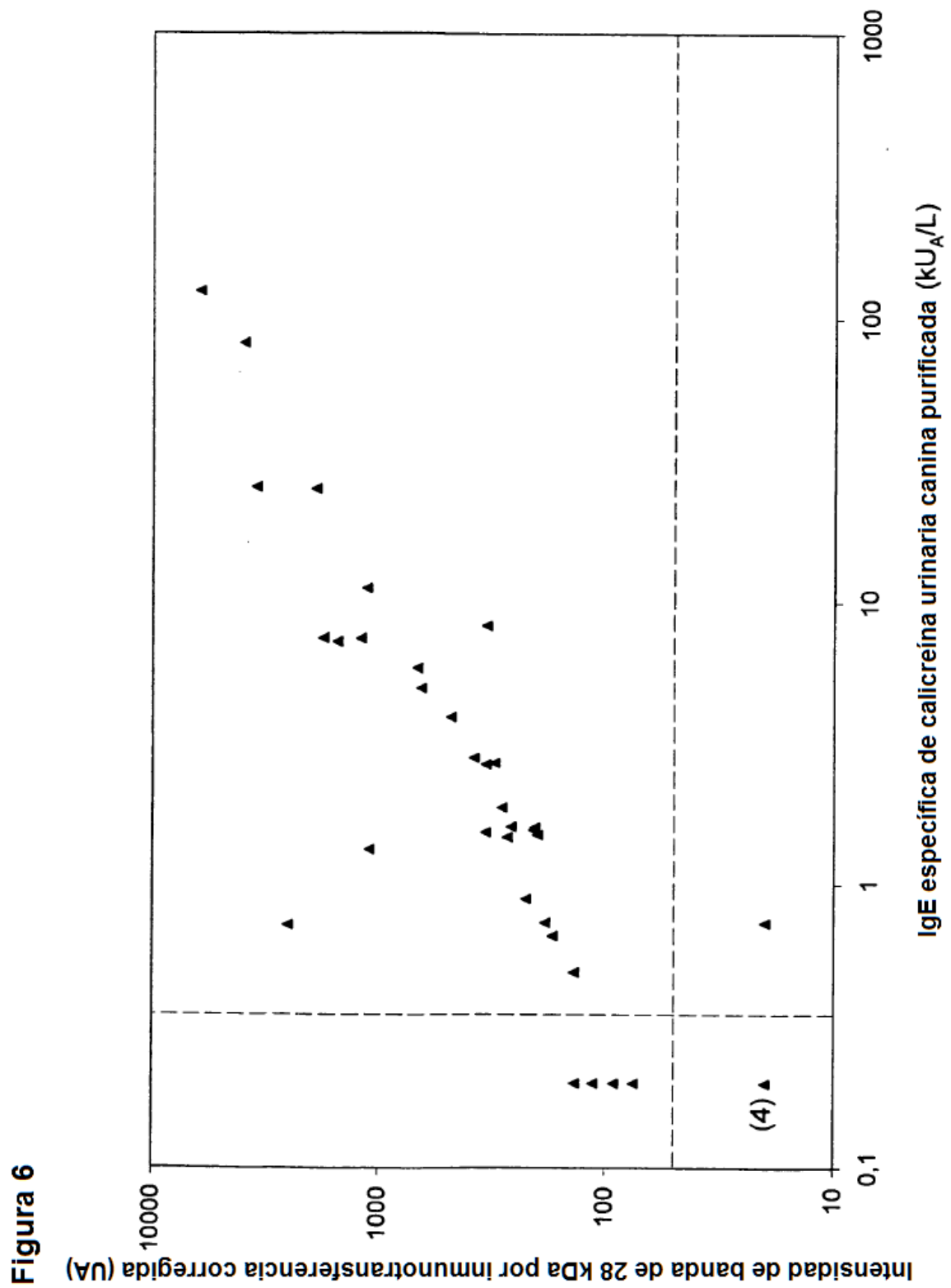


Figura 7

