

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-45230

(P2006-45230A)

(43) 公開日 平成18年2月16日(2006.2.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 4
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-222485 (P2005-222485)	(71) 出願人	000006138
(22) 出願日	平成17年8月1日(2005.8.1)		明治乳業株式会社
(62) 分割の表示	特願平10-501447の分割		東京都江東区新砂1丁目2番10号
原出願日	平成9年6月12日(1997.6.12)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	特願平8-153527		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成8年6月14日(1996.6.14)	(72) 発明者	紀 光助
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内
		(72) 発明者	大力 一雄
			神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA06 EA04 GA11 HA03
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 T細胞エピトープペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒノキ花粉と交差反応性を持つスギ花粉症患者も含めた春期樹木花粉症に対するペプチド免疫療法や、春期樹木花粉症の診断に有用なペプチドの提供。

【解決手段】ヒノキ花粉症患者から樹立したT細胞ラインを、ヒノキ花粉アレルゲンの一次構造をカバーするオーバーラップペプチドで刺激することにより、ヒノキ花粉アレルゲン分子上のT細胞エピトープペプチドを同定した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒノキ花粉アレルギーChao 1の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図4のペプチド番号#1-2(配列番号:4)、#1-4(配列番号:6)、#1-5(配列番号:7)、#1-6(配列番号:8)、#1-7(配列番号:9)、#1-8(配列番号:10)、#1-10(配列番号:12)、#1-11(配列番号:13)、#1-12(配列番号:14)、#1-14(配列番号:16)、#1-15(配列番号:17)、#1-16(配列番号:18)、#1-19(配列番号:21)、#1-20(配列番号:22)、#1-21(配列番号:23)、#1-22(配列番号:24)、#1-23(配列番号:25)、#1-24(配列番号:26)、#1-25(配列番号:27)、#1-26(配列番号:28)、#1-27(配列番号:29)、#1-30(配列番号:32)、#1-31(配列番号:33)、#1-32(配列番号:34)、#1-33(配列番号:35)及び#1-34(配列番号:36)で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一部を有するペプチド。

【請求項 2】

ヒノキ花粉アレルギーChao 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図8のペプチド番号#2-5(配列番号:42)、#2-7(配列番号:44)、#2-8(配列番号:45)、#2-9(配列番号:46)、#2-10(配列番号:47)、#2-11(配列番号:48)、#2-12(配列番号:49)、#2-13(配列番号:50)、#2-14(配列番号:51)、#2-15(配列番号:52)、#2-16(配列番号:53)、#2-17(配列番号:54)、#2-18(配列番号:55)、#2-19(配列番号:56)、#2-20(配列番号:57)、#2-21(配列番号:58)、#2-22(配列番号:59)、#2-23(配列番号:60)、#2-24(配列番号:61)、#2-25(配列番号:62)、#2-26(配列番号:63)、#2-27(配列番号:64)、#2-30(配列番号:67)、#2-31(配列番号:68)、#2-32(配列番号:69)、#2-33(配列番号:70)、#2-34(配列番号:71)、#2-35(配列番号:72)、#2-36(配列番号:73)、#2-37(配列番号:74)、#2-38(配列番号:75)、#2-40(配列番号:77)、#2-41(配列番号:78)、#2-42(配列番号:79)及び#2-43(配列番号:80)で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一部を有するペプチド。

【請求項 3】

少なくとも2つ以上のT細胞エピトープを含む、請求項1又は2記載のペプチド。

【請求項 4】

春期樹木花粉症患者由来のT細胞の活性を刺激及び/又は抑制する作用を有し、かつ、請求項1又は2記載のペプチドのアミノ酸配列が、置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 5】

請求項1～4に記載のペプチドを有効成分とする、春期樹木花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物。

【請求項 6】

春期樹木花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物の調製のための請求項1～4に記載のペプチドの使用。

【請求項 7】

請求項1～4に記載のペプチドを投与することを含む、春期樹木花粉症を治療又は予防する方法。

【請求項 8】

請求項1～4に記載のペプチドを有効成分とする、春期樹木花粉症の診断に用いる試薬。

【請求項 9】

春期樹木花粉症の診断に用いる試薬の調製のための請求項1～4に記載のペプチドの使用。

【請求項 10】

請求項1～4に記載のペプチドを投与することを含む、春期樹木花粉症を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、花粉アレルゲンのT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドを有効成分とする、春期花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

全国民の約10%が苦しめられているスギ花粉を代表とする春期花粉症はさらに増加の傾向にあり、社会的にも注目される疾病の一つとなっている。

【0003】

一般に、花粉症の発症・持続期間は花粉の飛散時期と一致するが、スギ花粉飛散時期が過ぎてもなお症状が持続する例がかなりある。これは、スギ花粉症患者の大多数がヒノキ花粉にも同時に感作されているため、スギ花粉飛散時期に遅れて飛散するヒノキ花粉にも反応して有症期間が長く続くためとされている。

【0004】

すなわち、スギとヒノキ花粉は共通の抗原性を持ち（井出武等、アレルギー臨床11、174～178、1991）、IgE抗体に対するスギ、ヒノキ間の交差反応性が示されており（Taniai M. et al.: Mol. Immunol. 30, 183～189, 1993）、春期花粉症患者のアレルゲン特異的IgE抗体陽性率はスギが83.5%、ヒノキが80.0%、スギ・ヒノキ両者が76.4%であり（岡野光博等、アレルギー43、1179～1184、1994）、スギ花粉症患者の60%がヒノキ花粉特異的IgE抗体を保有している（斉藤洋三、治療78、1571～1576、1996）等の報告から、スギ花粉症患者はヒノキ花粉でも発症し、その逆もあり得ることが、一般的な認識となっている。

【0005】

花粉症に対する予防・治療法としては、花粉症が花粉アレルゲン（アレルギーを引き起こす抗原のことで、本質的に抗原と同じ）と、それに特異的なIgE抗体との抗原抗体反応から引き起こされる即時型の典型的なI型アレルギーであることから、I型アレルギーの発症メカニズムに理論的に対応した予防・治療法が行われている。

【0006】

I型アレルギーの発症メカニズムの概要は以下の通りである。

【0007】

体内に侵入した抗原は、抗原提示細胞によりヘルパーT細胞に抗原提示され、その結果、B細胞が成熟して抗体産生細胞となり、抗原特異的IgE抗体を産生する。このIgE抗体は、肥満細胞表面に結合する。次に新たに抗原が入ってくると、抗原は肥満細胞表面のIgE抗体に結合し、その刺激で、肥満細胞からヒスタミンなどの化学伝達物質が放出され、アレルギー症状が引き起こされる。

【0008】

アレルギー症状に至るこれらの経過に対応した予防・治療法として、1)アレルギー発症の原因となる抗原の回避、2)抗ヒスタミンに代表される薬物療法、3)アレルゲンによる減感作療法、の3つの主要な予防・治療法が用いられている。しかしながら、1)は現実には実施困難であり、2)はあくまでも対症療法であり、3)は唯一アレルギーの根本治療を期待できるが、効果の点で確実性に欠け、アナフィラキシーなどの重大な副作用を伴う危険性がある。

