

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 542783

(P2002 - 542783A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	Z 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		48/00	4 B 0 6 4
39/00		49/00	A 4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 37/08	4 C 0 8 5
49/00		C 0 7 K 14/415	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 614395(P2000 - 614395)

(86)(22)出願日 平成12年4月12日(2000.4.12)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月23日(2001.10.23)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/03259

(87)国際公開番号 W000/65060

(87)国際公開日 平成12年11月2日(2000.11.2)

(31)優先権主張番号 199 18 682.0

(32)優先日 平成11年4月23日(1999.4.23)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト  
ベシュレンクテル ハフトング  
MERCK PATENT GESEL  
LSCHAFT MIT BESCHR  
AENKTER HAFTUNG  
ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシ  
ユタット フランクフルター シュトラ  
セ 250

(71)出願人 ピーターセン, アルント  
ドイツ連邦共和国 デー - 23795 バード  
ゼーゲベルク、キークア 8

(74)代理人 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イネ科アレルギーンのDNA配列および組換え体産生

(57)【要約】

本発明は、イネ科植物花粉アレルギーンの同定および特徴づけ、並びにこれをコードする組換えDNA分子、並びに対応するDNAおよびペプチド配列に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 アレルゲンとして作用し、好ましくはイネ科および単子葉植物により発現されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組換えDNA分子。

【請求項2】 オオアワガエリ由来のヌクレオチド配列を有する、請求項1に記載のDNA分子。

【請求項3】 図1に示す、請求項2に記載のヌクレオチド配列。

【請求項4】 請求項3に記載のヌクレオチド配列とハイブリッド形成するヌクレオチド配列を有する、DNA分子。

【請求項5】 請求項3または請求項4に記載のヌクレオチド配列中に存在する部分的配列および部分的配列の組み合わせ。

【請求項6】 個別のコドンの特定の突然変異および除去または付加により修飾された、請求項1～4のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含むDNA分子。

【請求項7】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項3に記載のヌクレオチド配列。

【請求項8】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項4に記載のヌクレオチド配列。

【請求項9】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項5に記載のヌクレオチド配列。

【請求項10】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項6に記載のヌクレオチド配列。

【請求項11】 発現制御配列に機能的に結合した請求項1～4のいずれかに記載の組換えDNA分子からなる、組換えDNA発現ベクターまたはクローニングシステム。

【請求項12】 請求項3に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項13】 請求項4に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項14】 請求項5に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項15】 請求項6に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項16】 請求項7に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項17】 請求項8に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項18】 請求項9に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項19】 請求項10に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項20】 請求項11に記載の発現ベクターで形質転換した原核細胞または真核細胞の培養および培養物からの対応するタンパク質またはポリペプチドの単離によって、ポリペプチド、フラグメントまたはこれらの誘導体を産生する方法。

【請求項21】 請求項12～14のいずれかに記載のポリペプチドを用いるインビボまたはインビトロでの花粉アレルギーの診断方法。

【請求項22】 花粉アレルギーであるヒトまたは動物を治療処置するための、請求項12～19のいずれかに記載のポリペプチド、フラグメントまたは誘導体を含む医薬製剤。

【請求項23】 請求項22に記載の医薬製剤を用いた、花粉アレルギーを有するヒトまたは動物の治療方法。

【請求項24】 請求項11に記載の構成物でDNAワクチン接種することによる、花粉アレルギーの治療方法。

【請求項25】 免疫刺激DNAフラグメントを含む請求項11に記載のベクターでDNAワクチン接種することによる、花粉アレルギーの治療方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、イネ科植物花粉アレルゲンおよびこれをコードする組換えDNA分子の同定および特徴づけに関する。オオアワガエリ(*Phleum pratense*)の花粉は、天然の原料として作用する。本発明はまた、フラグメント、部分的配列および突然変異体をも包含する。組換えDNA分子および誘導されたポリペプチド、フラグメントまたは変種を、花粉アレルギー疾患の療法に用いることができる。さらに、組換え方法により産生されたタンパク質およびフラグメントを、花粉アレルギーの診断に用いることができる。