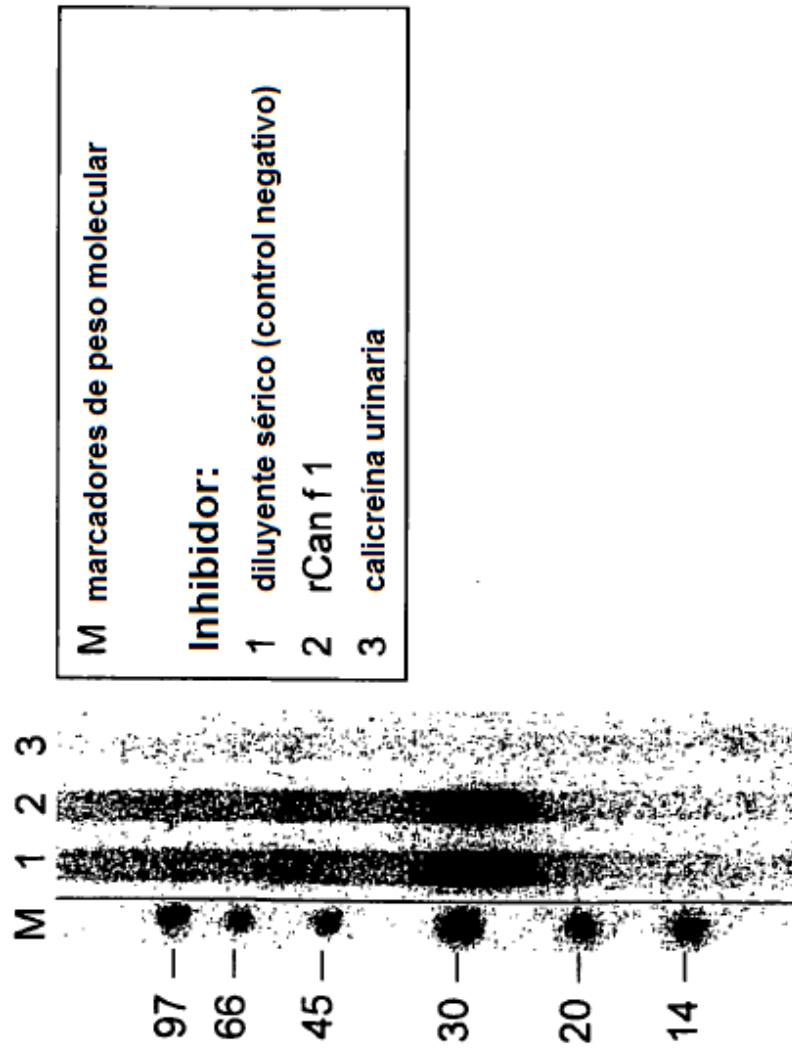


Figura 8

