

(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2006-510346

(P2006-510346A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-514687 (P2004-514687)
 (86) (22) 出願日 平成15年6月11日 (2003.6.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年2月24日 (2005.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/006092
 (87) 国際公開番号 W02004/000881
 (87) 国際公開日 平成15年12月31日 (2003.12.31)
 (31) 優先権主張番号 02013953.1
 (32) 優先日 平成14年6月25日 (2002.6.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591032596
 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 Gesell
 schaft mit beschræ
 nkter 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
 Frankfurter Str. 25
 0, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic o
 f Germany
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え方法による花粉アレルゲン Ph l p 4 の DNA 配列および製造

(57) 【要約】

本発明は、主要な花粉アレルゲン Ph l p 4 の遺伝子配列を提供することに関する。本発明はまた、低アレルゲン性作用を有する断片、部分配列の新規な組み合わせおよび点突然変異体を包含する。組換え DNA 分子および誘導されたポリペプチド、断片、部分配列の新規な組み合わせおよびパリアントを、花粉アレルギー疾患の治療のために用いることができる。組換え方法により製造されたタンパク質を、花粉アレルギーのインビトロおよびインビボ診断のために用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 5 からなる群から選択されたヌクレオチド配列に相当する、DNA 分子。

【請求項 2】

位置 70 から開始して、オオアワガエリからの主要なアレルゲン Phl p 4 の特性を有するポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載のヌクレオチド配列を含む DNA 分子。

【請求項 3】

オオアワガエリからの主要なアレルゲン Phl p 4 をコードするヌクレオチド配列に相当する、DNA 分子。

10

【請求項 4】

ストリンジェントな条件下で請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA 分子とハイブリダイズし、イネ科種の DNA 配列に由来する、DNA 分子。

【請求項 5】

オオアワガエリからの主要なアレルゲン Phl p 4 と免疫学的に交差反応し、イネ科種の DNA 配列に由来するポリペプチドをコードする、DNA 分子。

【請求項 6】

4 群イネ科アレルゲンの、免疫調節性の T 細胞反応性の断片をコードする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の部分配列または部分配列の組み合わせに相当する、DNA 分子。

【請求項 7】

- Phl p 4 のアミノ酸 1 ~ 200 を有する断片 1 ~ 200、
- Phl p 4 のアミノ酸 185 ~ 500 を有する断片 185 ~ 500

からなる群から選択された Phl p 4 断片をコードする、請求項 6 に記載の DNA 分子。

20

【請求項 8】

免疫調節性の T 細胞反応性断片をコードする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のヌクレオチド配列に相当する DNA 分子であって、前記ヌクレオチド配列が、個別のコドンの特異的な変異、欠失または付加により特異的に改変されていることを特徴とする、前記 DNA 分子。

【請求項 9】

変異が、対応するポリペプチドの 1 個、2 個以上またはすべてのシステインの他のアミノ酸による置換をもたらすことを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 分子。

30

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 分子を含む、発現制御配列に機能的に結合している組換え 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 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 分子または請求項 10 に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主生物体。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の宿主生物体の、培養および培養物からの対応するポリペプチドの単離による、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 配列によりコードされたポリペプチドの製造方法。

40

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 配列によりコードされる、ポリペプチド。

【請求項 14】

医薬としての、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

イネ科の 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーの診断および / または処置のための、請求項 14 に記載のポリペプチド少なくとも 1 種および随意に他の活性成分および / またはアジュバントを含む、医薬組成物。

【請求項 16】

50

請求項 14 に記載のポリペプチド少なくとも 1 種の、イネ科の 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーの診断および/または処置および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造への使用。

【請求項 17】

医薬としての、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 分子。

【請求項 18】

医薬としての、請求項 10 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の DNA 分子少なくとも 1 種または請求項 18 に記載の発現ベクター少なくとも 1 種、および随意に他の活性成分および/またはアジュバントを含む、イネ科の 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーを有する患者の免疫療法的 DNA ワクチン接種および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬組成物。

10

【請求項 20】

請求項 17 に記載の DNA 分子少なくとも 1 種または請求項 18 に記載の発現ベクター少なくとも 1 種の、イネ科の 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーを有する患者の免疫療法的 DNA ワクチン接種および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造への使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

発明の背景

本発明は、主要な花粉アレルゲン Phl p 4 の遺伝子配列を提供することに関する。本発明はまた、低アレルゲン性 (hypoallergenic) 作用を有する断片、部分配列の新規な組み合わせおよび点突然変異体を包含する。組換え DNA 分子および誘導されたポリペプチド、断片、部分配列の新規な組み合わせおよびバリエーションを、花粉アレルギー疾患の治療のために用いることができる。組換え方法により製造されるタンパク質を、花粉アレルギーのインビトロおよびインビボ診断のために、用いることができる。

【0002】

1 型アレルギーは、世界的に重要である。工業化された国の人口の 20% までは、アレルギー性鼻炎、結膜炎または気管支喘息などの症状を患っている。これらのアレルギーは、種々の起源、例えば植物花粉、ダニ、ネコまたはイヌから放出される、空気中に存在するアレルゲン (エアロアレルゲン (aeroallergen)) により生じる。次に、これらの 1 型アレルギー患者の 40% までが、花粉アレルゲンとの特異的な IgE 反応性を示す (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001)。

30

【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。粘膜を通過しての取り込みの後に、これらのアレルゲンは、感作された個体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、アレルゲンにより互いに架橋された場合には、エフェクター細胞によるメディエータ (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の放出ならびにこれにより対応する臨床症状がもたらされる。

40

【0004】

個別のアレルゲン分子がアレルギー患者の IgE 抗体と反応する相対的頻度に依存して、主要なアレルゲンと主要でないアレルゲンとの間で、区別がなされる。

【0005】

オオアワガエリ (*Phleum pratense*) の場合において、

【表 1】

Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), Phl p 5 (Matthiesen and Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54). Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), Phl p 4 (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) および Phl p 13 (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402)

10

が、主要なアレルゲンとして現在までに同定されている。

【0006】

Phl p 4は、50～60 kDaの分子量を有する塩基性糖タンパク質であると述べられている (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268)。Phl p 4分子は、トリプシン耐性であり (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198)、70～88%の花粉アレルギー患者は、この分子に対するIgE抗体を有する。

20

【表 2】

(Valenta et al., 1993, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294; Rossi et al., 2001, Allergy 56:1180-1185; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy 33:43-51).

関連するイネ科種からの相同分子が、記載されている。

30

【表 3】

(Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14-17).

イネ科のこれらの相同分子は、アレルゲン4群を形成し、これらの分子は、互いに、モノクローナルマウス抗体およびヒトIgE抗体の両方との、高度な免疫学的交差反応性を有する。

40

【表4】

(Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrović-Jankulović et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6): 361-367; Stumvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383: 1383-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383: 1441-1445; Andersson and Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130: 87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1): 43-51).

10

【0007】

オオアワガエリの前述の主要なアレルゲン (Phl p 1、Phl p 2/3、Phl 5a および 5b、Phl p 6 並びに Phl p 13) とは対照的に、Phl p 4 の一次構造は、未だ説明されていない。同様に、他のイネ科種由来の 4 群の分子の完全な配列はない。

【0008】

N 末端アミノ酸配列の決定は、現在まで、不成功であった。しかし、この原因は、知られていない。Fischer ら (J. Allergy Clin. Immunol., 1996; 98: 189-198) は、N 末端ブロックを推測し、リジルエンドペプチダーゼでの分解の後に内部ペプチドを精製し、この配列: I V A L P X G M L K (配列番号 7) を決定することができた。

20

このペプチドは、ブタクサアレルゲン Amb a 1 および Amb a 2 におけるペプチド配列に対する相同性並びにトウモロコシ (Zm 58.2)、トマト (Lat 59、Lat 56) およびタバコ (G10) 由来のタンパク質における配列に対する類似性を有する (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol., 98: 189-198)。ホソムギ (*Lolium perenne*) について、以下の配列を有するペプチド断片が、塩基性 4 群アレルゲンについて記載された: F L E P V L G L I F P A G V (配列番号 8) および G L I E F P A G V (配列番号 9) (Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348)。

30

【0009】

同様に、カモガヤ (*Dactylis glomerata*) 由来の 4 群アレルゲンから、酵素的分解によりペプチドが得られ、配列決定された:

【表5】

DIYNMEPYVSK (P15, 配列番号 10),

VDPTDYFGNEQ (P17, 配列番号 11),

ARTAWVDSGAQLGELSY (P20, 配列番号 12)

40

及び GVLFNIIQYVNYWFAP (P22, 配列番号 13) (Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

【0010】

また、亜熱帯性ギョウギシバ (*Cynodon dactylon*) の 4 群アレルゲンからタンパク質分解によりペプチドが得られ、配列決定された:

【表 6】

KTVKPLYIITP (S, 配列番号 14),
 KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS (V49L, 配列番号 15),
 TVKPLYIITPITAAMI (T33S, 配列番号 16),
 LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRL (T35L, 配列番号 17),
 KWQTVAPALPDPNM (P2, 配列番号 18),
 VTWIESVPYIPMGDK (V26L, 配列番号 19),
 GTVRDLLXRTSNIKAFGKY (L25L, 配列番号 20),
 TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS (T22L, 配列番号 21),
 YRDLDLGVNQVVG (P3, 配列番号 22),
 SATPPTHRSGVLFNI (V20L, 配列番号 23),
 及び AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDL (V14L, 配列
 番号 24) (Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication
 280: 738-743).

10

20

【0011】

しかし、Phl p 4 および 4 群アレルゲンについての、これらの記載されたペプチド配列は、現在まで、4 群アレルゲンの完全な一次構造の解明をもたらさなかった。

従って、本発明が基づく目的は、Phl p 4 の完全な DNA 配列および、Phl p 4 アレルゲンをタンパク質として発現し、そのまままたは改変された形態で、薬理的に重要な使用に有用とすることができるための、対応する組換え DNA を提供することを含んでいた。

【0012】

図面のリスト

図 1 : Phl p 4 遺伝子の内部 DNA 配列 (配列番号 25)

ゲノム DNA を用いて得られたアンプリコン (amplicon) を、共にイタリック体で示した変性プライマー No. 30 (センス) および No. 37 (アンチセンス) を用いてクローン化し、配列決定した。示した配列は、6 つのクローンからのコンセンサスを表す。この配列から作成された、特異的なセンスプライマー No. 82 を、下線で示す。

【0013】

図 2 : Phl p 4 遺伝子の核酸配列 (配列番号 26) の 3' 末端

アンプリコンを、特異的なセンスプライマー No. 82 (イタリック体で示す) を用いて得、3' - RACE PCR におけるアンカープライマーを、オオアワガエリ cDNA を用いて得、配列決定した。示した配列は、3 つの配列決定プロセスからのコンセンサスを示し、Phl p 4 遺伝子の 3' 末端から停止コドン (二重下線) までを包含する。アンチセンスプライマー No. 85 および No. 86 の構築のために用いられる配列範囲を、下線で示す。

30

40

【0014】

図 3 : Phl p 4 アレルゲン (配列番号 2) の推定されたアミノ酸配列における Phl p 4 ペプチドの位置の特定

精製された、および断片化された Phl p 4 アレルゲンのアミノ酸配列から得られたペプチド P1 ~ P6 (配列番号 27 ~ 32) を、明らかに、核酸配列から誘導される Phl p 4 遺伝子のアミノ酸配列に割り当てることができる。

【0015】

50

図 4 : nPhl p 4 に特異的なモノクローナル抗体 5 H 1 (プロット A) および 3 C 4 (プロット B) による組換え Phl p 4 (rPhl p 4) の同一性の、ウエスタンブロットによる決定

トラック 1 : rPhl p 4 断片 1 ~ 2 0 0 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 2 : rPhl p 4 断片 1 8 5 ~ 5 0 0 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 3 : rPhl p 4 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 4 : オオアワガエリからの精製された nPhl p 4

【数 1】

(◀):

10

C 末端 rPhl p 4 断片または rPhl p 4 全長分子の中途終了断片または分解断片

【0 0 1 6】

図 5 : 花粉アレルギー患者の血清からの I g E を用いた、組換え Phl p 4 (rPhl p 4) の反応性のウエスタンブロットによる決定

完全な Phl p 4 遺伝子または N 末端断片 1 ~ 2 0 0 または C 末端断片 1 8 5 ~ 5 0 0 のいずれかを発現する、形質転換された大腸菌細胞の抽出物を、S D S - P A G E において分離し、ニトロセルロース膜に転写した。プロットを、花粉アレルギードナー A、B または C からの血清を用いてインキュベートし、その後結合した I g E を、アルカリホスファターゼが結合した抗ヒト I g E 抗体により、比色分析で検出した。

20

トラック 1 : rPhl p 4 断片 1 ~ 2 0 0 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 2 : rPhl p 4 断片 1 8 5 ~ 5 0 0 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 3 : rPhl p 4 を含む大腸菌全細胞抽出物

トラック 4 : オオアワガエリからの精製された nPhl p 4

【0 0 1 7】

ヌクレオチドまたはアミノ酸配列について本明細書中で用いる番号「配列番号」は、明細書に添付された配列プロトコルに対応する。

【0 0 1 8】

発明の説明

ここで、本発明は、初めて、見出された単一ヌクレオチド多型 (single nucleotide polymorphism (SNP)) から生じる 3 種の優性の配列 (配列番号 1、3 および 5) を有する、主要な花粉アレルギー Phl p 4 の遺伝子配列を提供する。

30

従って、本発明は、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 5 からなる群から選択されたヌクレオチド配列に対応する D N A 分子またはオオアワガエリ由来の主要なアレルギー Phl p 4 をコードするヌクレオチド配列に対応する D N A 分子に関する。

【0 0 1 9】

本発明はまた、低アレルギー性作用を有する断片、部分配列の新規な組み合わせおよび点突然変異体を包含する。

従って、本発明はさらに、イネ科の 4 群アレルギーの、免疫調節性の T 細胞反応性の断片をコードする、対応する部分配列、部分配列の組み合わせまたは交換、欠失もしくは付加突然変異体に関する。

40

【0 0 2 0】

他のイネ科種の 4 群アレルギーに加えて、1 3 群アレルギーはまた、これらが、S D S - P A G E において 4 群アレルギーに極めて類似した分子量を示し、生化学的手法により分離するのが困難であるため (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332, Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402)、本発明に関連して興味深い。しかし、ここで初めて有用である本発明のタンパク質および D N A 配列の補助により、4 群および 1 3 群が、顕著に異なるアミノ酸配列を有することを、明らかに示すことができる。

【0 0 2 1】

50

天然に存在するアレルゲンのDNA配列の知識を用いて、ここで、これらのアレルゲンを、アレルギー性疾患の診断および療法において用いることができる組換えタンパク質として、製造することが可能である (Scheiner and Kraft, 1995, *Allergy* 50: 384-391)。

【0022】

アレルギーの有効な治療的処置のための古典的な方法は、特異的な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)。この方法では、患者に、天然のアレルゲン抽出物を、用量を増大させて皮下注射する。しかし、この方法では、アレルギー反応またはさらにアナフィラキシーショックの危険がある。これらの危険を最小にするために、アレルゴイドの形態の革新的な製剤を用いる。これらは、未処理の抽出物と比較して、顕著に低下したIgE反応性、しかし同一のT細胞反応性を有する、化学的に修飾されたアレルゲンである (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4(7): 377-382)。

10

【0023】

さらに実質的な療法の最適化が、組換え方法により製造されたアレルゲンを用いて可能である。随意に患者の個別の感作パターンに整合した、組換え方法により製造された高純度のアレルゲンの所定のカクテルを、天然のアレルゲン源からの抽出物と置き換えることができる。その理由は、これらが、種々のアレルゲンに加えて、比較的多数の免疫原性であるが非アレルゲン性である二次的タンパク質を含むからである。

【0024】

発現産物を用いて信頼性のある減感作をもたらすことができる現実的な展望は、IgEエピトープが、療法に必須のT細胞エピトープを損なわずに特異的に削除される、特異的に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)。

20

【0025】

アレルギー患者における妨害されたTH細胞平衡に治療的に影響するための他の可能性は、免疫療法的DNAワクチン接種である。これは、関連するアレルゲンをコードする発現可能なDNAを用いた処置を含む。免疫応答のアレルゲン特異的影響の最初の実験的な根拠は、アレルゲンをコードするDNAの注射により、げっ歯動物において提供された (Hsu et al., 1996, *Nature Medicine* 2(5): 540-544)。