【0009】

このようなことから、最近アレルゲンのT細胞エピトープペプチドを用いたペプチド免疫療法が、アレルギーの予防・治療に試みられるようになってきている。T細胞エピトープは、アレルギーの臨床症状の原因となるタンパク質アレルゲンに対する免疫応答の開始及び持続に関与する。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞表面のHLAクラスII分子に結合して関連T細胞サブポピュレーションを刺激することにより、ヘルパーT細胞のレベルで初期事象の引き金を引くと考えられる。この初期事象は、T細胞増殖、リンホカイン

10

20

30

40

50

分泌、局所性炎症反応、増殖した免疫細胞の炎症部位への移動及び抗体産生へ導くB細胞カスケードへの活性化を引き起こす。これらの抗体のイソ型であるIgE抗体は、アレルギー発症・持続に基本的に重要であり、その産生は上記カスケードの初期に、ヘルパーT細胞のレベルで分泌されたリンホカインの性質により影響を受ける。T細胞エピトープは、T細胞レセプターによる認識の基本要素又は最小単位であり、このエピトープはレセプターを認識する必須のアミノ酸を含んでいる。T細胞エピトープペプチドを用いて、免疫抑制の要であるヘルパーT細胞の応答を制御することはアレルギー炎症の治療につながると考えられる。

【0010】

例えば、T細胞エピトープペプチドを用いたアレルギーの治療剤として、ネコのアレルゲンのT細胞エピトープを含む治療用組成物（特表平7-505365号公報）、スギ花粉Cry j 1のT細胞エピトープペプチドを用いた治療組成物（特表平8-502163号公報）、スギ花粉アレルゲンCry j 1とCry j 2のT細胞エピトープをつないだ多重エピトープペプチド（特願平8-80702号）等がある。ヒノキ花粉については、その主アレルゲンCha o 1が分子量45KDと50KDであり、等電点がいずれも6.8であり、5%の糖を含むタンパクからなるとの報告（井出武他：日本花粉学会誌、34、39、1988）はあるが、その一次構造は不明であり、そのため、アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位も同定されていない。最近、本発明者らは、ヒノキ花粉アレルゲンの遺伝子クローニングに成功し、当該アレルゲンにはCha o 1の他にCha o 2が存在することを明らかにし、Cha o 1とCha o 2それぞれの一次構造を決定した（特願平6-335089号）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

スギとヒノキ花粉の飛散期は一致する時期（混在期間）があり、さらに両者は、共通の抗原性を持つことから、スギ・ヒノキ花粉による症状は明確には区別が付かない。しかし、スギ花粉の飛散期を過ぎてもなお症状が持続したり、新たに症状が発現する例があり、この時期の空中花粉の多くがヒノキ花粉であることから、これらの症状はヒノキ花粉によるものと考えられる。スギよりもヒノキの植林が進められている現状から、ヒノキ花粉の飛散量は年々増加しており、将来はスギ花粉の飛散量を上回ると考えられる。従って、スギ花粉症のみでなく、ヒノキ花粉症も含めた春期樹木花粉症に対する、総合的な根本的予防・治療方法の確立が望まれている。T細胞エピトープペプチドを用いた免疫療法はアレルギーの根本的治療につながると期待され、既にスギ花粉症に対しては上記のように当該免疫療法がいくつか報告されているが、ヒノキ花粉症についての報告及びスギ・ヒノキを含めた春期樹木花粉症についての報告は全くない。

【0012】

このような状況から、本発明は、ヒノキ花粉症に対するペプチド免疫療法に有用なT細胞エピトープペプチドを提供することを課題とする。さらに、本発明は、ヒノキ花粉と交差反応性を持つスギ花粉症患者も含めた春期樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用なT細胞エピトープペプチドを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、ヒノキ花粉症患者から樹立したT細胞ラインを、ヒノキ花粉アレルゲンの一次構造をカバーする合成オーバーラップペプチドで刺激することにより、ヒノキ花粉アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を同定し、上記課題を解決した。

【0014】

すなわち、本発明は、具体的には、特許請求の範囲の各請求項に記載された発明からなる。以下本発明を詳細に説明する。

【0015】

本発明者らが解明したヒノキ花粉アレルゲンの主要アレルゲンCha o 1（成熟タンパク質）のアミノ酸配列（特願平6-335089号に記載のもの）を配列番号：1に、Cha o 2のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を配列番号：2にそれぞれ示す。Cha o 1のアミノ酸配列はスギ花粉アレルゲンCry j 1と80%相同であり、Cha o 2は同じくスギ花粉アレルゲンCry j 2と75%相同である。

【0016】

花粉、ダニ、蜂毒由来の個々のアレルゲンには、多数のアミノ酸置換が見出されており、それらは互いにイソアレルゲン (isoallergen) と呼ばれている。例えば、カバの木花粉Bet v 1は、11種類のイソアレルゲンが分離され、互いに2~15%の範囲でアミノ酸配列が異なっている (Swoboda, I. et al.: J. Biol. Chem. 270: 2607~2613, 1995)。又、Cry j 2については、現時点で、成熟タンパク部分で6個のアミノ酸置換が見られる2つのイソアレルゲンが存在する (特開平8-47392号、特開平7-170986号公報)。Cha o 1、Cha o 2 10
についても、イソアレルゲンが存在し得ることは当業者には容易に予想されることであり、そのようなイソアレルゲンも、本発明でいうCha o 1、Cha o 2に含まれる。

【0017】

スギ科植物は9属に分類され、ヒノキ科植物は7属に分類されるが、スギ科のスギ、セコイア、メタセコイア、ユウヤマキ (独立した科、スギ科、又はマツ科という説がある) とヒノキ科のヒノキ、サワラ、コノテガシワ、ネズミサシ、ビャクシンとの間には、アレルゲンに交差反応性があるとの報告があり (井出武等、アレルギーの臨床11、174~178、1991)、スギアレルゲンとヒノキアレルゲンとは広く交差反応性を有すると考えられる。従って、本発明のペプチドの多くはヒノキ花粉症のみならず、スギ花粉症にも有効であると 20
考えられる。