**【0002】**

1型アレルギーは、世界中で重要である。工業化された国の人口の20%までが、アレルギー性鼻炎、結膜炎または気管支喘息などの病訴に苦しんでいる。これらのアレルギーは、空気中に存在するアレルゲン(エアロアレルゲン(aeroallergen))により生じ、これは、植物花粉、ダニ、ネコまたはイヌなどの種々のソースにより放出される。これらの1型アレルギー患者の40%までがまた、イネ科植物花粉の場合において特異的なIgE反応性を示す(Friedhoff et al., 1986, *J Allergy Clin. Immunol.* 78, 1190-201)。

**【0003】**

1型アレルギーを誘発する物質は、タンパク質、糖タンパク質またはポリペプチドである。粘膜を介しての摂取の後に、これらのアレルゲンは、感化されたヒト中の肥満細胞の表面に結合したIgE分子と反応する。2つのIgE分子が、アレルゲンを介して互いに結合した場合には、この結果、エフェクター細胞によりメディエーター(例えばヒスタミン、プロスタグランジン)およびサイトカインが放出され、従って対応する臨床的症状が発生する。

**【0004】**

あるアレルゲンに対するIgE抗体を有するアレルギー患者の相対的頻度に依存して、メジャーアレルゲンとマイナーアレルゲンとの間に区別をする。チモシー(オオアワガエリ)の場合において、Ph1 p 1(Petersen et al., 1993, *J. Allergy Clin. Immunol.* 92, 789-796)、Ph1 p 5(Matthiesen and

Loewenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21, 297-307; Petersen et al., 1992)、Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54)およびPhl p 2 / 3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335(3), 299-304)が、これまで、メジャーアレルゲンとして特徴づけられ、Phl p 4 (Loewenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62)並びにホソムギ(*Lolium perenne*)からの群10および11 (Ansari et al., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235)が、マイナーアレルゲンとして特徴づけられた。

#### 【0005】

本発明に関して、アレルゲンPhl p 4は、特に重要である。その理由は、これが、約55 kDa (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98 (1), 189-98)の、新規なアレルゲンと類似する分子量を有し、従って本発明において生成したアレルゲンに最も容易に適合するが、免疫学的および生化学的意味において顕著に異なるからである。前述の他のアレルゲンとは対照的に、Phl p 4は、ゲノム配列または転写(cDNA)配列が未だ同定されていない唯一のものである。配列データは、特に、Phl p 1 (Laffer et al., 1994, J. Allergy Clin. Immunol. 94, 1190-98; Petersen et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 95(5), 987-994)、Phl p 5 (Vrtala et al., 1993, J. Immunol. 151(9), 4773-4781)、Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108(1), 55-59)およびPhl p 2 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335(3), 299-304)について入手できる。cDNA配列の補助により、診断および療法に用いることができる組換えアレルゲンを得ることができ( ScheinerおよびKreft, 1995, Allergy 50, 384-391)。

#### 【0006】

アレルギーの有効な治療処置のための古典的な方法は、特異的免疫療法または減感作である(Fiebig, 1995, Allergo J. 4(6), 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4), 558-562)。これらの方法において、天然のアレルゲン抽出物を、患者に、増大する用量で皮下に注射する。しかし、この方法は、アレルギー反応またはさらにはアナフィラキシーショックの危険を伴う。これらの危険を最小にするために、アレルゴイド(allergoid)の形態の新規

な製剤が用いられている。これらは、未処理抽出物と比較して、I g E 反応性が顕著に低下したが、T細胞反応性が同一である、化学的に修正されたアレルゲン抽出物である(Fiebig, 1995, Allergo J. 4(7), 377-382)。

#### 【0007】

さらに大きい程度の療法の最適化は、組換え方法により産生されるアレルゲンを用いて可能である。所望により個別の患者に整合させた組換え方法により産生された高純度のアレルゲンの規定されたカクテルは、天然のアレルゲン源からの抽出物に取って代わる。その理由は、後者が、種々のアレルゲンに加えて、比較的大きい数の免疫原性であるが非アレルギー性の随伴タンパク質を含むからである。発現生成物での安全な減感作を生じることができる実際的な見通しは、I g E エピトープが、療法に必須であるT細胞エピトープを損なわずに特異的に除去される、特異的に突然変異した組換えアレルゲンにより提供される(Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162, 2406-2414)。