【0026】

30

従って、本発明はまた、医薬としての、本明細書中に記載したDNA分子または対応する組換え発現ベクターに関する。

組換え方法により製造された、対応するタンパク質を、花粉アレルギーの療法のために、並びにインビトロおよびインビボ診断のために用いることができる。

【0027】

組換えアレルゲンの製造のために、クローン化された核酸を、発現ベクターに連結させ、このコンストラクトを、好適な宿主生物体中で発現させる。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り、IgE抗体の検出に利用できる。

従って、本発明は、さらに、発現制御配列に機能的に結合した、本明細書中に記載したDNA分子を含む組換え発現ベクターおよび、前述のDNA分子または前述の発現ベクターで形質転換した宿主生物体に関する。

40

【0028】

本発明は、同様に、上記したDNA分子の少なくとも1種のまたは上記した発現ベクターの少なくとも1種を、イネ科の4群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーを患っている患者の免疫療法的DNAワクチン接種および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造のために用いることに関する。

【0029】

既に述べたように、本発明を、特定の免疫療法のための組換えアレルゲン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、多くの可能性がある。先ず、不変の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

50

、全体の分子の I g E エピトープの特異的な欠失または T 細胞エピトープをコードする個別の断片の製造により、低アレルゲン性（アレルゴイド状）形態を、本発明において、不所望な副作用を防止するための療法のために用いることができる。最後に、核酸自体は、真核生物発現ベクターと連結された場合に、直接の適用の際に、療法的な意味においてアレルギー性免疫状態を改変する製剤を提供する。

【 0 0 3 0 】

従って、本発明は、配列番号 1、3 または 5 に対応する組換え D N A 分子に関し、ここで、位置 1 ~ 6 9 のヌクレオチド配列は、Phl p 4 N 末端のアミノ酸配列から誘導されている。ここでは、大腸菌において高頻度に出現するコドンを用いた。位置 7 0 からは、D N A 配列は、オオアワガエリのゲノムおよび c D N A において同定されているものに一致する。

10

従って、本発明は、さらに、位置 7 0 で開始し、オオアワガエリの主要なアレルゲン Phl p 4 の特性を有するポリペプチドをコードする、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 5 によるヌクレオチド配列を含む D N A 分子に関する。

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明は、好ましくは医薬としてのこれらの特性を有する、前述の D N A 分子の 1 つまたは 2 つ以上によりコードされるポリペプチドに関する。

これらは、特に、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 によるポリペプチドであり、ここで、アミノ酸位置 1 ~ 3 3 は、単離された天然の Phl p 4 アレルゲンの N 末端アミノ酸配列により決定されている。位置 2 4 ~ 5 0 0 は、配列番号 1、3 および 5 による D N A 配列から誘導されていた。位置 6、7、8 および 9 における可変アミノ酸は、天然の Phl p 4 の種々の製造物の N 末端タンパク質配列に由来する（表 1）。

20

従って、本発明はまた、請求項 1 1 における宿主生物体の培養およびこの培養物からの対応するポリペプチドの単離による、このタイプのポリペプチドの製造のための方法に関する。

【 0 0 3 2 】

本発明は同様に、上記したポリペプチドの少なくとも 1 種の、イネ科の 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーの診断および / または処置およびこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造への使用に関する。

【 0 0 3 3 】

ヒトに対するアレルゲンとして作用する、本発明のこれらのポリペプチドまたはタンパク質は、オオアワガエリの花粉粒子中に存在する。他のイネ科種、例えば特にホソムギ、カモガヤ、ナガハグサ (Poa pratensis)、ギョウギシバ、シラゲガヤ (Holcus lanatus) の花粉粒子は、相同アレルゲン分子（4 群アレルゲン）を含む。

30

これらの分子の相同性は、マウスモノクローナル抗体およびまたヒト I g E 抗体の両方とのこれらの免疫学的交差反応性により、実証された。

【 0 0 3 4 】

従って、本発明はまた、Phl p 4 D N A 配列に対する相同配列、並びに、存在する配列の相同性のために、ストリンジентな条件の下で Phl p 4 D N A とハイブリダイズするか、または Phl p 4 に関して免疫学的交差反応性を有する、他のイネ科、例えばホソムギ、カモガヤ、ナガハグサ、ギョウギシバ、シラゲガヤ、コムギ (Triticum aestivum) およびオオムギ (Hordeum vulgare) 由来の 4 群アレルゲンの対応する D N A 分子に関する。

40

【 0 0 3 5 】

以下の手順に従って、Phl p 4 のタンパク質および D N A 配列を決定した：

天然のアレルゲン Phl p 4 を、記載された方法 (Fahlbusch et al. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807, Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) により精製し、単離した。微量の 1 3 群アレルゲンのマイクロ精製 (micropurification) および採取を、Suckら (2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) により記載された方法により、行った。

50

オオアワガエリから単離されたこのPhl p 4のN末端アミノ酸配列を、エドマン分解により決定した。表1に示すN末端配列(P 1 a ~ f)を、Phl p 4の種々のバッチを用いて決定した。最初の15個の位置についてのコンセンサス配列を、以下の配列であると見なす: Y F P P ' P ' A A K E D F L G X L (配列番号33)。位置14は、決定することができない;これは、おそらく、システインにより占有される。異なるバッチにおける位置6、7、8および9における種々のアミノ酸は、アイソフォームの意味における変更を示す。位置4および5は、ヒドロキシプロリン(P')により占有され、これは、調製物p 1 - aおよび - bの分析における特定の分析により、明らかに決定された。

【0036】

エンドペプチダーゼGlu - C (Promega, Heidelberg, Germany)を用いたSDS変性Phl p 4の処理により、種々のペプチドが得られた。表1に示すアミノ酸配列を、2つのペプチド(P 2およびP 3)について決定した。2つのペプチド(P 4およびP 5)を、エンドペプチダーゼLys - C (Roche, Mannheim, Germany)を用いた切断により精製し、配列決定した(表1)。他のペプチド(P 6)は、CNBr切断により単離し、アミノ酸配列を決定した(表1)。

10

【0037】

N末端配列のアミノ酸配列および内部ペプチド2および6を、変性プライマーの構築のための基礎として用いた。アンプリコンを、センスプライマーNo. 30およびアンチセンスプライマーNo. 37(表2)で、オオアワガエリ由来のゲノムDNAを用いて調製した。これらのアンプリコンから得られたクローンを、配列決定し(図1)、特異的なセンスプライマーNo. 82(表2)の構築のために用いた。オオアワガエリ花粉由来の代表的なmRNA集団および本発明の特異的なセンスプライマーNo. 82およびアンカープライマーAUA P (Life Technologies, Karlsruhe, Germany)から調製したcDNAを用いて、PCRをストリンジェントな条件の下で行った。この約450kbのアンプリコンを、配列決定し、Phl p 4遺伝子の3'末端の箇所までの欠失配列を、同定した(図2)。本発明において決定されたこのC末端Phl p 4配列に基づいて、特異的なアンチセンスプライマーNo. 85およびNo. 86を、構築した(表2)。Phl p 4ペプチドP 1 - a(表1)のN末端アミノ酸配列に基づいて、アミノ酸位置24 ~ 33(LYAKSSPAYP(配列番号34))をコードするDNAから誘導された、変性センスプライマーNo. 29を、構築した。

20

30

【0038】

PCRを、プライマーNo. 29およびNo. 86で、ゲノムオオアワガエリDNAを用いて行った。このPCR産物を、プライマーNo. 29およびNo. 85での第2のPCR(ネステッドPCR)のための基礎として用いた。アンプリコンを、ベクターpGEM T - easy (Promega, Heidelberg, Germany)中に挿入し、クローン化し、配列決定した。この配列は、配列番号1、3または5によるDNA配列のN末端または位置70から計算して、位置24から開始し、プライマーNo. 85(配列番号1、3または5における位置1402)まで伸びており、これは、Phl p 4遺伝子のすでに決定されたC末端部分に位置する。これらのデータを用いて、Phl p 4分子の完全なアミノ酸配列を、最初の33個のアミノ酸位置から構築し、タンパク質配列決定ならびにプライマーNo. 29 / No. 85およびNo. 82 / アンカープライマーで調製されたクローンから由来し得る、推定のアミノ酸配列(477個の位置)により決定することができる。2つのクローンは、これらのヌクレオチド配列の197個の位置において重複する。クローンNo. 29 / No. 85によりコードされたペプチドは、10個のアミノ酸位置において、直接アミノ酸配列決定により決定されたPhl p 4のN末端配列(位置1 ~ 33)と重複し、ここで、2つの方法により決定されたアミノ酸は、一致する。