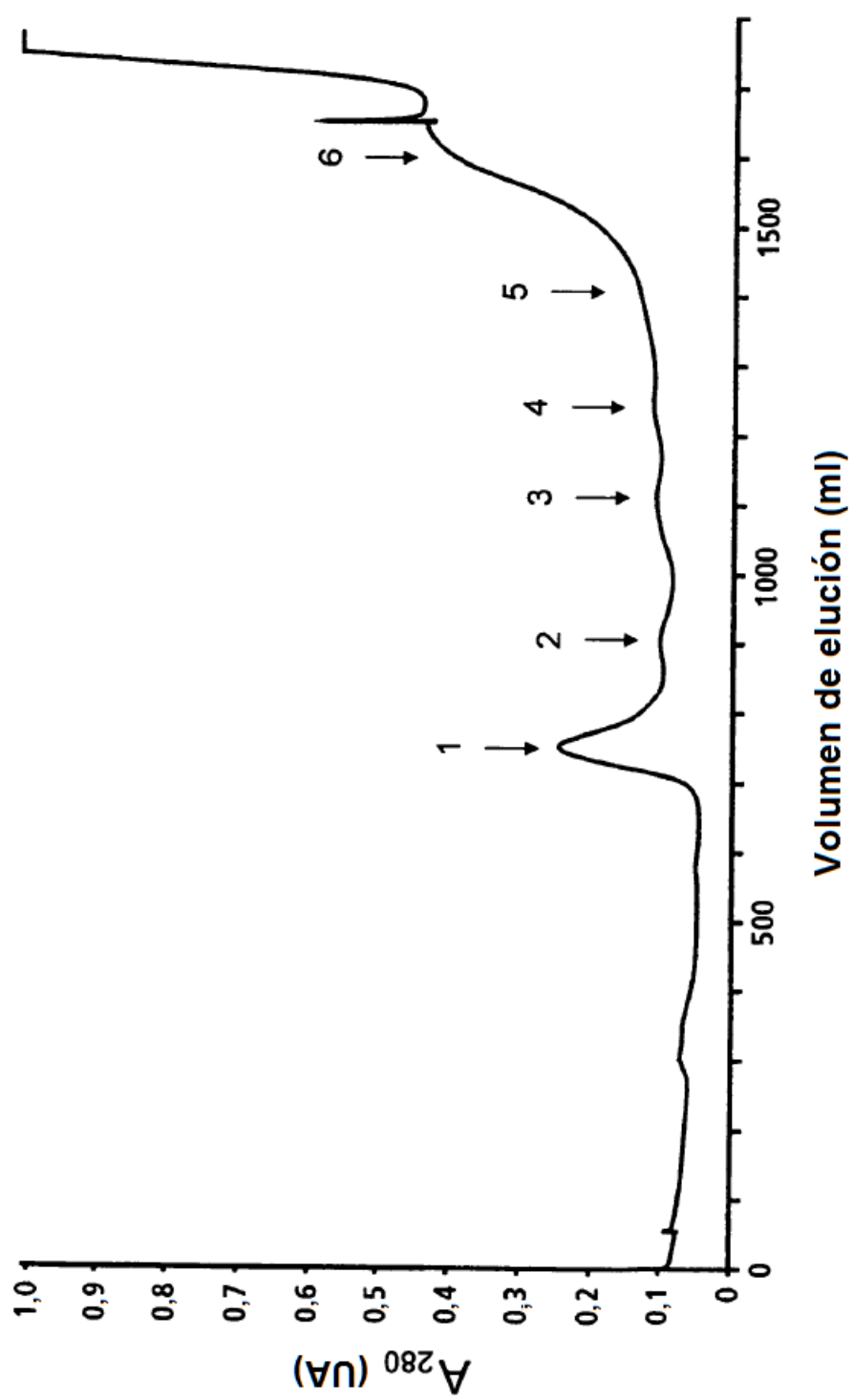


Figura 9

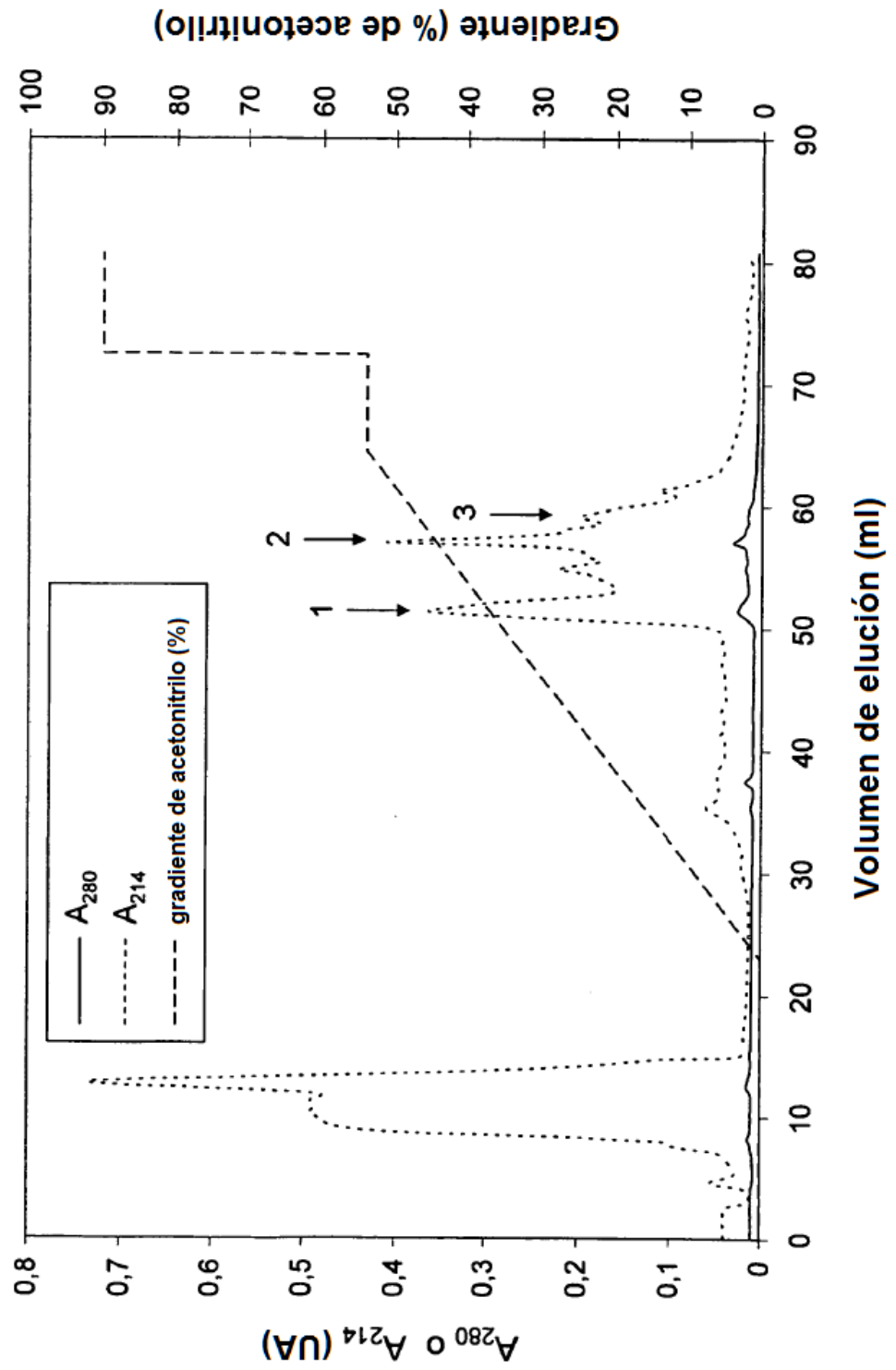