【0018】

本発明のT細胞エピトープペプチドを得るために、Cha o 1及びCha o 2の一次構造をカバーする適当な長さのアミノ酸 (12~20残基) からなるオーバーラップペプチドを合成する。本発明のペプチドは、春期樹木花粉症患者由来のT細胞の活性を刺激及び/又は抑制する作用を有する。即ち、本発明のペプチドは、T細胞増殖又はリンホカイン分泌等のT細胞応答を誘導することができ、及び/又はT細胞アネルギー (不応答) を誘導することができる。T細胞増殖を指標としてアレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を同定する場合は、特開平8-47392号公報に記載の方法に準じて、ヒノキ花粉症患者の末梢血リンパ球からCha o 1及びCha o 2に特異的に反応するT細胞ライン又はT細胞クローンを患者毎に樹立し、当該T細胞ライン又はT細胞クローンを上記オーバーラップペプチドの個々のペプチド 30
の存在下で培養し、ペプチドに対するT細胞増殖、例えば、細胞内への $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを測定し、刺激係数を算出することにより同定する。ここで用いるT細胞応答の刺激係数 (Stimulation Index、SI) は、ペプチド存在下で細胞内へ取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの放射能のcpmを、ペプチド非存在下 (対照) のcpmで除したものとして計算される。この結果を用いて、患者群について各ペプチドに対する平均刺激係数を計算する。このようにT細胞応答を誘発し、及び/又はT細胞アネルギーを誘導することが見出されたペプチドを、T細胞刺激活性を有するペプチドと定義する。本発明の好適なT細胞エピトープペプチドは、T細胞刺激活性を有し、従って少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、例えば、図1のCha o 1のペプチド (図2、図3、配列番号：3~37に具体的に示す) のうち、ペプチド番号 # 1-2 (配列番号：4)、# 1-4 (配列番号：6)、# 1-5 (配列番号：7)、# 40
1-6 (配列番号：8)、# 1-7 (配列番号：9)、# 1-8 (配列番号：10)、# 1-10 (配列番号：12)、# 1-11 (配列番号：13)、# 1-12 (配列番号：14)、# 1-14 (配列番号：16)、# 1-15 (配列番号：17)、# 1-16 (配列番号：18)、# 1-19 (配列番号：21)、# 1-20 (配列番号：22)、# 1-21 (配列番号：23)、# 1-22 (配列番号：24)、# 1-23 (配列番号：25)、# 1-24 (配列番号：26)、# 1-25 (配列番号：27)、# 1-26 (配列番号：28)、# 1-27 (配列番号：29)、# 1-30 (配列番号：32)、# 1-31 (配列番号：33)、# 1-32 (配列番号：34)、# 1-33 (配列番号：35) 及び # 1-34 (配列番号：36) (図4)、或いは図5のCha o 2のペプチド (図6、図7、配列番号：38~88に具体的に示す) のうちペプチド番号 # 2-5 (配列番号：42)、# 2-7 (配列番号：44)、# 2-8 (配列番号：45)、# 2-9 (配列番号：46)、# 2-10 (配列番号：47)、# 2-11 (配列番号：48)、# 2-12 (50

配列番号：49）、# 2-13（配列番号：50）、# 2-14（配列番号：51）、# 2-15（配列番号：52）、# 2-16（配列番号：53）、# 2-17（配列番号：54）、# 2-18（配列番号：55）、# 2-19（配列番号：56）、# 2-20（配列番号：57）、# 2-21（配列番号：58）、# 2-22（配列番号：59）、# 2-23（配列番号：60）、# 2-24（配列番号：61）、# 2-25（配列番号：62）、# 2-26（配列番号：63）、# 2-27（配列番号：64）、# 2-30（配列番号：67）、# 2-31（配列番号：68）、# 2-32（配列番号：69）、# 2-33（配列番号：70）、# 2-34（配列番号：71）、# 2-35（配列番号：72）、# 2-36（配列番号：73）、# 2-37（配列番号：74）、# 2-38（配列番号：75）、# 2-40（配列番号：77）、# 2-41（配列番号：78）、# 2-42（配列番号：79）及び# 2-43（配列番号：80）（図 8）に示されるペプチドを含み、さらに好適なペプチドは平均刺激係数が 2.0 以上のものを含み、例えば図 1 のペプチドのうちペプチド番号 # 1-2（配列番号：4）、# 1-7（配列番号：9）、# 1-8（配列番号：10）、# 1-20（配列番号：22）、# 1-22（配列番号：24）、# 1-24（配列番号：26）、# 1-26（配列番号：28）、# 1-32（配列番号：34）、# 1-33（配列番号：35）及び# 1-34（配列番号：36）に示されるペプチド、或いは図 5 のペプチドのうちペプチド番号 # 2-10（配列番号：47）、# 2-20（配列番号：57）、# 2-21（配列番号：58）、# 2-40（配列番号：77）、# 2-41（配列番号：78）、# 2-42（配列番号：79）及び# 2-43（配列番号：80）に示されるペプチドを含む。さらに又、好適なペプチドは、重要度指数が少なくとも 100 以上のものを含み、例えば図 1 のペプチドのうちペプチド番号 # 1-7（配列番号：9）、# 1-22（配列番号：24）、# 1-32（配列番号：34）及び# 1-33（配列番号：35）に示されるペプチド、或いは図 5 のペプチドのうちペプチド番号 # 2-10（配列番号：47）、# 2-20（配列番号：57）、# 2-40（配列番号：77）、# 2-41（配列番号：78）、# 2-42（配列番号：79）及び# 2-43（配列番号：80）に示されるペプチドを含む。ここで重要度指数とは、あるペプチドの平均刺激係数に、当該ペプチドに T 細胞応答を示す患者の出現頻度（%）を乗じたものである。

【0019】

正確なエピトープを同定するには、T 細胞刺激活性を有し、従って少なくとも一つの T 細胞エピトープを含むペプチドを、そのペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端何れかのアミノ酸残基の欠失等によって改変し、その改変したペプチドに対する T 細胞刺激活性の変化を調べる。又、重複領域を共有する二つ以上のペプチドが T 細胞刺激活性を示す場合は、このようなペプチドの全部もしくは一部を含む新たな T 細胞エピトープペプチドを複製し、同様に T 細胞刺激活性を測定することができる。

【0020】

本発明の T 細胞エピトープペプチドは、Cry j 1 又は Cry j 2 との T 細胞交差反応性により免疫学的に関連していると考えられる。すなわち、1) Cha o 1 と Cry j 1 はアミノ酸配列が 80% 相同であり、Cha o 2 と Cry j 2 は 75% 相同であること、2) 本発明の実施例 5 で同定された Cha o 1 の T 細胞エピトープペプチド # 1-2（成熟型 Cha o 1 のアミノ酸配列番号：11～30 に対応）と、Cry j 1 の T 細胞エピトープペプチド CJI-2（成熟型 Cry j 1 のアミノ酸番号 11～30 に対応、特表平 8-502163 号公報 / 図 13）とは、2カ所のアミノ酸を除いてアミノ酸配列が一致していること（Cha o 1 の 12 番目の Ala は CJI-1 では Ser、Cha o 1 の 15 番目の Asp は CJI-1 では Ala）、3) スギとヒノキ花粉は共通の抗原性を持つ。このことから、本発明の T 細胞エピトープの由来はヒノキに限定されず、また、本発明の T 細胞エピトープはヒノキ花粉症のみならずスギ花粉症にも有効であると考えられる。