40

【0039】

直接決定されたN末端アミノ酸および推定のアミノ酸配列に基づく、Phl p 4のアミノ酸配列は、配列番号2、4および6の下で配列プロトコルにおいて列挙された配列に一致する。

50

【0040】

PCR産物を、特異的なセンスプライマーNo. 88(表2)および特異的なアンチセンスプライマーNo. 86で、共にゲノムを用いて、およびオオアワガエリからのcDNAを用いて調製し、直接配列決定した。

これにより、PCRエラーを排除し、遺伝子変異(単一ヌクレオチド多型)を見出すことが可能である。

【0041】

DNA配列配列番号1について見出された単一ヌクレオチド多型を、表3に示す。これらの単一ヌクレオチド多型のいくつかでは、アミノ酸が修飾されている。これらを、表4に示す。さらに、優勢な配列の配列番号2、4および6に関して逸脱するアミノ酸をもたらしDNAクローンを、配列決定した(表5)。これらのアミノ酸変異は、Phl p 4分子のアイソフォームであると思なされるべきである。このようなアイソフォームの存在は、天然のPhl p 4の不均一な等電特性から予測される。現在まで知られているすべての花粉アレルゲンは、このようなアイソフォームを有する。プライマーNo. 29および86により決定されるDNA断片が、実際に、天然のPhl p 4アレルゲンと同一のタンパク質をコードするという事実はまた、特に、本発明の組換えPhl p 4分子の推定されたアミノ酸配列における相同ペプチド配列が、天然のPhl p 4の同定された内部ペプチドP3、P4およびP5(表1)について見出された(図3)という事実により実証され得る。記載されたPhl p 4アミノ酸配列は、これが、8.99(配列番号2)、8.80(配列番号4)または9.17(配列番号6)の計算された等電点を有し、500個のアミノ酸からなる塩基性分子であることを示す。定量的なアミノ酸組成を、表6に示す。組換えPhl p 4の計算された分子量は、55.762(配列番号2)、55.734(配列番号4)または55.624(配列番号6)ダルトンである。この計算された分子量は、SDS-PAGEにより決定された55kDaの天然のPhl p 4の分子量と、極めて良好に整合する(Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807およびSuck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402)。

【0042】

50~60kDaの分子量はまた、関連するイネ科種の4群アレルゲンについて記載されている。

【表7】

(Su et al., 1991, Clin. Exp.

Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:

342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-

Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14-17).

【0043】

組換えPhl p 4タンパク質の製造のために、Phl p 4をコードする配列番号1、3および/または5によるDNA配列を、発現ベクター(例えばpProEx、pCro、pSE380)中に挿入した。タンパク質配列決定から知られているN末端アミノ酸について、大腸菌の最適化コドンを用いた。

【0044】

大腸菌への形質転換、発現および種々の分離方法による組換えPhl p 4の精製の後に、得られたタンパク質に、リフォールディングプロセスを施した。

【0045】

このようにして得られたこのrPhl p 4タンパク質は、天然のPhl p 4と同一の分子量範囲をカバーするSDS-PAGEにおいて、単一のバンドを与える。rPhl p 4の免疫学的反応性は、天然のPhl p 4を用いて誘発され、イネ科の相同タンパク質(4群)と交差反応する、マウスモノクローナル抗体5H1および3C4との反応により、実証された(Fah

10

20

30

40

50

Ibusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10(6): 361-367) (図4)。rPhl p 4は、天然のPhl p 4との実証されたI g E反応性を有するアレルギー患者のI g E抗体と反応する。このI g E反応性および従ってアレルゲンとしての作用は、共にドット試験、ウエスタンブロットにおいて、およびまたポリスチレンマイクロタイタープレート上でのアレルゲンの吸着の後に実証された。ウエスタンブロットによる検出を、図5に示す。アレルゲン4群反応性花粉アレルギー患者の好塩基球とのrPhl p 4の反応の際に、これらは、活性化マーカーCD 203cの増大した発現に刺激される。rPhl p 4によるこの好塩基球活性化は、この分子がまたアレルゲンとして機能的に作用することを、明確に示す。

【0046】

従って、このrPhl p 4アレルゲンを、花粉アレルギー患者の高度に特異的な診断のために用いることができる。この診断を、インビトロで、特定の抗体(I g E、I g G 1~4、I g A)の検出およびI g Eを負荷したエフェクター細胞(例えば血液からの好塩基球)との反応によりインビトロで、または皮膚試験反応および反応器官における誘発によりインビボで、行うことができる。

【0047】

rPhl p 4の、花粉アレルギー患者のTリンパ球との反応は、増殖のためのTリンパ球のアレルゲン特異的刺激ならびに、新たに調製した血液リンパ球中のT細胞によるサイトカイン合成、および確立されたnPhl p 4反応性T細胞株およびクローンにおけるサイトカイン合成の両方により、検出された。

【0048】

記載したrPhl p 4 DNA配列に基づいて、50~350個のアミノ酸を有するペプチドをコードする部分配列を、発現ベクターにクローン化した。これらの部分配列は、連続的に、rPhl p 4の完全な配列を包含し、少なくとも12個のアミノ酸の重複がある。発現したペプチドは、Phl p 4断片に一致する。これらのPhl p 4断片は、個別にもしくは混合物として、アレルギー患者のI g E抗体と反応しないか、または小さい程度に反応するのみであり、従って、これらを、低アレルゲン性と分類することができる。対照的に、これらの断片の混合物は、完全な組換え体または天然のPhl p 4と同様にして、Phl p 4反応性を有する花粉アレルギー患者のTリンパ球を刺激することができる。

【0049】

図4は、Phl p 4特異的モノクローナルマウス抗体に結合することによる、アミノ酸1~200および185~500に対応する2種のこのようなPhl p 4断片の特徴づけを、例として示す。C末端断片185~500は、モノクローナル抗体5H1のみと反応する一方、N末端断片1~200は、明らかに、モノクローナル抗体3C4と反応する。図5から、断片185~500は、アレルギー患者BおよびCの血清からのI g Eと、比較的弱く反応する、即ち、これは、少なくとも患者血清Cに対する減少されたI g E反応性(低アレルゲン性)を有する断片1~200よりもアレルゲン性が低いことが明らかである。

【0050】

従って、本発明はまた、Phl p 4のアミノ酸1~200を有する断片1~200をコードする、本明細書中に記載したDNA分子および、Phl p 4のアミノ酸285~500を有する断片285~500をコードするDNA分子に関する。

【0051】

システインをコードするトリプレットを、部位特異的変異導入により、これらが、他のアミノ酸、好ましくはセリンをコードするように改変した。個々のシステインを置換したバリエーションおよび、2つのシステイン残基の種々の組み合わせまたは5つのシステインすべてを修飾したバリエーションの両方を、製造した。これらのシステイン点変異体の発現タンパク質は、アレルギー患者のI g E抗体との反応性は高度に低減したか、またはゼロであったが、これらの患者のTリンパ球と反応する。従って、本発明はさらに、対応するポリペプチドの1つ、それ以上またはすべてのシステイン残基が、他のアミノ酸により、部位

10

20

30

40

50

特異的変異導入により置換されている、本明細書中に記載したDNA分子に関する。

【0052】

T細胞エピトープを有するポリペプチドおよび低アレルゲン性点突然変異体（例えばシステイン多型）のポリペプチドに対応する低アレルゲン性断片の免疫調節活性は、花粉アレルギー患者のT細胞とのこの反応により実証された。

【0053】

このような低アレルゲン性断片またはシステインの点突然変異体を、アレルギー患者の減感作のための製剤として用いることができる。その理由は、これらが、等しい有効性を伴ってT細胞と反応するが、低減されたかまたは全く存在しないIGE反応性のために、IGEを介する副作用が低減するからである。