Figura 10

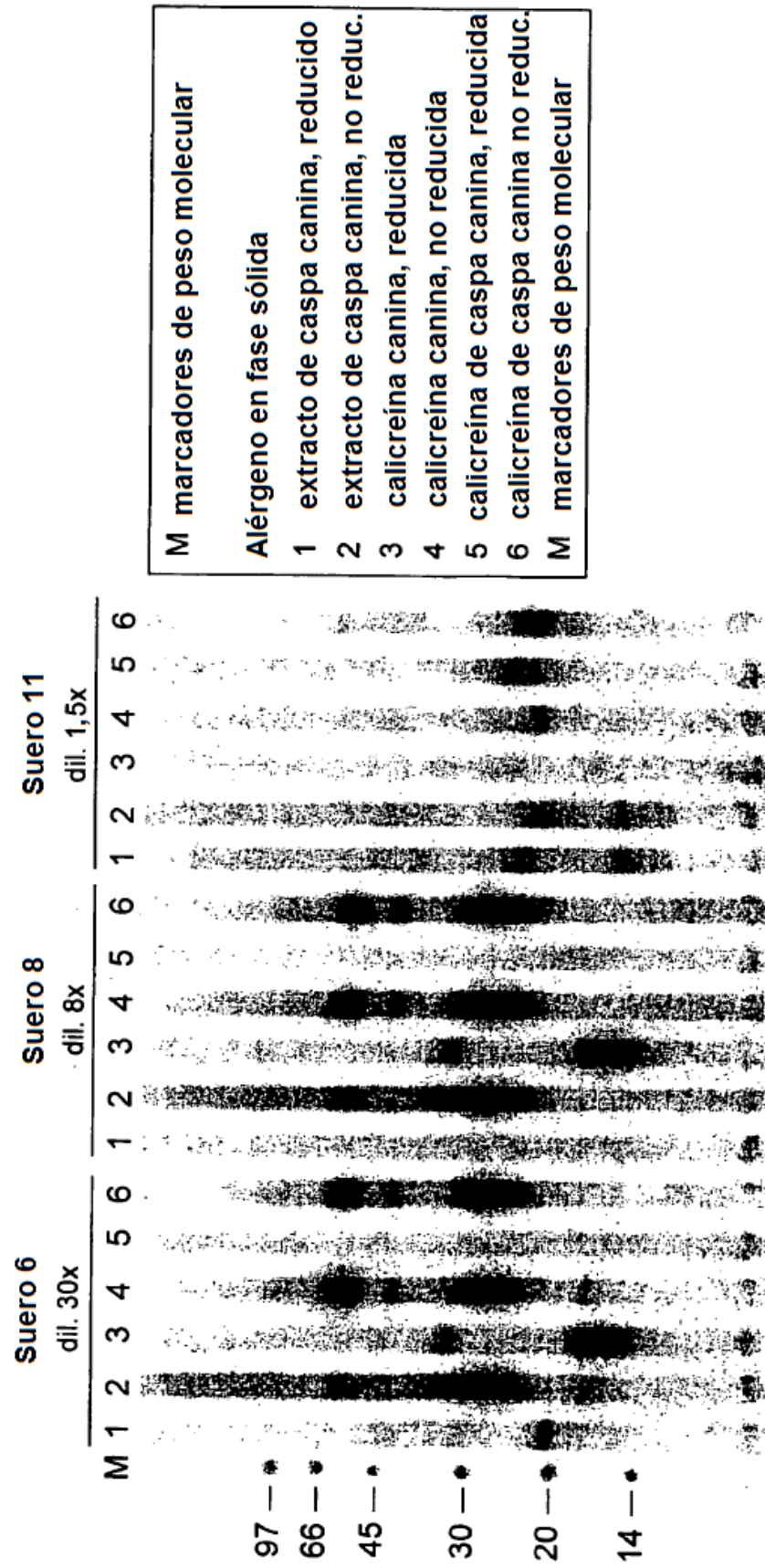