#### 【0008】

治療方法によりアレルギー患者中に分布したTh細胞バランスに影響する他の可能性は、関連するアレルゲンをコードする発現可能なDNAでの処理である。免疫応答に対するアレルゲン特異性効果の最初の実験的確認は、アレルゲンをコードするDNAの注射により、齧歯動物において得られた(Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2(5), 540-544)。

#### 【0009】

本発明は、アレルギー性疾患、特に花粉症のインビトロおよびインビボ診断において有利に用いることができる。このために、クローニングした核酸を、発現ベクター中で連結し、この構築物を、適切な細胞のタイプにおいて発現させる。生化学的精製の後に、この組換えアレルゲンは、確立された方法によるI g E 抗体の除去に有用である。一方、本発明はまた、特定の免疫療法のための組換えアレルゲン含有または核酸含有製剤における必須の成分として用いることができる。ここで、多くの可能性が出現する。第1に、修飾されていない一次構造を有するタンパク質は、製剤の構成成分であることができる。第2に、全体の分子のI g E エピトープの特異的除去またはT細胞エピトープをコードする個別のフラグ

メントの生成により、低アレルゲン(hypoallergenic) (アレルゴイド) 形態を、本発明において、療法に用いて、望まない副作用を回避することができる。最後に、核酸自体により、これが真核発現ベクターに連結された場合には、直接用いられた際に、治療的意味でアレルギー免疫状態を修正する製剤が得られる。

#### 【0010】

本発明は、核酸配列(図1)からなり、アレルゲンをコードする、組換えDNA分子に関する。イネ科、例えば特にオオアワガエリ、ホソムギ、カモガヤ(*Dactylis glomerata*)、ナガハグサ(*Poa pratensis*)、ギョウギシバ(*Cynodon dactylon*)、シラゲガヤ(*Holcus lanatus*)の花粉顆粒は、天然の原料として作用する。

#### 【0011】

天然のアレルゲンを精製し、単離した後、N末端タンパク質配列決定を行う。これから推定される核酸配列に基づいて、プライマーを産生する。このプライマーの補助により、対応するcDNAを、花粉のcDNA集団から、PCRにより得、クローニングし、特徴づけした。フラグメントおよび部分的配列を、アレルゲンをコードするこのDNA分子から、本発明に従って産生した。

#### 【0012】

組換えDNA分子またはフラグメントおよび部分的配列を、細胞システム中の適切な発現ベクターにより発現させた後に、アレルゲンまたは低アレルゲン変種またはフラグメントを精製した。

#### 【0013】

チモシー花粉からの天然のアレルゲンの精製を、2段階プロセスにおいて行った。花粉の水性抽出の後、得られた抽出物を2つのフラクションに分離し、フラクションを、カラムに通して、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより溶出させた。カラムを通過したフラクションは、3種のアレルゲン、Phl p 1 (30~35 kDa)、Phl p 2/3 (11~14 kDa) および未知のアレルゲン (55~60 kDa) を含んでいた。これらのタンパク質を、互いにスーパーデックス(Superdex) 75を用いたゲル濾過により分離した。

#### 【0014】

この現在まで未知のアレルゲン(作業名称p55)を、SDS-PAGEによ

り分離除去し、その後P V D F膜上にブロッティングし、精密に定められたフラクションを単離した。N末端アミノ酸配列を、このp 5 5分子から、エドマン分解により決定した(図2)。

#### 【0015】

p 5 5の対応するc D N Aの産生およびクローニングのために、N末端配列(図3)に基づく特定のD N Aプライマー(21量体)を、本発明に従って構成した。用いた第2のプライマーは、逆転写に用いるオリゴd Tプライマー中に局在したアンカー配列であった。P C R反応を、オオアワガエリ花粉からの代表的m R N A集団から産生したc D N Aおよび本発明のプライマーおよびアンカープライマーを用いて厳密な条件下で行った。P C R反応の分析的ゲル電気泳動において、1.65kbの大きさを有する増幅したD N Aを同定した。この増幅したD N Aを、p C R 2.1ベクターに連結し、うまく形質転換した。2種の異なるクローンからの挿入体の配列決定により、同一の配列が得られた。