10

【0054】

低アレルゲン性Phl p 4バリエーションをコードする核酸またはPhl p 4をコードする未改変DNAを、ヒト発現ベクターと連結する場合には、これらの構築物を、同様に、免疫療法（DNAワクチン接種）のための製剤として用いることができる。

【0055】

最後に、本発明は、上記で記載したDNA分子少なくとも1種または上記で記載した発現ベクター少なくとも1種および随意に他の活性成分および/またはアジュバントを含む、イネ科の4群アレルゲンが誘発に關与するアレルギーを患っている患者の免疫療法的DNAワクチン接種および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬組成物に関する。

20

【0056】

本発明の他の群の医薬組成物は、DNAの代わりに、上記したポリペプチド少なくとも1種を含み、前述のアレルギーの診断および/または処置に適する。

【0057】

本発明の意味における医薬組成物は、活性成分として、本発明のポリペプチドまたは発現ベクターおよび/またはすべての比率での混合物を含む、それぞれの薬学的に使用可能な誘導体を含む。本発明の活性成分を、ここで、少なくとも1種の固体、液体および/または半液体賦形剤またはアジュバントと共に、および随意に1種または2種以上の他の活性成分と組み合わせて、好適な投薬形態とすることができる。

特に好適なアジュバントは、CpGモチーフを有する免疫賦活性DNAまたはオリゴヌクレオチドである。

30

【0058】

これらの組成物を、ヒト医学または獣医学における治療剤または診断剤として用いることができる。好適な賦形剤は、非経口投与に適し、本発明の活性成分の作用に悪影響を生じない有機または無機物質である。非経口投与に特に適するのは、溶液、好ましくはオイルベース、または水性の溶液、さらに懸濁液、エマルジョンまたはインプラントである。本発明の活性成分を、また、凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を、例えば、注射製剤を製造するために用いることができる。示した組成物を、滅菌し、および/またはこれは、補助剤、例えば潤滑剤、保存剤、安定剤および/または湿潤剤、乳化剤、浸透圧を調整するための塩、緩衝物質および/または複数の他の活性成分を含むことができる。

40

さらに、持続放出製剤を、本発明の活性成分の対応する処方により、得ることができる。

【0059】

従って、本発明はまた、アレルゲン成分が誘発する患者に特異的な感作範囲の同定の一部として、インビトロ診断を改善するのに役立つ。本発明は、同様に、花粉アレルギーの特異的な免疫療法のための顕著に改善された製剤を製造するのに役立つ。

【0060】

【表 8】

表 1 Phl p 4ペプチドのアミノ酸配列

調製物	ペプチド バッチ	配列 番号	アミノ酸						
			1	6	11	16	21	26	31
無処置の Phl p 4	P1-a	35	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKEIP	PRLLY	AKSSP	AYP
	P1-b	36	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKE-P	PRLLY	AKSSP	
	P1-c	37	YFPXX	AAKED	FLGXL				
	P1-d	38	YFPXX	AKKED	FLGXL				
	P1-e	39	YFPXX	AAKDD	FLGXL				
	P1-f	40	YFPXX	LANED	F				
Glu-C 断片	P2	41	SATPF	XHRKG	VLFNI	QYV			
	P3	42	GLXYR	XLXPE					
Lys-C 断片	P4	43	KXMGD	DHFXA	VR				
	P5	44	APEGA	VDI I					
CNBr 断片	P6	45	MEPYV	SINPV	QAYAN	Y			

10

20

【 0 0 6 1 】

【表 9】

表 2 Phl p 4ペプチド配列およびDNA配列に基づいて構築された、
変性および特異的センスおよびアンチセンスプライマー

プライ マー 番号	ペプチド/ DNA	センス/ アンチ センス	配列 番号	ヌクレオチド配列
29	Phl p 4-P1	s	46	YTN TAY GCN AAR WSN WSN CCN GCN TAY CC
30	Phl p 4-P2	s	47	CAY MGN AAR GGN GTN YTN TTY AAY ATM C
37	Phl p 4-P6	as	48	TAR TTN GCR TAN GCY TGN ACN GGR TT
82	Phl p 4-DNA-NYW	s	49	ACT ACT GGT TCG CCC CGG GAG CC
85	Phl p 4-DNA-GLV	as	50	TGA AGT ATT TCT GGC CCC ACA CCA AAC C
86	Phl p 4-DNA-QRL	as	51	CCC TTG GTG ATG GCG AGC CTC TGG
88	Phl p 4-DNA-PSV	s	52	CTC AGT CCT GGG GCA GAC CAT CC

30

40

【 0 0 6 2 】

プライマー 82、85、86および88のヌクレオチド配列を、通常の4文字コードで示す。プライマー 29、30および37の場合において、IUPAC-IUB DNAコードを用いる；文字「N」は、ここで、イノシンを意味する。

【 0 0 6 3 】

【表 1 0】

表 3 検出された単一ヌクレオチド多型

配列中での位置	配列番号 1 によるヌクレオチド	検出されたSNP
85	T	A
130	C	A
159	G	A
160	A	C
169	G	A
185	C	T
186	C	A
222	G	C
226	G	A
227	G	C
228	T	C
237	C	T
273	C	T
285	C	T
286	C	T
298	G	A
299	A	C
303	C	T
309	C	G
318	T	C
320	G	A
333	C	G
348	G	C
369	C	G
409	C	T
411	C	T
420	T	C
421	A	C
423	A	C
424	G	A

10

20

30

【 0 0 6 4 】

【表 1 1】

425	T	C
456	C	G
462	C	A
522	G	C
525	C	G
567	G	A
618	C	T
655	A	C
657	G	A
662	G	A
680	C	T
684	G	C
690	C	A
691	G	A
693	G	A
703	C	T, A
710	A	C
711	G	A
713	C	T
743	G	A
750	G	A
768	C	T
773	A	C
790	G	A
798	G	C
801	G	A
804	C	G
809	C	A
834	G	C
844	C	A
859	A	T
865	A	G
879	G	C
895	G	C
900	G	C, A
918	G	A
961	A	G
962	A	C
964	A	C
987	G	C
994	A	T
1020	G	A
1023	G	C
1036	G	C
1040	C	T
1041	G	C

10

20

30

40

【表 1 2】

1047	C	A
1051	A	G
1052	G	A, C
1053	G	A, C, T
1056	G	C
1069	T	C
1073	G	A
1084	C	G
1086	G	C
1090	C	T
1098	G	C
1151	G	C
1152	G	C
1155	G	C
1161	G	C
1185	C	G
1229	G	C
1233	G	C
1239	A	C
1240	T	C
1242	G	C
1257	G	C
1266	C	T
1269	C	T
1278	A	C, G
1305	C	G
1308	C	T
1311	C	A
1335	G	C
1350	G	C
1357	T	A
1359	A	G
1370	G	C
1377	T	C
1378	T	A
1379	T	A
1383	G	C
1398	C	T
1411	T	C
1414	C	G
1425	C	A
1428	C	T
1443	G	C
1449	C	T
1464	G	A
1485	G	A
1498	A	C

10

20

30

40

【 0 0 6 6 】

【表 1 3】

表 4 単一ヌクレオチド多型の結果としてのアミノ酸置換

配列中の位置	配列番号 2 によるアミノ酸	検出された置換
6	A	L
7	A	K
8	K	N
9	E	D
29	S	T
54	I	L
57	V	I
62	A	V
76	G	T, N, S
100	E	T
107	S	N
137	H	Y
141	T	P
142	V	A, T
189	T	K
219	K	Q
221	R	K
227	P	L
231	V	I
235	P	T, S
237	K	T
238	A	V
248	R	K
258	D	A
264	V	I
270	T	K
282	Q	K
287	M	L
289	S	G
299	A	P
321	N	A
322	I	L
332	T	S
346	E	Q
347	P	L

