(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(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.[7] | 識別記号 | ＦＩ | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| Ｃ１２Ｎ 15/09 | ZNA | Ａ６１Ｋ 39/00 | Ｚ | ４Ｂ０２４ |
| Ａ６１Ｋ 38/00 | | 48/00 | | ４Ｂ０６４ |
| 39/00 | | 49/00 | Ａ | ４Ｃ０８４ |
| 48/00 | | Ａ６１Ｐ 37/08 | | ４Ｃ０８５ |
| 49/00 | | Ｃ０７Ｋ 14/415 | | ４Ｈ０４５ |

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　WO00/65060
(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　ミット　ベシュレンクテル　ハフトング
ＭＥＲＣＫ　ＰＡＴＥＮＴ　ＧＥＳＥＬＬＳＣＨＡＦＴ　ＭＩＴ　ＢＥＳＣＨＲＡＥＮＫＴＥＲ　ＨＡＦＴＵＮＧ
ドイツ連邦共和国　デー－64293　ダルムシュタット　フランクフルター　シュトラーセ　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】　イネ科アレルゲンの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ゲ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イター（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、Ｐｈｌ　ｐ　１(Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92, 789-796)、Ｐｈｌ　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５５ｋＤａ(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る(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、ＩｇＥ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、ＩｇＥ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ＩｇＥ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ＩｇＥ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（３０～３５ｋＤａ）、Ｐｈｌ　ｐ　２／３（１１～１４ｋＤａ）および未知のアレルゲン（５５～６０ｋＤａ）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ＰＶＤＦ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ｐ５５分子から、エドマン分解により決定した（図２）。

【００１５】

ｐ５５の対応するｃＤＮＡ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ＤＮＡ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ｄＴプライマー中に局在したアンカー配列であった。ＰＣＲ反応を、オオアワガエリ花粉からの代表的mＲＮＡ集団から産生したｃＤＮＡ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。ＰＣＲ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ＤＮＡを同定した。この増幅したＤＮＡを、ｐＣＲ２．１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ＤＮＡにおいて、１４９２ｂｐの読み取り枠（ＯＲＦ）（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ｐＰｒｏＥｘ　Ｈｔｂへのｐ ＣＲ２．１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ＩｇＥと特異的に反応した。用いた対照は、天然のｐ５５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ＩｇＥ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ｐ５５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的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】ｐ５５の核酸配列

【図２】N末端アミノ酸配列　ｐ５５

【図３】ｐ５５特異的プライマー

【図４】推定されたアミノ酸配列

【図１】

ｐ55の核酸配列

GGGAAGAAGG AGGAGAAGAA GGAGGAGAAG AAGGAGAGTG
GAGATGCTGC GTCCGGGGCC
GACGGAACCT ACGACATCAC CAAGCTCGGC GCCAAACCCG
ACGGCAAGAC GGACTGCACC
AAGGAGGTGG AGGAGGCATG GGCTTCGGCT TGCGGTGGTA
CCGGGAAGAA TACGATCGTC
ATCCCCAAGG GTGATTTCCT GACCGGGCCT CTGAATTTCA
CCGGGCCATG CAAGGGCGAC
AGCGTCACCA TCAAGCTGGA CGGCAACCTG CTGAGCTCCA
ACGACCTGGC CAAGTACAAG
GCTAACTGGA TCGAGATCAT GCGGATCAAG AAACTCACTA
TCACCGGCAA AGGCACGCTC
GACGGCCAAG GCAAGGCCGT GTGGGGCAAG AACAGCTGCG
CCAAGAACTA CAACTGCAAG
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 GGCGTGACCT
GCGGTCCAGG CCACGGCATC
AGCGTTGGCA GCCTGGGACG GTACAAGGAC GAGAAGGACG
TGACCGACAT CACCGTAAAG
AACTGCGTGC TCAAGAAGTC CACCAACGGC CTCCGGATCA
AGTCGTACGA GGACGCCAAG
TCGCCGCTGA CGGCGTCGAA GCTGACCTAC GAGAACGTGA
AGATGGAGGA CGTGGGCTAC
CCCATCATCA TCGACCAGAA GTACTGCCCC AACAAGATCT
GCACCTCCAA GGGAGACTCC
GCCAGGGTCA CCGTCAAGGA CGTCACCTTC CGCAACATCA
CCGGCACCTC CTCCACCCCC
GAGGCCGTCA GCCTGCTCTG CTCCGACAAG CAGCCCTGCA
ATGGTGTCAC CATGAACGAC
GTCAAGATCG AGTACAGCGG CACCAACAAC AAGACCATGG
CTGTCTGCAC CAACGCCAAG
GTCACCGCCA AGGGTGTCAG CGAGGCTAAC ACCTGCGCCG
CCTGATG