#### 【0016】

この一次増幅したD N Aにおいて、1492bpの読み取り枠(O R F)(図1参照)が同定された。

#### 【0017】

この核酸から対応する組換えタンパク質(図4)を産生するために、制限酵素による発現ベクターp P r o E x H t bへのp C R 2.1ベクターの再クローニングを、先ず行った。発現および発現生成物の生化学的精製の後に、開発されたタンパク質のアレルゲン性性質の多くの分析を行った。すべての分析、例えばウエスタンブロットおよびドットブロットにおいて、組換えタンパク質は、イネ科植物花粉アレルギーの臨床的症状を診断した患者からのI g Eと特異的に反応した。用いた対照は、天然のp 5 5であった。従って、組換えタンパク質は、明らかにアレルゲンである。従って、この発現生成物は、イネ科植物花粉アレルギー患者の高度に特異的な改善された診断に作用する。

#### 【0018】

改善された治療的使用のための低アレルゲン変種を産生することを意図して、定められたフラグメントおよび部分的配列の組み合わせを、発現ベクターにおい

てクローニングした核酸から出発して、本発明に従って開発した。さらに、部位特異的点変異を、主にシステインをコードするトリプレットにおいて導入した。従って、本発明のこの部分は、減少したかまたは欠乏したI g E反応性による診断の目的のために開発された発明から区別される。従って、減少したののために明らかに低いかまたは欠乏した副作用を有する製剤は、減感作のために有用である。低アレルゲンタンパク質変種をコードする核酸またはp 5 5をコードする修飾されていない核酸を、ヒト発現ベクターと連結する場合には、これらの製剤を、同様に、特定の免疫療法用の製剤として用いることができる。

#### 【0019】

従って、本発明は、以下の通りである。

- a) アレルゲンとして作用し、好ましくはイネ科(Gramineae(Poaceae))および単子葉植物により表現されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組換えDNA分子；
- b) オオアワガエリ由来のヌクレオチド配列を有する、示したDNA分子；
- c) 図1に示す、示したDNA分子のヌクレオチド配列；
- d) 図1において定義した、最後に述べたヌクレオチド配列とハイブリッド形成するヌクレオチド配列を有する、DNA分子；
- e) c) またはd) に記載のヌクレオチド配列中に存在する部分的配列および部分的配列の組み合わせ；

#### 【0020】

- f) 個別のコドンの特定の突然変異および除去または付加により修飾された、ヌクレオチド配列a) ~ d) を含むDNA分子；
- g) 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、c) に記載のヌクレオチド配列；
- h) 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、d) に記載のヌクレオチド配列；
- i) 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、e) に記載のヌクレオチド配列；

#### 【0021】

j) 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、f)に記載のヌクレオチド配列；

k) 発現制御配列に機能的に結合したa)～d)において定義した組換えDNA分子からなる、組換えDNA発現ベクターまたはクローニングシステム；

l) c)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

m) d)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

n) e)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

o) f)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

p) g)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

【0022】

q) h)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

r) i)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

s) j)に記載の核酸からコードされるポリペプチド；

t) 請求項11に記載の発現ベクターで形質転換した原核細胞または真核細胞の培養、および培養物からの対応するタンパク質またはポリペプチドの単離により、ポリペプチド、フラグメントまたはこれらの誘導体を産生する方法；

u) l)～n)に記載のポリペプチドを用いるインビボまたはインビトロでの花粉アレルギーの診断方法；

【0023】

v) 花粉アレルギーであるヒトまたは動物を治療処置するための、l)～t)に記載のポリペプチド、フラグメントまたは誘導体を含む医薬製剤；

w) v)において定義した医薬製剤を用いる、花粉アレルギーであるヒトまたは動物の治療方法；

x) k)において定義した構成物でのDNAワクチン接種による、花粉アレルギーの治療方法；

y) 免疫刺激(immunostimulatory)DNAフラグメントを含むk)において定義したベクターでDNAワクチン接種することによる、花粉アレルギーの治療方法