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

【表 1 4】

351	R	E, T
357	F	L
358	S	N
362	L	V
364	P	S
384	W	S
410	G	A
419	E	D
456	F	Y
457	S	A, N
460	L	K
468	K	M
472	Q	E
498	K	Q

【 0 0 6 8 】

【表 1 5】

表 5 配列番号 2 と比較した、各組換えPhi p 4クローンにおける逸脱アミノ酸の位置

例	逸脱位置*
クローン 1	L54, I57, V62, S76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, L227, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
クローン 2	L54, I57, V62, T76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
クローン 3	P141, K282, L287, P299, L347, E351
クローン 4	G289, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
クローン 5	L347, E351, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
クローン 6	N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460
クローン 7	K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384
クローン 8	Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, E351
クローン 9	M231, T246, A251, C263, G289, L307, L309, E334
クローン 10	Q219, K221, I231, S235, T237, M238, V242, V246, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, N358, V362, S384, 位置407と408との間のGAの挿入, N452, Y456, A457, K460, E472
クローン 11	位置407と408との間のGAの挿入

10

20

30

* [配列番号 2 によるアミノ酸 / 配列における位置 / 逸脱アミノ酸]

【 0 0 6 9 】

【表 16】

表 6 Phl p 4のアミノ酸組成

アミノ酸	番号	重量%
荷電	138/138/138	33.89/33.86/33.93
酸性	45/46/43	9.82/10.05/9.38
塩基性	54/53/55	13.67/13.39/13.78
極性	120/119/124	24.88/24.71/25.89
疎水性	180/180/180	35.64/35.66/35.43
A Ala	40/40/41	5.10/5.10/5.24
C Cys	5/5/5	0.92/0.93/0.93
D Asp	24/24/24	4.95/4.96/4.97
E Glu	21/22/19	4.86/5.10/4.41
F Phe	24/24/22	6.33/6.34/5.82
G Gly	42/42/40	4.30/4.30/4.10
H His	10/10/9	2.46/2.46/2.22
I Ile	29/29/30	5.88/5.89/6.10
K Lys	29/29/33	6.67/6.67/7.60
L Leu	33/33/35	6.70/6.70/7.12
M Met	11/11/10	2.59/2.59/2.36
N Asn	22/22/23	4.50/4.50/4.72
P Pro*	38/39/39	6.62/6.80/6.81
Q Gln	15/15/15	3.45/3.45/3.46
R Arg	25/24/22	7.00/6.73/6.18
S Ser	32/32/33	5.00/5.00/5.17
T Thr	22/21/22	3.99/3.81/4.00
V Val	41/41/40	7.29/7.29/7.13
W Trp	13/13/12	4.34/4.34/4.02
Y Tyr	24/24/26	7.02/7.03/7.63

10

20

30

* ヒドロキシプロリンを含む

【0070】

数値を、配列番号 2 / 配列番号 4 / 配列番号 6 の順序での 3 つの主要な配列について示す。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図 1】 Phl p 4 遺伝子の内部 DNA 配列 (配列番号 25) を示す図である。

【図 2】 Phl p 4 遺伝子の核酸配列 (配列番号 26) の 3' 末端を示す図である。

【図 3】 Phl p 4 アレルゲン (配列番号 2) の推定されたアミノ酸配列中の Phl p 4 ペプチドの位置の特定を示す図である。

40

【図 4】 nPhl p 4 に特異的なモノクローナル抗体 5H1 (プロット A) および 3C4 (プロット B) による組換え Phl p 4 (rPhl p 4) の同一性の、ウエスタンブロットによる決定を示す図である。

【図 5】 花粉アレルギー患者の血清からの IgE を用いた組換え Phl p 4 (rPhl p 4) の反応性の、ウエスタンブロットによる決定を示す図である。

【配列表】

Sequenz-Protokoll

<110> Merck Patent GmbH

<120> DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens
Phl p 4

<130> P 02/101

<140> EP 02 013953.1

<141> 2002-06-25

<160> 52

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial_DNA_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native_DNA_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

10

20

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 1

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48	
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val		
1 5 10 15		
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96	
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr		10
20 25 30		
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg cgg tgg tcg tcg ccg	144	
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro		
35 40 45		
gac aac gtg aag ccg atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac	192	
Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His		
50 55 60		
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgg cac ggt gtc cgc atc cgc	240	
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg		
65 70 75 80		
gtg cgc agc gcc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tcc ctg	288	
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu		20
85 90 95		
cag ccc gag gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg cgg gcc gtg	336	
Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val		
100 105 110		
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg gcg tgg gtc gac tcc gcc gcg cag	384	
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln		
115 120 125		
ctc gcc gag ctc tac tac gcc atc cac aag gcg agt aca gtg ctg gcg	432	
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Thr Val Leu Ala		
130 135 140		
ttc ccg gcc gcc gtg tgc ccg acc atc gcc gtg gcc gcc aac ttc gcg	480	
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala		
145 150 155 160		
ggc gcc gcc ttc gcc atg ctg ctg cgc aag tac gcc atc gcg gcc gag	528	30
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu		
165 170 175		
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac gcc acg ctg cac gac	576	
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp		
180 185 190		
aag aag tcc atg gcc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg gcc gcc ggg	624	
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly		
195 200 205		

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg 672
 Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro
 210 215 220

gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag 720
 Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu
 225 230 235 240

ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc 768
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255

ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag ggc ccc acg gcc acg 816
 Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr
 260 265 270

ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg 864
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 280 285

agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag 912
 Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300

atg tcg tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac 960
 Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320

aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc 1008
 Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335

gcc gaa tac aag tgg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag agg gtg 1056
 Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Arg Val
 340 345 350

tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc ggc gcg ggg atc 1104
 Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365

atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg 1152
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp
 370 375 380

gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac 1200
 Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcg gcg cca ttg tgg tgg 1248
 Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc 1296
 Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag 1344
 Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg ggc cag 1392

10

20

30

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln
 450 455 460
 aaa tac ttc aag ggc aat ttc cag agg ctc gcc atc acc aag ggc aag 1440
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480
 gtg gat ccc acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg ctc 1488
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495
 atc aaa aag tac tga 1503
 Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 2

<211> 500

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
 1 5 10 15
 Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
 35 40 45
 Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His
 50 55 60
 Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95
 Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110
 Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125
 Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Thr Val Leu Ala
 130 135 140

10

20

30

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
 165 170 175
 Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp
 180 185 190
 Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
 195 200 205
 Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro
 210 215 220
 Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255
 Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr
 260 265 270
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 280 285
 Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300
 Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320
 Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335
 Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Arg Val
 340 345 350
 Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp
 370 375 380

10

20

30

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
 500

10

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial_DNA_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native_DNA_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

20

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 3

tac ttc ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48	
Tyr Phe Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val		
1 5 10 15		
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96	
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr		10
20 25 30		
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc ccg aac tcg cgg tgg tcg tcg ccg	144	
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro		
35 40 45		
gac aac gtg aag ccg atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac	192	
Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His		
50 55 60		
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgg cac ggt gtc cgc atc cgc	240	
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg		
65 70 75 80		
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tcc ctg	288	
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu		20
85 90 95		
cag ccc gag gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg cgg gcc gtg	336	
Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val		
100 105 110		
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg gcg tgg gtc gac tcc gcc gcg cag	384	
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln		
115 120 125		
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc cac aag gcg agt cca gtg ctg gcg	432	
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Pro Val Leu Ala		
130 135 140		
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acc atc gcc gtg ggc gcc aac ttc gcg	480	
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala		
145 150 155 160		
ggc gcc gcc ttc gcc atg ctg ctg cgc aag tac gcc atc gcg gcc gag	528	
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu		30
165 170 175		
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac gcc acg ctg cac gac	576	
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp		
180 185 190		
aag aag tcc atg gcc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg gcc gcc ggg	624	
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly		
195 200 205		

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg 672
 Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro
 210 215 220

gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag 720
 Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu
 225 230 235 240

ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc 768
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255

ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag ggc ccc acg gcc acg 816
 Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr
 260 265 270

ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg 864
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 280 285

agc agc aag ttc ccc gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag 912
 Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300

atg tcg tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac 960
 Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320

aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc 1008
 Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335

gcc gaa tac aag tcg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag gaa gtg 1056
 Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Glu Val
 340 345 350

tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc gcc gcg ggg atc 1104
 Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365

atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg 1152
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp
 370 375 380

gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac 1200
 Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc ggc gcg gcg cca ttg tcg tgg 1248
 Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc 1296
 Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag 1344
 Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg gcc cag 1392

10

20

30

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln
 450 455 460

aaa tac ttc aag ggc aat ttc cag agg ctc gcc atc acc aag ggc aag 1440
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480

gtg gat ccc acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg etc 1488
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495

atc aaa aag tac tga 1503
 Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 4