【0021】

又、本発明の T 細胞エピトープペプチドについて、T 細胞レセプターの認識にかかわるアミノ酸残基を公知の技術（例えば、当該アミノ酸残基の置換による T 細胞刺激活性の変化の測定）を用いて決定し、T 細胞レセプターとの相互作用に必須であることが示されたそれらのアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換し、抗原特異的に T 細胞の刺激活性をアレルギー炎症を抑制する方向（T 細胞反応性の増大、リンホカインの産生パターンの変化又はアレルギー等）に制御することができる。例えば、ヒトのアレルギーモデルにおいて、スギ花粉 Cry j 1 の T 細胞エピトープペプチド上の T 細胞認識部位のアミノ酸 1 個を他のアミノ酸

に（399番目のThrをValに）置換したアナログペプチドは、T細胞増殖反応及びIL-4産生量は野生型ペプチドと差はなかったが、IgE抗体産生を抑制するIFN- γ の産生量は増加したとの報告がある（Ikagawa, S. et al.: J. Allerg. Clin. Immunol. 97, 54~64, 1996）。さらに、HLAクラスII分子の結合モチーフは、1~2個のアミノ酸を介して飛び石状に配列する3~5個のアミノ酸残基からなっており、これらが数種類の特定のアミノ酸である場合にペプチドはHLAクラスII分子に結合することが明らかになっている（Matsushita, S. et al.: J. Exp. Med. 180: 877~883, 1994）ことから、本発明のT細胞エピトープペプチドの、HLAクラスII分子との相互作用に必須なアミノ酸残基を公知技術を用いて決定し当該アミノ酸残基（HLAクラスII分子結合モチーフ）を他のアミノ酸に置換し、アレルギー炎症を抑制することができる。さらに又、本発明のT細胞エピトープペプチドの溶解度を増し、治療もしくは予防効果又は安定性を増大させる目的で当該ペプチドを改変することができる。これらの改変には、アミノ酸置換、欠失又は付加等が含まれる。

10

【0022】

さらに本発明において、好適なT細胞エピトープペプチドは、IgE抗体に結合しないか、結合するにしても当該ペプチドが由来する天然のヒノキ花粉アレルゲンがIgE抗体に結合するよりも実質的に低い程度で結合する。

【0023】

本発明のT細胞エピトープペプチドは、少なくとも7アミノ酸残基を含むことが好ましい。また、これらの領域をカテプシン又はトリプシンなどの酵素切断に感受性のArg-Arg又はLys-Lysなどのリンカーによりつないで、抗原提示細胞によるプロセッシングに対する感受性を増加させ、一つ以上のT細胞エピトープを含むペプチドの部分を生産させることができる。又、本発明のT細胞エピトープは、Cry j 1 T細胞エピトープペプチド（特表平8-502163号公報）及び/又はCry j 2 T細胞エピトープペプチド（特開平8-47392号公報）等の他のペプチドと組み合わせて用いることができる。

20

【0024】

本発明の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドは、ヒノキ花粉アレルゲンに感受性の個人及び/又はヒノキとスギ花粉アレルゲンの両者に感受性の個人に投与したとき、その個人のアレルゲンに対するアレルギー応答を調節することができるので、ペプチド免疫療法に有用である。特に本発明のT細胞エピトープペプチドとスギ花粉T細胞エピトープペプチドを組み合わせたものは、スギ・ヒノキに代表される春期樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用である。

30

【0025】

本発明のT細胞エピトープペプチドは、ヒノキ花粉アレルゲン又は当該アレルゲンと免疫学的に交差反応性のある他の樹木花粉により引き起こされる花粉症診断用の試薬としても用いることができる。すなわち、患者末梢血リンパ球に当該ペプチドを約0.1 μ g/ml~1mg/ml好ましくは約1~300 μ g/ml加え、1週間培養した後、[3 H]チミジンのリンパ球への取り込み量を測定し評価することにより、花粉症の診断が可能となる。又、本発明のT細胞エピトープペプチドはT細胞機能、T細胞増殖又はこれらの組み合わせを評価するのにも用いることもできる。

【0026】

本発明のT細胞エピトープペプチドを組換えDNA技術で合成する場合は、当該ペプチドをコードする配列を有する核酸で形質転換した宿主細胞をその細胞に適した培地で培養し、その培養上清から又は宿主細胞から当該ペプチドを当業者に公知の技術を用いて合成することができる。宿主としては、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞等を用いることができる。

40

【0027】

本発明のT細胞エピトープペプチドを、花粉症患者に対するペプチド免疫療法に使用する場合は、製薬上許容しうる適当な希釈剤、担体と組み合わせて使用することができる。花粉症患者は、ヒノキ花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応性を示すスギ花粉アレルゲン患者を含む。投与方法には、注射（皮下、静脈注射等）、点眼、点鼻、経口、吸入、経皮などの簡便な方法を用いることができ、投与量としては、注射による場合は、当該ペプチ

50

ドを1投与量単位当たり、好ましくは約 $1\mu\text{g} \sim 30\text{mg}$ 、さらに好ましくは約 $20\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ を投与する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例1】

【0029】

オーバーラップペプチドの合成

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1 (配列番号: 1) 及びCha o 2 (配列番号: 2) のアミノ酸配列に基づいて、それぞれ10残基のオーバーラップ部分を含む20残基のオーバーラップペプチド (# 1-35 (配列番号: 37) 及び # 2-51 (配列番号: 88) は14残基) を、ペプチド合成機PSSM-8 (島津製作所) を用いて、Fmoc法で合成した。オーバーラップペプチドは、Cha o 1では35種類 (図1 / 配列番号: 3~37)、Cha o 2では51種類であった (図5 / 配列番号: 38~88)。合成したペプチドは全てODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製し、純度は90%以上であった。精製物はLASERMAT 2000 (Finnigan MAT Ltd.) でそれぞれの分子量を確認した。

【実施例2】

【0030】

組換えタンパクの大腸菌での発現

ヒノキ花粉抗原をコードするCha o 1のcDNA又はCha o 2のcDNAがクローン化されているプラスミドDNA (特願平6-335089号) から、PCRによりcDNAを増幅し、末端に制限酵素の認識部位を付与した。このDNA断片をヒスチジンタグ結合タンパク発現ベクターpQE9に挿入し、大腸菌M15 (pREP4) の形質転換を行った。アンピシリン耐性のクローンについて導入遺伝子の発現をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。発現タンパクはNi-NTAアガロース親和性カラムで精製した。