。

【0024】

従って、本発明は、アレルゲン成分を分解する患者特異的感作スペクトルの同定の一部としてインビトロ診断を改善する作用を有する。本発明は、同様に、イネ科植物花粉アレルギー患者の特異的免疫療法のための顕著に改善された製剤を製造する作用を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 p 5 5 の核酸配列

【図2】 N末端アミノ酸配列 p 5 5

【図3】 p 5 5 特異的プライマー

【図4】 推定されたアミノ酸配列

## 【図1】

## p 55の核酸配列

GGGGAAGAAGG AGGAGAAGAA GGAGGAGAAG AAGGAGAGTG  
 GAGATGCTGC GTCCGGGGCC  
 GACGGAACTT ACGACATCAC CAAGCTCGGC GCCAAACCCG  
 ACGGCAAGAC GGAATGCACC  
 AAGGAGGTGG AGGAGGCATG GGCTTCGGCT TGCCGTGGTA  
 CCGGGAAGAA TACGATCGTC  
 ATCCCCAAGG GTGATTTCTT GACCGGGCCT CTGAATTTCA  
 CCGGGCCATG CAAGGGCGAC  
 AGCGTCACCA TCAAGCTGGA CGGCAACCTG CTGAGCTCCA  
 ACGACCTGGC CAAGTACAAG  
 GCTAACTGGA TCGAGATCAT GCGGATCAAG AAATCACTA  
 TCACCGGCAA AGGCACGCTC  
 GACGGCCAAG GCAAGGCCGT GTGGGGCAAG AACAGCTGCG  
 CCAAGAATA CAATGCAAG  
 ATCTTGCCAA ACACATTGGT GCTGGACTTC TGTGACGACG  
 CTCTCATCGA AGGCATCACC  
 CTCCTAAACG CCAAGTTCTT CCATATGAAC ATCTACGAGT  
 GCAAGGGCGT GACCGTCAAG  
 GACGTGACCA TCACCGCGCC CGGGGACAGC CCCAACACCG  
 ACGGCATCCA CATCGGCGAC  
 TCGTCCAAGG TCACCATCAC CGACACCACC ATCGGCACCG  
 GCGACGACTG CATCTCCATC  
 GGCCCCGGAA GCACCGGCCT CAACATCACC GCGGTGACCT  
 GCGGTCCAGG CCACGGCATC  
 AGCGTTGGCA GCCTGGGACG GTACAAGGAC GAGAAGGACG  
 TGACCGACAT CACCGTAAAG  
 AACTGCGTGC TCAAGAAGTC CACCAACGGC CTCCGGATCA  
 AGTCGTACGA GGACGCCAAG  
 TCGCCGCTGA CGGCGTCGAA GCTGACCTAC GAGAACGTGA  
 AGATGGAGGA CGTGGGCTAC  
 CCCATCATCA TCGACCAGAA GTACTGCCCC AACAGATCT  
 GCACCTCAA GGGAGACTCC  
 GCCAGGGTCA CCGTCAAGGA CGTCACCTTC CGCAACATCA  
 CCGGCACCTC CTCCACCCCC  
 GAGGCCGTCA GCCTGCTCTG CTCCGACAAG CAGCCCTGCA  
 ATGGTGTAC CATGAACGAC  
 GTCAGATCG AGTACAGCGG CACCAACAAC AAGACCATGG  
 CTGTCTGCAC CAACGCCAAG  
 GTCACCGCCA AGGGTGTGAG CGAGGCTAAC ACCTGCGCCG  
 CCTGATG

## 【図2】

## N末端アミノ酸配列 p 55

GKKEKKDEK KESGDAASXA

## 【図3】

p 55特異的プライマー

GGI AAI AAI GAI GAI AAI AAI GAI GA

## 【図4】

推定されたアミノ酸配列

配列 395 AA; 41619 MW; 829349 CN;