<211> 500

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30

Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
 35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His
 50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95

Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110

Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Pro Val Leu Ala
 130 135 140

10

20

30

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
 165 170 175
 Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp
 180 185 190
 Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
 195 200 205
 Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro
 210 215 220
 Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255
 Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr
 260 265 270
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 280 285
 Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300
 Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320
 Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335
 Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Glu Val
 340 345 350
 Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp
 370 375 380

10

20

30

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
 500

10

<210> 5

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial_DNA_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native_DNA_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

20

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 5

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val	
1 5 10 15	
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr	
20 25 30	
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg agg tgg tcg tcg ccg	144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro	
35 40 45	
gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac	192
Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His	
50 55 60	
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgc cac agc gtc cgc atc cgc	240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg	
65 70 75 80	
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tct ttg	288
Val Arg Ser Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu	
85 90 95	
cag ccc gag acg ttc gcc gtc gtc gac ctc aac aag atg cgg gcg gtg	336
Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val	
100 105 110	
tgg gtg gac ggc aag gcc cgc acg gcg tgg gtg gac tcc ggc gcg cag	384
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tat aag gcg agc ccc acg ctg gcg	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acg atc gga gtg ggc ggc aac ttc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gcg gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggg	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	

10

20

30

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg cag gtg aag ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro 210 220	672	
gtg ccg ccc acc gtg aca ata ttc aag atc tcc aag aca gtg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu 225 230 235 240	720	
ggc gcc gtg gac atc atc aac aag tgg caa gtg gtc gcg ccg cag ctt Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768	
ccc gcc gac ctc atg atc cgc atc atc gcg cag ggg ccc aag gcc acg Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr 260 265 270	816	
ttc gag gcc atg tac ctc ggc acc tgc aaa acc ctg acg ccg ttg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met 275 280 285	864	10
agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac ccc tcc cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912	
atg tca tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960	
gcc ctc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac tcc ttc aag ccc ttc Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008	
gcc gaa tac aag tcc gac tac gtc tac cag ccc ttc ccc aag acc gtc Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val 340 345 350	1056	20
tgg gag cag atc ctc aac acc tgg ctc gtc aag ccc ggc gcc ggg atc Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104	
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tcc Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser 370 375 380	1152	
gcc acg ccc ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200	
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcc gcg ccc ctc tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248	
agc aag gac atc tac aac tac atg gag ccc tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296	30
agg cag gcg tac gca aac tac agg gac atc gac ctc ggc agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344	
gtg gtc aac gac gtc tcc acc tac gcc agc gcc aag gtc tgg gcc cag	1392	

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
 450 455 460
 aaa tac ttc aag ggc aac ttc gag agg ctc gcc att acc aag ggc aag 1440
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480
 gtc gat cct acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg ctc 1488
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495
 atc aaa aag tac tga 1503
 Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 6

<211> 500

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 6

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
 1 5 10 15
 Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
 35 40 45
 Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
 50 55 60
 Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95
 Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110
 Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125
 Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala
 130 135 140

10

20

30

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala
145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp
180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro
210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
245 250 255

Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr
260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met
275 280 285

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu
290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
305 310 315 320

Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe
325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val
340 345 350

Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser
370 375 380

10

20

30

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp
405 410 415

Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
500

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid

<400> 7

Ile Val Ala Leu Pro Xaa Gly Met Leu Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 14

10

20

30

<212> PRT

<213> *Lolium perenne*

<400> 8

Phe Leu Glu Pro Val Leu Gly Leu Ile Phe Pro Ala Gly Val
1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> *Lolium perenne*

10

<400> 9

Gly Leu Ile Glu Phe Pro Ala Gly Val
1 5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

20

<400> 10

Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

30

<400> 11

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Gly Asn Glu Gln
1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

<400> 12

Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser
1				5					10					15	

Tyr

10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

<400> 13

Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr	Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro
1				5					10					15

<210> 14

20

<211> 11

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 14

Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro
1				5					10	

<210> 15

30

<211> 22

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 15

Lys Gln Val Glu Arg Asp Phe Leu Thr Ser Leu Thr Lys Asp Ile Pro
 1 5 10 15

Gln Leu Tyr Leu Lys Ser
 20

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

10

<400> 16

Thr Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Ile Thr Ala Ala Met Ile
 1 5 10 15

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 17

20

Leu Arg Lys Tyr Gly Thr Ala Ala Asp Asn Val Ile Asp Ala Lys Val
 1 5 10 15

Val Asp Ala Gln Gly Arg Leu Leu
 20

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

30

<400> 18

Lys Trp Gln Thr Val Ala Pro Ala Leu Pro Asp Pro Asn Met
 1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 19

Val	Thr	Trp	Ile	Glu	Ser	Val	Pro	Tyr	Ile	Pro	Met	Gly	Asp	Lys
1				5					10					15

<210> 20

<211> 19

10

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> undetermined amino acid

<400> 20

20

Gly	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Leu	Xaa	Arg	Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe
1				5					10					15	

Gly Lys Tyr

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

30

<400> 21

Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Leu
1				5					10					15	

Glu Pro Ile Pro Lys Lys Ser
20

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 22

Tyr Arg Asp Leu Asp Leu Gly Val Asn Gln Val Val Gly
1 5 10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 23

Ser Ala Thr Pro Pro Thr His Arg Ser Gly Val Leu Phe Asn Ile
1 5 10 15

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 24

Ala Ala Ala Ala Leu Pro Thr Gln Val Thr Arg Asp Ile Tyr Ala Phe
1 5 10 15

Met Thr Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala Tyr Val Asn Tyr
20 25 30

Arg Asp Leu Asp
35

<210> 25

<211> 149

10

20

30

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 25
 caccggaagg ggggtgctggt caacatccag tacgtcaact actgggttcgc cccgggagcc 60
 ggcgcggcgc cattgtcgtg gagcaaggag atctacaact acatggagcc gtacgtgagc 120
 aaggaccccg tccaggccta cgccaacta 149

<210> 26

<211> 299

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 26
 actactggtt cgccccggga gccggcgcgg cgccattgtc gtggagcaag gagatctaca 60
 actacatgga gccatcctgt agcaagaacc ccaggcaggc ctacgccaac tacagggaca 120
 tcgacctcgg gaggaacgag gtgggtgaacg acgtctccac cttcagcagc ggtttggtgt 180
 ggggccagaa atacttcaag ggcaacttcc agaggctcgc catcaccaag ggcaagggtg 240
 atcccaccga ctacttcagg aacgagcaga gcatcccgcc gctcatcaaa aagtactga 299

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid

<400> 27

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val
 1 5 10 15

10

20

30

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
20 25 30

Pro

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Phleum pratense

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> undetermined amino acid

<400> 28

Ser Ala Thr Pro Phe Xaa His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln
1 5 10 15

Tyr Val

20

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Phleum pratense

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(8)
<223> undetermined amino acid

30

<400> 29

Gly Leu Xaa Tyr Arg Xaa Leu Xaa Pro Glu
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(9)

<223> undetermined amino acid

10

<400> 30

Lys Xaa Met Gly Asp Asp His Phe Xaa Ala Val Arg
1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Phleum pratense

20

<400> 31

Ala Pro Glu Gly Ala Val Asp Ile Ile
1 5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 32

Met Glu Pro Tyr Val Ser Ile Asn Pro Val Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr
1 5 10 15

30

<210> 33

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Phleum pratense

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> undetermined amino acid

<400> 33

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Phleum pratense

<400> 34

Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr Pro
 1 5 10

<210> 35
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Phleum pratense

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> undetermined amino acid

<400> 35

10

20

30

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30

Pro

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Phleum pratense

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid

<400> 36

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val
 1 5 10 15

20

Lys Glu Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro
 20 25

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid

<400> 37

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid

10

<400> 38

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Ala Lys Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid

20

<400> 39

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Ala Ala Lys Asp Asp Phe Leu Gly Xaa Leu
1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> undetermined amino acid

<400> 40

10

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Leu Ala Asn Glu Asp Phe
1 5 10

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

20

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid

<400> 41

Ser Ala Thr Pro Phe Xaa His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln
1 5 10 15

Tyr Val

30

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> undetermined amino acid

<400> 42

Gly Leu Xaa Tyr Arg Xaa Leu Xaa Pro Glu
1 5 10

<210> 43

10

<211> 12

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(9)

<223> undetermined amino acid

20

<400> 43

Lys Xaa Met Gly Asp Asp His Phe Xaa Ala Val Arg
1 5 10

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Phleum pratense.