【実施例3】

【0031】

T細胞ラインの樹立

Cha o 1に関するT細胞ラインの樹立は次のようにして行った。即ち、19名のA1a STAT (日本DPCコーポレーション) 又はCAP-RAST (ファルマシア) ヒノキ陽性患者の末梢血由来リンパ球をフィコール-パック (Ficoll-Paque) 比重遠心法を用いて分離した。このリンパ球 (2×10^6 個) を2mlの同一患者の血漿 (10%) 又はヒトAB型血清 (20%、萬邦通商) 添加RPMI1640培地 (GIBCO社) に懸濁し、実施例2で得られた $10 \sim 30\mu\text{g/ml}$ の組換えCha o 1又は実施例1で得られたオーバーラップペプチド混合物 ($0.01 \sim 1\mu\text{M}$) と共に24穴プレート上で3~10日間培養した (37、CO₂ インキュベーター、TAKAI社)。Cha o 1刺激を受けて活性化されたT細胞が顕微鏡下で確認できた時点で5U/mlのIL-2 (ベーリンガーマンハイム社) を添加し、一晚培養した。翌日からは20U/mlのIL-2、10%又は20%ヒトAB型血清添加RPMI1640培地で毎日培地を交換しながら約10日間培養し、増殖したT細胞ラインの特異性を調べた後、一部を凍結保存した。また、Cha o 2に関するT細胞ラインの樹立は20名のヒノキ花粉症患者について同様の方法で行った。

【実施例4】

【0032】

抗原提示細胞の樹立

抗原提示細胞としてEBウイルス (Epstein-Barr virus、EBV) をBリンパ球に感染させトランスフォーメーションを引き起こさせたリンパ芽球様細胞株 (B細胞株) を樹立し使用した。即ち、まずEBV産生B-95-8細胞 (マーモセット、ATCC CRL1612) を非働化ウシ胎児血清 (FCS、GIBCO社製) 20% 添加RPMI1640培地で培養し、その培養上清を $0.22\mu\text{m}$ 滅菌用フィルターでろ過し、 -80°C で凍結保存した。次にヒノキ花粉症患者のリンパ球 (2×10^6 個) にEBV液1mlを加え37 で30分感染させた。EBV感染細胞を2回洗浄後、サイクロスポリン (サンド薬品) 最終濃度200ng/ml添加20% FCS-RPMI1640培地で約20日間培養した。細

10

20

30

40

50

胞塊が肉眼で観察できるようになった後は20% FCS-RPMI 1640培地でさらに約20日間培養し、その後使用するまで細胞を凍結保存した。

【実施例5】

【0033】

T細胞エピトープペプチドの同定

実施例4で樹立した培養B細胞株を50 μ g/mlのマイトマイシンC(サンド薬品)で30分処理するか、又はX線照射(50gray)した後、RPMI1640培地で4回洗浄した。このB細胞を96穴プレートに播種(10,000個/ウエル)した後、Cha o 1及びCha o 2に関して最終濃度10 μ g/mlの組換え体を加えた。(対照群としては最終濃度10 μ g/mlの溶連菌細胞壁抗原(SCW)、最終濃度10 μ g/mlのキャンディダ・アルビカンス(Candida Albicans)抗原(CA)、最終濃度1 μ g/mlのツベルクリン(Tuberculin)抗原(PPD)を加えた。)その後B細胞株を樹立した同一患者のT細胞ライン(20,000個/ウエル)を各ウエルに播種し48時間培養後0.5 μ Ci[³H]チミジンをウエルに添加しさらに16時間培養した。細胞をセルハーベスター(ベルトールド)を用いてガラスフィルター上に捕集後、細胞内に取り込まれた[³H]チミジン量を液体シンチレーションカウンターにて測定し、細胞増殖応答を確認した。

10

【0034】

T細胞ラインがCha o 1又はCha o 2に特異的に増殖応答することを確認後、実施例3で樹立されたT細胞ラインを用いて上記と同様の手法で各オーバーラップペプチド(最終濃度1 μ M)に対するT細胞ラインの増殖応答を見た。オーバーラップペプチドに対するT細胞ラインの増殖応答の平均刺激係数、出現頻度及びそれらから算出された重要度指数の結果を図1及び図5に示す。

20

【0035】

また、#2-11および#2-12の配列中の1アミノ酸を置換した変異配列(それぞれ、配列番号:89、90)に対するT細胞ライン(N=17)の増殖応答を調べた。これらの2つの変異配列のT細胞刺激活性は、それぞれ平均刺激係数が1.6、1.2、出現頻度が16%、11%、重要度指数が25.6、13.2であった。このように、本発明のT細胞エピトープペプチドは、一つ又は複数のアミノ酸が変異してもT細胞刺激活性を保持しており、さらに活性が上昇することもあることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明はヒノキ花粉主要アレルゲンであるCha o 1の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチド及びCha o 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを提供する。さらに本発明は、当該ペプチドと免疫学的にT細胞交差反応性を示す他の樹木花粉のペプチド断片を含む。これらのペプチドは、スギ・ヒノキ花粉に代表される春期樹木花粉症のペプチド免疫療法に有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数を示す。

【図2】図2は、Cha o 1のオーバーラップペプチド(#1-1~#1-28)を示す。

40

【図3】図3は、Cha o 1のオーバーラップペプチド(#1-29~#1-35)を示す。

【図4】図4は、Cha o 1のT細胞エピトープを含むペプチドを示す。

【図5】図5は、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 2におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数を示す。

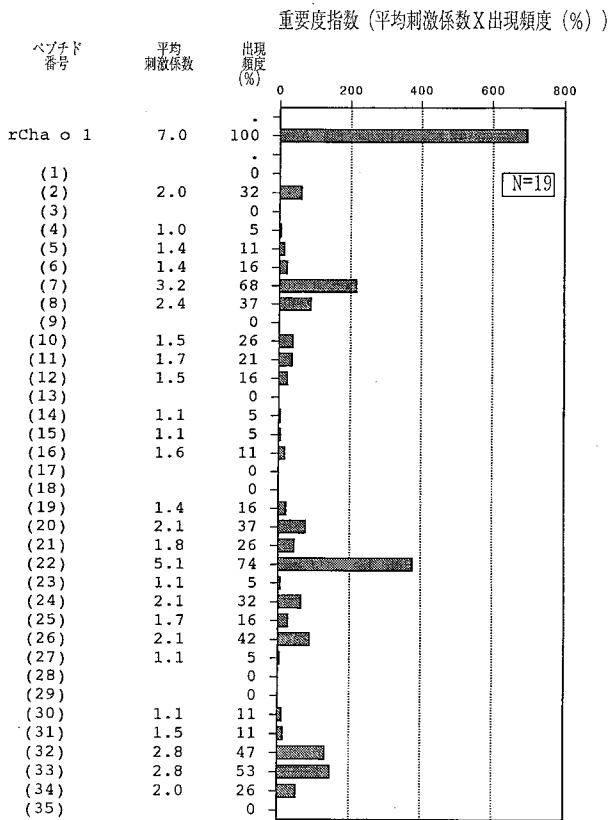
【図6】図6は、Cha o 2のオーバーラップペプチド(#2-1~#1-27)を示す。