GKKEEKKEEK KESGDAASGA DGTVDITKLG AKPDGKTDCT KEVEEAWASA  
 CGGTGKNTIV  
 IPKGDFLTGP LNFTGPCKGD SVTIKLDGNL LSSNDLAKYK ANWIEIMRIK  
 KLTITGKGTL  
 DGQKAVWGK NSCAKNYNCK ILPNTLVLDL CDDALIEGIT LLNAKFFHMN  
 IYECKGVTVK  
 DVTITAPGDS PNTDGIHIGD SSKVTITDTT IGTGDDCISI GPGSTGLNIT  
 GGACGFGHGI  
 SVGSLGRYKD EKDVTDITVK NCVLKKSTNG LRIKSYEDAK SPLTASKLTY  
 ENVKMEDVGY  
 PIIIDOKYCP NKICTSKGDS ARVTVKDVTF RNITGTSSTP EAVSLLCSDK  
 QPCNGVTMND  
 VKIEYSGTNN KTMVAVCTNAK VIKGVSEAN TCAA\*

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年3月21日(2001.3.21)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 アレルゲンとして作用し、好ましくはイネ科および単子葉植物により発現されるポリペプチドをコードする、図1に示すヌクレオチド配列を含む、組換えDNA分子。

【請求項2】 オオアワガエリ由来のヌクレオチド配列を有する、請求項1に記載のDNA分子。

【請求項3】 請求項1に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を有する、DNA分子。

【請求項4】 請求項1または請求項3に記載のヌクレオチド配列中に存在する、部分的配列および部分的配列の組み合わせ。

【請求項5】 個別のコドンの特定の突然変異および除去または付加により修飾された、請求項1～3のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含むDNA分子。

【請求項6】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項1に記載のヌクレオチド配列。

【請求項7】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項3に記載のヌクレオチド配列。

【請求項8】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項4に記載のヌクレオチド配列。

【請求項9】 免疫調節性T細胞反応性フラグメントをコードする、請求項5に記載のヌクレオチド配列。

【請求項10】 発現制御配列に機能的に結合した請求項1～3のいずれか

に記載の組換えDNA分子からなる、組換えDNA発現ベクターまたはクローニングシステム。

【請求項11】 請求項1に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項12】 請求項3に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項13】 請求項4に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項14】 請求項5に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項15】 請求項6に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項16】 請求項7に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項17】 請求項8に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項18】 請求項11に記載の核酸からコードされるポリペプチド。

【請求項19】 請求項10に記載の発現ベクターで形質転換した原核細胞または真核細胞の培養、および培養物からの対応するタンパク質またはポリペプチドの単離によって、ポリペプチド、フラグメントまたはこれらの誘導体を産生する方法。

【請求項20】 請求項11～13のいずれかに記載のポリペプチドを用いるインビボまたはインビトロでの花粉アレルギーの診断方法。

【請求項21】 花粉アレルギーを有するヒトまたは動物を治療処置するための、請求項11～18のいずれかに記載のポリペプチド、フラグメントまたは誘導体を含む医薬製剤。

【請求項22】 請求項21に記載の医薬製剤を用いる、花粉アレルギーを有するヒトまたは動物の治療方法。

【請求項23】 請求項10に記載の構成物でDNAワクチン接種することによる、花粉アレルギーの治療方法。

【請求項24】 免疫刺激DNAフラグメントを含む請求項10に記載のベクターでDNAワクチン接種することによる、花粉アレルギーの治療方法。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 00/03259
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/29 C07K14/415 A61K39/36		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, MEDLINE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S VRTALA ET AL: "Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (Phleum pratense) allergens (Phi p 1, Phi p 2, Phi p 5)" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 97, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 781-787, XP000953173 ISSN:0091-6749 the whole document	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<sup>a</sup> Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2000		Date of mailing of the international search report 10/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cupido, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M-F NIOGRET ET AL.: "Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 17, no. 6, December 1991 (1991-12), pages 1155-1164, XP002151351 ISSN:0167-4412 76.4% Identität in 1155 Basenparen überlappend mit SEQ ID NO:1 figure 3 ---	4-20
X,P	R SUCK ET AL.: "Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen Phl p 13 from timothy grass (Phleum pratense)" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 30, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 324-332, XP000953168 ISSN:0954-7894 the whole document ---	1-20
A	S FISHER ET AL.: "Characterization of Phl p4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 98, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 189-198, XP000953216 ISSN:0091-6749 the whole document -----	1-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT//EP 00/03259
---