Figura 11

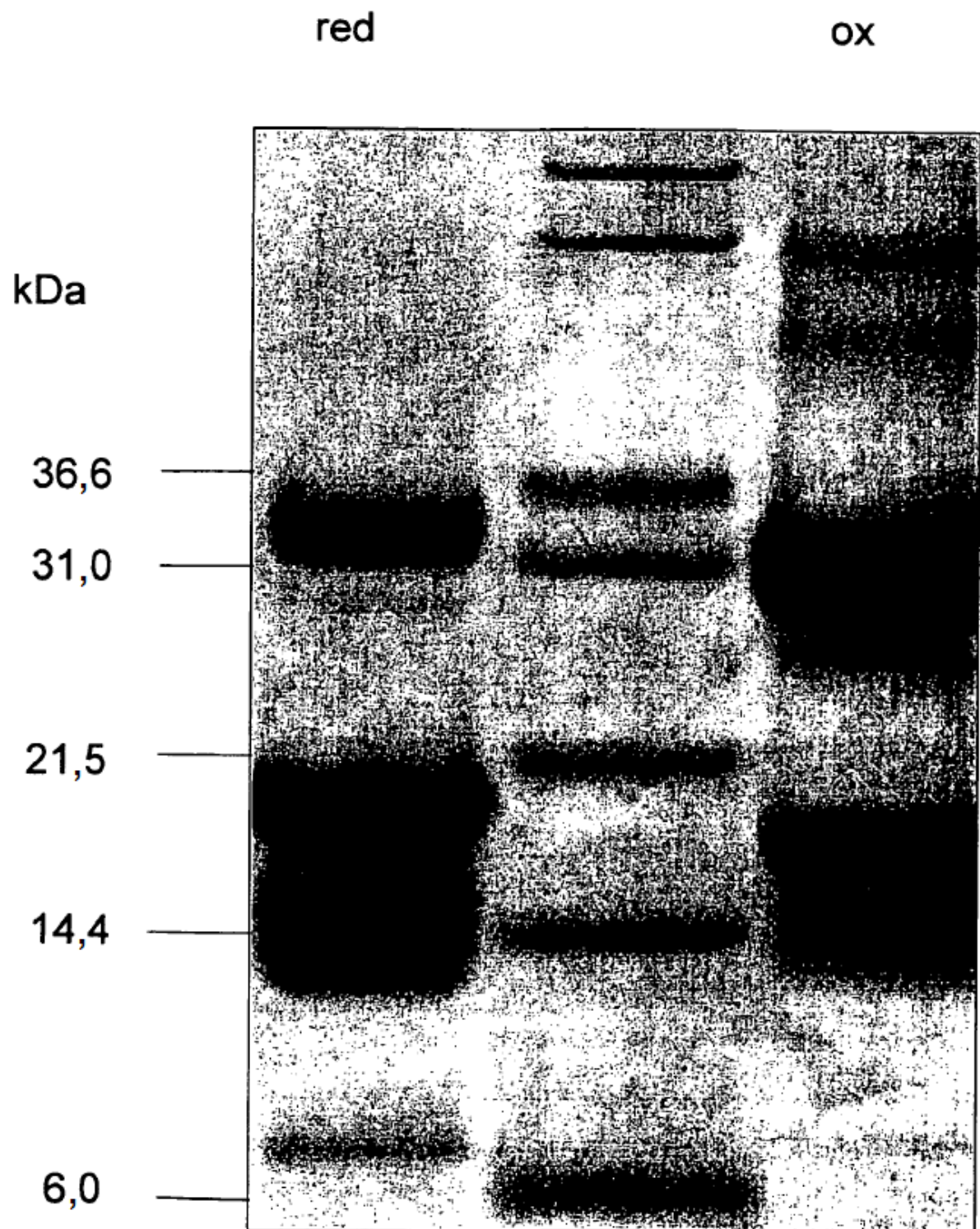