【図7】図7は、Cha o 2のオーバーラップペプチド(#2-28~#1-51)を示す。

【図8】図8は、Cha o 2のT細胞エピトープを含むペプチドを示す。

【図 1】

図 1



【図 2】

図 2

#1-1(1-20). DNPIDSCWRGDANWDQNRMK
 #1-2(11-30). DANWDQNRMKLADCAVGFGS
 #1-3(21-40). LADCAVGFGSSAMGGKGGAF
 #1-4(31-50). SAMGGKGGAFYTVTSSDDDDP
 #1-5(41-60). YTVTSSDDDDPVNPAPGTLRY
 #1-6(51-70). VNPAPGTLRYGATRERSLWI
 #1-7(61-80). GATRERSLWIIFSKNLNKKL
 #1-8(71-90). IFSKNLNKLNMPLYIAGNK
 #1-9(81-100). NMPLYIAGNKTIDGRGAEVH
 #1-10(91-110). TIDGRGAEVHIGNGGPCLFM
 #1-11(101-120). IGNGGPCLFMRTVSHVILHG
 #1-12(111-130). RTVSHVILHGLNIHGCNTSV
 #1-13(121-140). LNIHGCNTSVSGNVLI SEAS
 #1-14(131-150). SGNVLI SEASGVVPVHAQDG
 #1-15(141-160). GVVVPVHAQDGD AITMRNVTD
 #1-16(151-170). DAITMRNVTDVWIDHNSLSD
 #1-17(161-180). VWIDHNSLSDSSDGLVDVTL
 #1-18(171-190). SSDGLVDVTLASTGVTISNN
 #1-19(181-200). ASTGVTISNNHFFNHHKVML
 #1-20(191-210). HFFNHHKVMLLGHSDIYSDD
 #1-21(201-220). LGHSDIYSDDKSMKVTVA FN
 #1-22(211-230). KSMKVTVA FNQFGPNAGQRM
 #1-23(221-240). QFGPNAGQRM PRARYGLIHV
 #1-24(231-250). PRARYGLIHVANNYDPWSI
 #1-25(241-260). ANNNYDPWSIYAIGGSSNPT
 #1-26(251-270). YAIGGSSNPTILSEGN SFTA
 #1-27(261-280). ILSEGN SFTAPNDSDKKEVT
 #1-28(271-290). PNDSDKKEVTRRVGCESPST

【図 3】

図 3

#1-29(281-300). RRVGCESPSTCANWVWRSTQ
 #1-30(291-310). CANWVWRSTQDSFNNGAYFV
 #1-31(301-320). DSNNGAYFVSSGKNEGTNI
 #1-32(311-330). SSGKNEGTNIYNNNEAFKVE
 #1-33(321-340). YNNNEAFKVENGSAA PQLTK
 #1-34(331-350). NGSAAPQLTKNAGVLT CILS
 #1-35(341-354). NAGVLT CILSKPCS

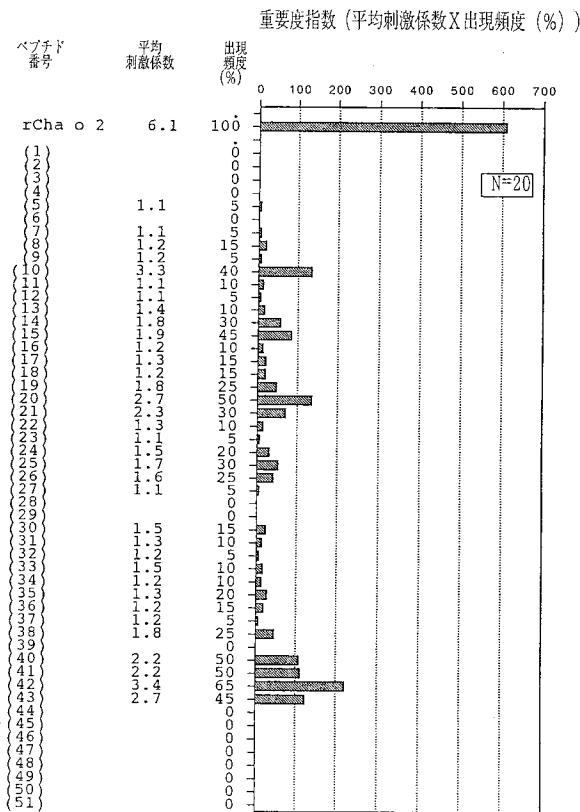
【図 4】

図 4

#1-2(11-30). DANWDQNRMKLADCAVGFGS
 #1-4(31-50). SAMGGKGGAFYTVTSSDDDDP
 #1-5(41-60). YTVTSSDDDDPVNPAPGTLRY
 #1-6(51-70). VNPAPGTLRYGATRERSLWI
 #1-7(61-80). GATRERSLWIIFSKNLNKKL
 #1-8(71-90). IFSKNLNKLNMPLYIAGNK
 #1-10(91-110). TIDGRGAEVHIGNGGPCLFM
 #1-11(101-120). IGNGGPCLFMRTVSHVILHG
 #1-12(111-130). RTVSHVILHGLNIHGCNTSV
 #1-14(131-150). SGNVLI SEASGVVPVHAQDG
 #1-15(141-160). GVVVPVHAQDGD AITMRNVTD
 #1-16(151-170). DAITMRNVTDVWIDHNSLSD
 #1-19(181-200). ASTGVTISNNHFFNHHKVML
 #1-20(191-210). HFFNHHKVMLLGHSDIYSDD
 #1-21(201-220). LGHSDIYSDDKSMKVTVA FN
 #1-22(211-230). KSMKVTVA FNQFGPNAGQRM
 #1-23(221-240). QFGPNAGQRM PRARYGLIHV
 #1-24(231-250). PRARYGLIHVANNYDPWSI
 #1-25(241-260). ANNNYDPWSIYAIGGSSNPT
 #1-26(251-270). YAIGGSSNPTILSEGN SFTA
 #1-27(261-280). ILSEGN SFTAPNDSDKKEVT
 #1-30(291-310). CANWVWRSTQDSFNNGAYFV
 #1-31(301-320). DSNNGAYFVSSGKNEGTNI
 #1-32(311-330). SSGKNEGTNIYNNNEAFKVE
 #1-33(321-340). YNNNEAFKVENGSAA PQLTK
 #1-34(331-350). NGSAAPQLTKNAGVLT CILS

【図 5】

図 5



【図 6】

図 6

#2-1(1-20). MGHKFM AAVAF LALQLIVMA
#2-2(11-30). FLALQLIVMAA AEDQSAQIM
#2-3(21-40). AAEDQSAQIM L DSDIEQYLR
#2-4(31-50). L DSDIEQYLR SNRSLK KLVH
#2-5(41-60). SNRSLK KLVH SRHDAATVFN
#2-6(51-70). SRHDAATVFN VEQYGA VGDG
#2-7(61-80). VEQYGA VGDG KHDSTEAFAT
#2-8(71-90). KHDSTEAFAT TWNAACKKAS
#2-9(81-100). TWNAACKKASAVLLVPANKK
#2-10(91-110). AVLLVPANKK FVNNLVFRG
#2-11(101-120). FVNNLVFRG PCQPHLSFKV
#2-12(111-130). PCQPHLSFKV DGTIVA QPDP
#2-13(121-140). DGTIVA QPDP ARWKN SKIWL
#2-14(131-150). ARWKN SKIWL QFAQLTDFNL
#2-15(141-160). QFAQLTDFNL MGTGVIDGQG
#2-16(151-170). MGTGVIDGQG QWWAGQCKV
#2-17(161-180). QWWAGQCKV VNGRTVCNDR
#2-18(171-190). VNGRTVCNDR NEPTAIKIDY
#2-19(181-200). NRPTAIKIDY SKSVTVKELT
#2-20(191-210). SKSVTVKELT LMNSPEFHLV
#2-21(201-220). LMNSPEFHLV FGECEGVKI
#2-22(211-230). FGECEGVKI QGLKIKAPRDS
#2-23(221-240). QGLKIKAPRDS PNTDGDIDIFA
#2-24(231-250). PNTDGDIDIFA SKRFHIEKCV
#2-25(241-260). SKRFHIEKCV IGTGDDCIAI
#2-26(251-270). IGTGDDCIAI GTGSSNITIK
#2-27(261-280). GTGSSNITIKDLICGPGHGI