Continuation of box I.1

Although claim 21, insofar as it concerns an *in vivo* method, relates to a method of diagnosis, performed on the human/animal body and claims 23-25 relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compounds/compositions.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト <sup>7</sup> (参考)
A 6 1 P	37/08	C 1 2 P	21/02 C
C 0 7 K	14/415	G 0 1 N	33/53 Q
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00 Z N A A
G 0 1 N	33/53	A 6 1 K	37/02
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany		
(71)出願人	ピーターセン, アルント ドイツ連邦共和国 デー - 23795 バード ゼーゲベルク、キークア 8		
(72)発明者	ズック, ローラント ドイツ連邦共和国 デー - 22303 ハンブ ルク、ミューレンカンブ 19		
(72)発明者	フィービヒ, ヘルムート ドイツ連邦共和国 デー - 21493 シュバ ルツェンベック、バッカーヴェーク 10		
(72)発明者	クロムウェル, オリバー ドイツ連邦共和国 デー - 21465 ヴェン トルフ、ロヨーンスヒューエ 2		
(72)発明者	ピーターセン, アルント ドイツ連邦共和国 デー - 23795 バート ゼーゲベルク、キークア 8		

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 HA01  
HA17  
4B064 AG31 CA19 CC24 DA01 DA13  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22  
CA53 NA14 ZA34 ZB13 ZC78  
4C085 AA03 BB03 BB11 DD62 EE01  
HH15 KA01 KB82 LL09  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA31  
DA86 EA22 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	DNA序列和草过敏原的重组生产		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002542783A</a>	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000614395	申请日	2000-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	彼得森铝业		
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu 彼得森, 阿恩特		
[标]发明人	ズックローラント フィービヒヘルムート クロムウェルオリバー ピーターセンアルント		
发明人	ズック,ローラント フィービヒ,ヘルムート クロムウェル,オリバー ピーターセン,アルント		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/095 A61K39/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P37/08 C07K2/00 C07K14/415 C12N9/24 C12N15/09 C12N15/29 C12N15/63 C12P21/00 C12P21/02		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/53 A61P37/08 C07K14/415 C12N9/2402		
FI分类号	A61K39/00.Z A61K48/00 A61K49/00.A A61P37/08 C07K14/415 C12P21/02.C G01N33/53.Q C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/HA01 4B024/HA17 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA34 4C084/ZB13 4C084/ZC78 4C085/AA03 4C085/BB03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/HH15 4C085/KA01 4C085/KB82 4C085/LL09 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA31 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	19918682 1999-04-23 DE		
其他公开文献	JP2002542783A5 JP4588888B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及草花粉变应原的鉴定和表征，以及编码它们的重组DNA分子以及相应的DNA和肽序列。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Appl. No. PCT/EP 00/03259
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12N15/29 C07K14/415 A61K39/36		
According to international Classification (IPC) or to both national classification and IPC: B. FIELD SEARCHES IPC: C12N C07K A61K		
Documentation searched (other than within documentation to the extent that such documents are included in the field searches) Electronic databases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. VITALA ET AL.: "Immunologic characterization of purified recombinant Elysius grass pollen (Pleum pratense) allergen (rE1 p11 p2- p11 p5)" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 97, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 781-787, XP00053123 ISSN: 0091-6745 the whole document	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" indicates documents of general interest of the art which are not considered to be of particular relevance.</p> <p>"B" indicates documents not published in either the international or national patent literature.</p> <p>"C" indicates documents which may have a bearing on the invention, but which are not considered to be of particular relevance.</p> <p>"D" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"E" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"F" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"G" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"H" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"I" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"J" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"K" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"L" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"M" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"N" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"O" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"P" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"Q" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"R" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"S" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"T" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"U" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"V" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"W" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"X" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"Y" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p> <p>"Z" indicates documents which are cited for their disclosure of a particular technical feature.</p>		
Date of the actual completion of the international search: 27 October 2000		Date of mailing of the international search report: 10/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1359, Strassburg 2 744 01, D-65185, Mannheim, Germany Fax: +49 (0) 621 590-2000, Telex: 651 85010 E-mail: isa@epo.org		Authorized officer Cupido, M