Figura 12

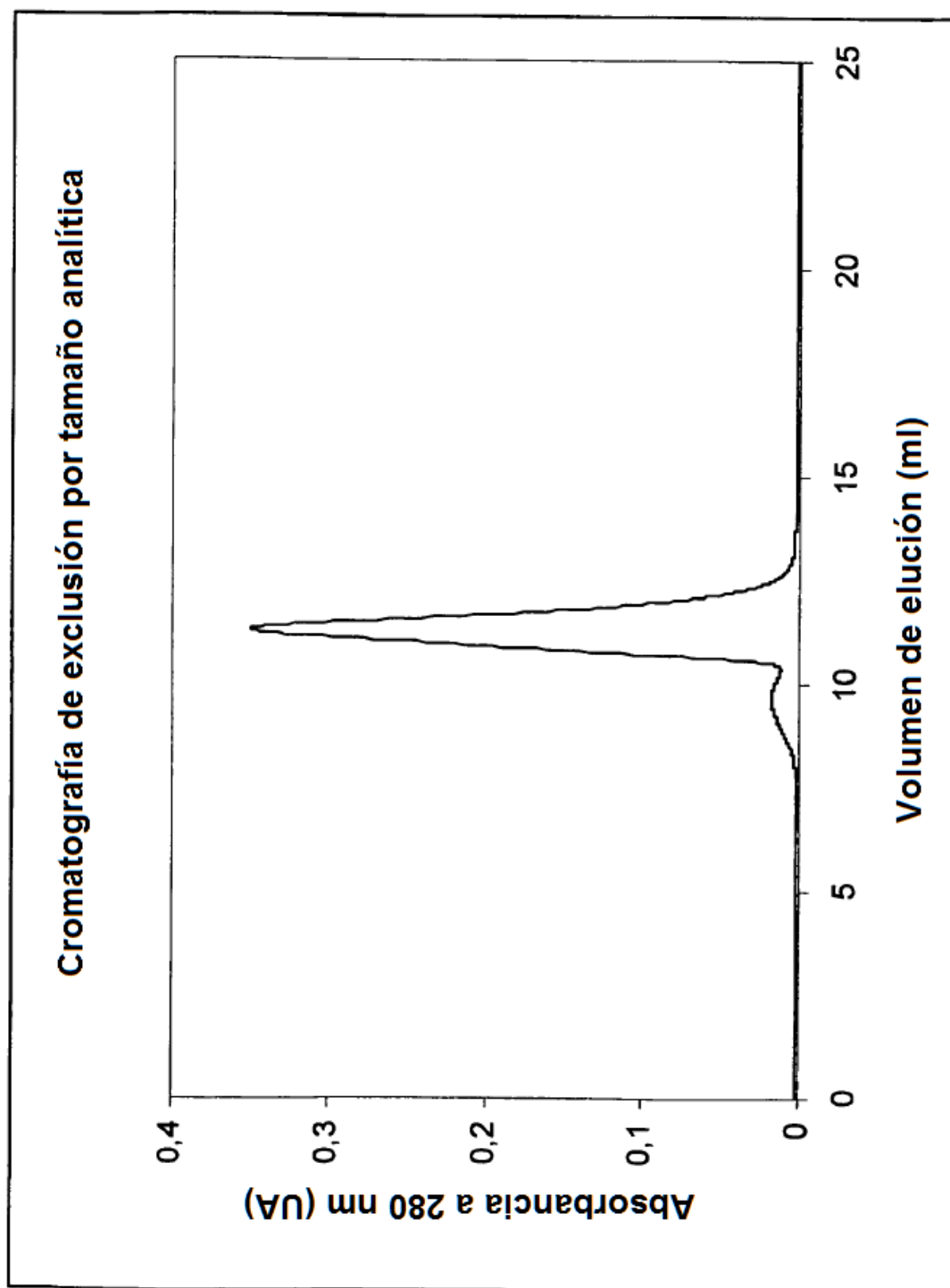


Figura 13