【図 7】

図 7

#2-28(271-290). DLICGPGHGISIGSLGRDNS
#2-29(281-300). SIGSLGRDNSRAEVSHVHV
#2-30(291-310). RAEVSHVHVNRKAFIDTQNG
#2-31(301-320). RAKFIDTQNGLRKKTWQGGG
#2-32(311-330). LRKKTWQGGGSLASYITYEN
#2-33(321-340). GLASYITYEN VEMINSENPI
#2-34(331-350). VEMINSENPI L INQFYCTSA
#2-35(341-360). L INQFYCTSA S ACQNRSAV
#2-36(351-370). S ACQNRSAV QIQGVTYKNI
#2-37(361-380). QIQGVTYKNI HGTSATAAAI
#2-38(371-390). HGTSATAAAI QLMCSDSVPC
#2-39(381-400). QLMCSDSVPC TGIQLSNVSLKLTSGKPASC
#2-40(391-410). TGIQLSNVSLKLTSGKPASC
#2-41(401-420). KLTSGKPASCVDKNARGFYS
#2-42(411-430). VDKNARGFYSGR LIPTCKNL
#2-43(421-440). GR LIPTCKNL R PGPSPEFE
#2-44(431-450). R PGPSPEFE LQQQPTTVMD
#2-45(441-460). LQQQPTTVMDENK GACAKGD
#2-46(451-470). ENK GACAKGD STCISLSSSP
#2-47(461-480). STCISLSSSP NCNKCKKCGC
#2-48(471-490). PNCNKCKKCGC QPKPKLIIV
#2-49(481-500). QPKPKLIIV HPNKPDYYP
#2-50(491-510). HPNKPDYYP QKWVCSCHNK
#2-51(501-514). QKWVCSCHNKIYNP

【図 8】

図 8

#2-5(41-60). SNRSLK KLVH SRHDAATVFN
#2-7(61-80). VEQYGA VGDG KHDSTEAFAT
#2-8(71-90). KHDSTEAFAT TWNAACKKAS
#2-9(81-100). TWNAACKKASAVLLVPANKK
#2-10(91-110). AVLLVPANKK FVNNLVFRG
#2-11(101-120). FVNNLVFRG PCQPHLSFKV
#2-12(111-130). PCQPHLSFKV DGTIVA QPDP
#2-13(121-140). DGTIVA QPDP ARWKN SKIWL
#2-14(131-150). ARWKN SKIWL QFAQLTDFNL
#2-15(141-160). QFAQLTDFNL MGTGVIDGQG
#2-16(151-170). MGTGVIDGQG QWWAGQCKV
#2-17(161-180). QWWAGQCKV VNGRTVCNDR
#2-18(171-190). VNGRTVCNDR NEPTAIKIDY
#2-19(181-200). NRPTAIKIDY SKSVTVKELT
#2-20(191-210). SKSVTVKELT LMNSPEFHLV
#2-21(201-220). LMNSPEFHLV FGECEGVKI
#2-22(211-230). FGECEGVKI QGLKIKAPRDS
#2-23(221-240). QGLKIKAPRDS PNTDGDIDIFA
#2-24(231-250). PNTDGDIDIFA SKRFHIEKCV
#2-25(241-260). SKRFHIEKCV IGTGDDCIAI
#2-26(251-270). IGTGDDCIAI GTGSSNITIK
#2-27(261-280). GTGSSNITIKDLICGPGHGI
#2-30(291-310). RAEVSHVHVNRKAFIDTQNG
#2-31(301-320). RAKFIDTQNGLRKKTWQGGG
#2-32(311-330). LRKKTWQGGGSLASYITYEN
#2-33(321-340). GLASYITYEN VEMINSENPI
#2-34(331-350). VEMINSENPI L INQFYCTSA
#2-35(341-360). L INQFYCTSA S ACQNRSAV
#2-36(351-370). S ACQNRSAV QIQGVTYKNI
#2-37(361-380). QIQGVTYKNI HGTSATAAAI
#2-38(371-390). HGTSATAAAI QLMCSDSVPC
#2-40(391-410). TGIQLSNVSLKLTSGKPASC
#2-41(401-420). KLTSGKPASCVDKNARGFYS
#2-42(411-430). VDKNARGFYSGR LIPTCKNL
#2-43(421-440). GR LIPTCKNL R PGPSPEFE

【配列表】

2006045230000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月30日(2005.8.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

図4のペプチド番号#1-2(配列番号:4)、#1-7(配列番号:9)、#1-8(配列番号:10)、#1-20(配列番号:22)、#1-22(配列番号:24)、#1-24(配列番号:26)、#1-32(配列番号:34)、#1-33(配列番号:35)または#1-34(配列番号:36)で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項2】

図4のペプチド番号#1-2(配列番号:4)、#1-7(配列番号:9)、#1-8(配列番号:10)、#1-20(配列番号:22)、#1-22(配列番号:24)、#1-24(配列番号:26)、#1-32(配列番号:34)、#1-33(配列番号:35)または#1-34(配列番号:36)で示されるアミノ酸配列からなるペプチドから、N末端及び/またはC末端のみにおいてアミノ酸1~4残基が欠失しているペプチドであって、前記アミノ酸配列からなるペプチドと同等またはそれ以上のT細胞刺激活性を有する、ペプチド。

【請求項3】

図4のペプチド番号#1-2(配列番号:4)、#1-7(配列番号:9)、#1-8(配列番号:10)、#1-20(配列番号:22)、#1-22(配列番号:24)、#1-24(配列番号:26)、#1-32(配列番号:34)、#1-33(配列番号:35)または#1-34(配列番号:36)で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端及び/またはC末端に、アミノ酸1~10残基が付加されているペプチドであって、以下の性質を有するペプチド:

(i) 前記付加されている残基は、天然のChao1のアミノ酸配列において前記アミノ酸配列からなるペプチドのN末端及び/またはC末端に対応する残基である。

(ii) 前記アミノ酸配列からなるペプチドと同等またはそれ以上のT細胞刺激活性を有する。

【請求項4】

下記(a)、(b)及び(c)からなる群より選ばれる少なくとも二つのペプチドを含む、ペプチド。

(a) 図4のペプチド番号#1-2(配列番号:4)、#1-7(配列番号:9)、#1-8(配列番号:10)、#1-20(配列番号:22)、#1-22(配列番号:24)、#1-24(配列番号:26)、#1-26(配列番号:28)、#1-32(配列番号:34)、#1-33(配列番号:35)、及び#1-34(配列番号:36)、ならびに図8のペプチド番号#2-8(配列番号:45)、#2-9(配列番号:46)、#2-10(配列番号:47)、#2-11(配列番号:48)、#2-13(配列番号:50)、#2-14(配列番号:51)、#2-15(配列番号:52)、#2-16(配列番号:53)、#2-17(配列番号:54)、#2-18(配列番号:55)、#2-19(配列番号:56)、#2-20(配列番号:57)、#2-21(配列番号:58)、#2-22(配列番号:59)、#2-24(配列番号:61)、#2-25(配列番号:62)、#2-26(配列番号:63)、#2-27(配列番号:64)、#2-30(配列番号:67)、#2-31(配列番号:68)、#2-35(配列番号:72)、#2-40(配列番号:77)、#2-41(配列番号:78)、#2-42(配列番号:79)及び#2-43(配列番号:80)で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 上記(a)に示されるアミノ酸配列からなるペプチドから、N末端及び/またはC末端のみにおいてアミノ酸1~4残基が欠失しているペプチドであって、前記アミノ酸配列からなるペプチドと同等またはそれ以上のT細胞刺激活性を有するペプチド。

(c) 上記(a)に示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端及び/またはC末端に、アミノ酸1～10残基が付加されているペプチドであって、以下の性質を有するペプチド：
(i) 前記付加されている残基は、天然のCha o 1又はCha o 2のアミノ酸配列において前記アミノ酸配列からなるペプチドのN末端及び/またはC末端に対応する残基である。
(ii) 前記アミノ酸配列からなるペプチドと同等またはそれ以上のT細胞刺激活性を有する。

【請求項5】

(a)のペプチド番号が#1-2(配列番号：4)、#1-7(配列番号：9)、#1-8(配列番号：10)、#1-20(配列番号：22)、#1-22(配列番号：24)、#1-24(配列番号：26)、#1-26(配列番号：28)、#1-32(配列番号：34)、#1-33(配列番号：35)、#1-34(配列番号：36)、#2-10(配列番号：47)、#2-20(配列番号：57)、#2-21(配列番号：58)、#2-40(配列番号：77)、#2-41(配列番号：78)、#2-42(配列番号：79)及び#2-43(配列番号：80)である、請求項4に記載のペプチド。

【請求項6】

(a)のペプチド番号が#1-7(配列番号：9)、#1-22(配列番号：24)、#1-24(配列番号：26)、#1-32(配列番号：34)、#1-33(配列番号：35)、#2-10(配列番号：47)、#2-20(配列番号：57)、#2-40(配列番号：77)、#2-41(配列番号：78)、#2-42(配列番号：79)及び#2-43(配列番号：80)である、請求項5に記載のペプチド。

【請求項7】

少なくとも二つのペプチドがArg-Arg及びLys-Lysから選ばれるリンカーを介して結合している、請求項4～6のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチドを有効成分として含有する、ヒノキ花粉症の予防または治療剤。

【請求項9】

請求項4に記載されたペプチドから選ばれる少なくとも二つのペプチドを有効成分として含有する、ヒノキ花粉症の予防または治療剤。

【請求項10】

(a)のペプチド番号が#1-2(配列番号：4)、#1-7(配列番号：9)、#1-8(配列番号：10)、#1-20(配列番号：22)、#1-22(配列番号：24)、#1-24(配列番号：26)、#1-26(配列番号：28)、#1-32(配列番号：34)、#1-33(配列番号：35)、#1-34(配列番号：36)、#2-10(配列番号：47)、#2-20(配列番号：57)、#2-21(配列番号：58)、#2-40(配列番号：77)、#2-41(配列番号：78)、#2-42(配列番号：79)及び#2-43(配列番号：80)である、請求項9に記載のヒノキ花粉症の予防または治療剤。

【請求項11】

(a)のペプチド番号が#1-7(配列番号：9)、#1-22(配列番号：24)、#1-24(配列番号：26)、#1-32(配列番号：34)、#1-33(配列番号：35)、#2-10(配列番号：47)、#2-20(配列番号：57)、#2-40(配列番号：77)、#2-41(配列番号：78)、#2-42(配列番号：79)及び#2-43(配列番号：80)である、請求項10に記載のヒノキ花粉症の予防または治療剤。

【請求項12】

さらに薬学的に許容できる担体または希釈剤を含む、請求項8～11のいずれか一項に記載のヒノキ花粉症の予防または治療剤。

【請求項13】

請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチドを有効成分とする、ヒノキ花粉症の診断に用いる試薬。

【請求項14】

下記工程(a)、(b)及び(c)を含む、リンパ球の、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1及び/またはCha o 2のT細胞エピトープペプチドに対する反応性を測定する方法。

(a) 請求項1～7のいずれか一項に記載のペプチドと、末梢血リンパ球を接触させる工

程、

(b) (a)で得られた混合物を培養する工程、

(c) リンパ球への[3H]チミジンの取り込み量を測定する工程。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Q

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA17 BA18 BA23 CA59 NA14 ZB022
 ZB082 ZB092 ZB132
 4C085 AA02 BB11 CC21 HH15 KB82
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA16 BA17 CA30 DA86 EA22 EA31 EA50
 FA33 FA74 GA21 GA26

专利名称(译)	T细胞表位肽		
公开(公告)号	JP2006045230A	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2005222485	申请日	2005-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司明治		
申请(专利权)人(译)	明治乳业株式会社		
[标]发明人	紀光助 大力一雄		
发明人	紀 光助 大力 一雄		
IPC分类号	C07K14/415 C12N15/09 C07K7/08 A61K38/00 A61K39/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61K49/00 G01N33/53		
FI分类号	C07K14/415.ZNA C12N15/00.A C07K7/08 A61K37/02 A61K39/00.H A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61K49/00.A G01N33/53.Q A61K38/00 A61K38/02 A61K38/03 A61K38/10 A61K39/36 A61K49/00 A61P37/00 C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZB022 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB132 4C085/AA02 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/HH15 4C085/KB82 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA30 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA26 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	1996153527 1996-06-14 JP		
其他公开文献	JP4176750B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于春树花粉病的肽免疫治疗的肽，包括与柏花粉具有交叉反应性的雪松花粉病患者，以及用于诊断春树花粉病的肽。通过用覆盖柏树花粉变应原一级结构的重叠肽刺激从柏树花粉病患者建立的T细胞系来鉴定柏树花粉变应原分子上的T细胞表位肽。[选择图]无