【図２】

N末端アミノ酸配列ｐ55

GKKEEKKDEK KESGDAASXA

【図３】

p55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 DGTYDITKLG AKPDGKTDCT KEVEEAWASA
CGGTGKNTIV
IPKGDFLTGP LNFTGPCKGD SVTIKLDGNL LSSNDLAKYK ANWIEIMRIK
KLTITGKGTL
DGQGKAVWGK NSCAKNYNCK ILPNTLVLDF CDDALIEGIT LLNAKFFHMN
IYECKGVTVK
DVTITAPGDS PNTDGIHIGD SSKVTITDTT IGTGDDCISI GPGSTGLNIT
GGACGPGHGI
SVGSLGRYKD EKDVTDITVK NCVLKKSTNG LRIKSYEDAK SPLTASKLTY
ENVKMEDVGY
PIIIDQKYCP NKICTSKGDS ARVTVKDVTF RNITGTSSTP EAVSLLCSDK
QPCNGVTMND
VKIEYSGTNN KTMAVCTNAK VTAKGVSEAN 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。

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/EP 00/03259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/29 C07K14/415 A61K39/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | 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 (Phl p 1, Phl p2, Phl p5)" 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 |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

° 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 27 October 2000 | 10/11/2000 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| 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 | Cupido, M |

2

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna[illegible]al 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 |

2

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

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.[7] | 識別記号 | ＦＩ | | ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考) |
|---|---|---|---|---|
| Ａ６１Ｐ | 37/08 | | | |
| Ｃ０７Ｋ | 14/415 | | | |
| Ｃ１２Ｐ | 21/02 | Ｃ１２Ｐ | 21/02 | Ｃ |
| Ｇ０１Ｎ | 33/53 | Ｇ０１Ｎ | 33/53 | Ｑ |
| | | Ｃ１２Ｎ | 15/00 | ＺＮＡＡ |
| | | Ａ６１Ｋ | 37/02 | |

(81)指定国　ＥＰ(ＡＴ, ＢＥ, ＣＨ, ＣＹ, ＤＥ, ＤＫ, ＥＳ, ＦＩ, ＦＲ, ＧＢ, ＧＲ, ＩＥ, ＩＴ, ＬＵ, ＭＣ, ＮＬ, ＰＴ, ＳＥ), ＯＡ(ＢＦ, ＢＪ, ＣＦ, ＣＧ, ＣＩ, ＣＭ, ＧＡ, ＧＮ, ＧＷ, ＭＬ, ＭＲ, ＮＥ, ＳＮ, ＴＤ, ＴＧ), ＡＰ(ＧＨ, ＧＭ, ＫＥ, ＬＳ, ＭＷ, ＳＤ, ＳＬ, ＳＺ, ＴＺ, ＵＧ, ＺＷ), ＥＡ(ＡＭ, ＡＺ, ＢＹ, ＫＧ, ＫＺ, ＭＤ, ＲＵ, ＴＪ, ＴＭ), ＡＥ, ＡＬ, ＡＭ, ＡＴ, ＡＵ, ＡＺ, ＢＡ, ＢＢ, ＢＧ, ＢＲ, ＢＹ, ＣＡ, ＣＨ, ＣＮ, ＣＲ, ＣＵ, ＣＺ, ＤＥ, ＤＫ, ＤＭ, ＥＥ, ＥＳ, ＦＩ, ＧＢ, ＧＤ, ＧＥ, ＧＨ, ＧＭ, ＨＲ, ＨＵ, ＩＤ, ＩＬ, ＩＮ, ＩＳ, ＪＰ, ＫＥ, ＫＧ, ＫＰ, ＫＲ, ＫＺ, ＬＣ, ＬＫ, ＬＲ, ＬＳ, ＬＴ, ＬＵ, ＬＶ, ＭＡ, ＭＤ, ＭＧ, ＭＫ, ＭＮ, ＭＷ, ＭＸ, ＮＯ, ＮＺ, ＰＬ, ＰＴ, ＲＯ, ＲＵ, ＳＤ, ＳＥ, ＳＧ, ＳＩ, ＳＫ, ＳＬ, ＴＪ, ＴＭ, ＴＲ, ＴＴ, ＴＺ, ＵＡ, ＵＧ, ＵＳ, ＵＺ, ＶＮ, ＹＵ, ＺＡ, ＺＷ

(71)出願人　Ｆｒａｎｋｆｕｒｔｅｒ　Ｓｔｒ．　250, Ｄ－64293　Ｄａｒｍｓｔａｄｔ, Ｆｅｄｅｒａｌ　Ｒｅｐｕｂｌｉｃ　ｏｆ　Ｇｅｒｍａｎｙ
(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、ミューレンカンプ　19
(72)発明者　フィービィヒ，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、ロョーンスヒューエ　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) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2002542783A5 | 公开(公告)日 | 2010-09-09 |
| 申请号 | JP2000614395 | 申请日 | 2000-04-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 彼得森铝水泥 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu<br>彼得森，阿恩特 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu<br>彼得森，阿恩特 | | |
| [标]发明人 | ズックローラント<br>フィービィヒヘルムート<br>クロムウェルオリバー<br>ピーターセンアルント | | |
| 发明人 | ズック,ローラント<br>フィービィヒ,ヘルムート<br>クロムウェル,オリバー<br>ピーターセン,アルント | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A61K39/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P37/08 C07K14/415 C12P21/02 G01N33/53 A61K38/00 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 C12N9/2402 A61K2039/53 C12N9/24 C07K14/415 A61P37/08 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.Z A61K48/00 A61K49/00.A A61P37/08 C07K14/415 C12P21/02.C G01N33/53.Q 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 | JP4588888B2<br>JP2002542783A | | |


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。