30

<400> 44

Ala Pro Glu Gly Ala Val Asp Ile Ile
1 5

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 45

Met Glu Pro Tyr Val Ser Ile Asn Pro Val Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr
 1 5 10 15

<210> 46

<211> 29

<212> DNA

10

<213> Phleum pratense

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> 'n' means inosin

<400> 46

ytntaygcna arwsnwsncc ngcntaycc

29

20

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> 'n' means inosin

30

<400> 47

caymgnaarg gngtnytntt yaayatmc

28

<210> 48

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> 'n' means inosin

10

<400> 48
 tarittngcrt angcytgnac nggrtt 26

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense

<400> 49
 actactgggtt cgccccggga gcc 23

20

<210> 50
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense

<400> 50
 tgaagtattt ctggccccac accaaacc 28

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense

30

<400> 51
 cccttggtga tggcgagcct ctgg 24
 <210> 52

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense

40

<400> 52
 ctcagtcctg gggcagacca tcc 23

【 図 1 】

図 1 Phl p 4遺伝子の内部のDNA配列

C A C C G G A A G G G G G T G C T G T T C A A C A T C C A G T A C G T C A A
C T A C T G G T T C G C C C C G G A G C C G G C G C G G C C C A T T G T
C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C T A C A T G G A G C C G T A C
G T G A G C A A G G A C C C C G T C C A G G C C T A C G C C A A C T A

【 図 2 】

図 2 Phl p 4遺伝子の核酸配列の3'末端

A C T A C T G G T T C G C C C G G G A A G C C G G C G C G G C
G C C A T T G T C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C
T A C A T G G A G C C A T A C G T G A G C A A G A A C C C C A
G G C A G G C C T A C G C C A A C T A C A G G A C A T C G A
C C T C G G G A G G A A C G A G G T G G T G A A C G A C G T C
T C C A C C T T C A G C A G C G G T T T G G T G T G G G C C
A G A A A T A C T T C A A G G C A A C T T C C A G A G G C T
C G C C A T C A C C C A A G G G C A A G C T G G A T C C C A C C
G A C T A C T T C A G G A A C G A G C A G A G C A T C C C G C
C G C T C A T C A A A A A G T A C T G A

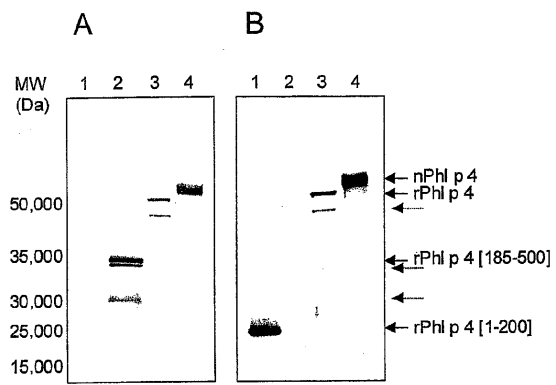
【 図 3 】

図 3 Phl p 4アレルゲンの推定されたアミノ酸配列におけるPhl p 4の位置の特定

1 Y F F F P A A K E D F L G C L V K R I P P R L L Y A K S S P A Y P S V L G Q T I
Y F F F P A A K E D F L G X L V R E I P P R L L Y A K S S P A Y P
ペプチド P1
41 R N S R W S S F D N V K P I I Y T P T N A S H I Q S A V V C G R R H C V R I R
81 V R S G G H D Y E G L S Y R S L Q P E S F A V V D L S K M R A V V D G K A R F
G L X Y R X L Y E H
ペプチド P3
121 A W Y D S G A Q L G E L Y Y A I N K A S T V L A F F A G V C P T I G V G G N F A
161 G G G P G M L L R K Y C I A A E N V I D V K L V D A N G T L H D K K S W G D D H
K X H G D D H
ペプチド P4
201 F W A V R G G G G S F G I V V A N K V R L L E V P F T V T V F K I P K K A S E
F X A V R A P E
241 G A Y D I I N A W Q V V A P Q L D D L M I R V I A Q C P T A T F E A N Y L G F
G A Y D I I
ペプチド P5
281 C Q T L T F M S S K F P E L G M N A S R C N E M S W I Q S I F F V H L G H R D
321 N I E D D L L N R M N T F K P F A Y K S D Y V Y E P F E K R V W E Q I P S T W
361 L L K F G A G I M I F D P Y C A T I S A T F E W A T F F P H R K G V L F N I Q Y
S A T F F X H R K G V L F N I Q Y
ペプチド P2
401 V N Y W F A P C A G A A F L S W S K E I Y N Y M B P I V S K N E R Q A Y A N Y R
Y M E P I V S I M E P V Q A Y A N Y
ペプチド P6
441 D I D L G R N E V Y N D V S T F S S G L V N G Q K Y F K G N F Q R L A I T K K G
481 V D P T D Y F R N E Q S I P P L I K K Y

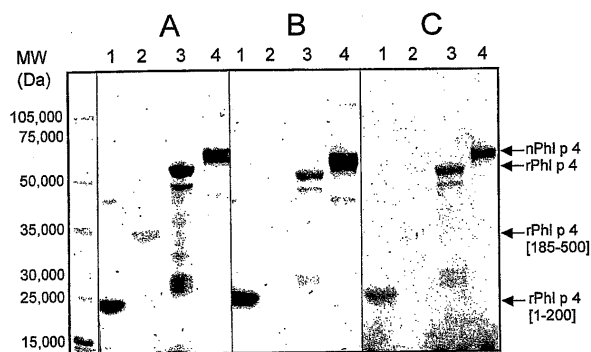
【 図 4 】

図 4 モノクローナル抗体5H1 (プロットA) および3C4 (プロットB) による組換えPhl p 4(rPhl p 4)の同一性の、ウエスタンブロットによる決定



【 図 5 】

図 5 花粉アレルギー患者の血清からのIgEを用いた組換えPhl p 4(rPhl p 4)の反応性の、ウエスタンブロットによる決定



【手続補正書】

【提出日】平成15年8月28日(2003.8.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006510346000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成16年8月12日(2004.8.12)

【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】請求項13

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項13】

請求項1～9のいずれかに記載のDNA配列によりコードされる、組換え方法により請求項12に従って製造されるポリペプチド。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/06092
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/415 C12N15/11 C12N15/63 A61K38/16 A61K39/36 A61K48/00		
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 C07K C12N 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) BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUCK R ET AL: "The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (Phleum pratense) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 30, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1395-1402, XP002260344 ISSN: 0954-7894 cited in the application page 1396, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1 page 1397, left-hand column, paragraph 3; figure 1 ----- -/-	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
^a 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 5 November 2003		Date of mailing of the international search report 17/11/2003
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 Brenz Verca, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/06092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FISHER S ET AL: "Characterization of Phl p4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 98, no. 1, July 1996 (1996-07), pages 189-198, XP000953216 ISSN: 0091-6749 cited in the application page 191, left-hand column, paragraphs 2,3; figure 4</p>	1-20
X	<p>FAHLBUSCH B ET AL: "Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 28, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 799-807, XP002260345 ISSN: 0954-7894 cited in the application</p>	13
X	<p>page 801, right-hand column, paragraph 2 -page 802, left-hand column, paragraph 1; figure 1A</p>	13
A	<p>the whole document</p>	
A	<p>SUCK R ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING AND EXPRESSION OF A NEWLY RECOGNIZED HIGHMOLECULAR MASS ALLERGEN PHL P 13 FROM TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE)" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 30, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 324-332, XP000953168 ISSN: 0954-7894 cited in the application</p>	1-13
	<p>page 325, right-hand column, paragraph 2 -page 326, left-hand column, paragraph 2; figure 1B</p>	
P,X	<p>STUMVOLL SABINE ET AL: "Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential." BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 383, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 1383-1396, XP002260346 ISSN: 1431-6730 cited in the application the whole document</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/06092

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 6 - 8
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/06092

BOX II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.:1 and the polypeptide of SEQ ID No.: 2 encoded thereby.

2. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.: 3 and the polypeptide of SEQ ID No.: 4 encoded thereby.

3. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.: 5 and the polypeptide of SEQ ID No.: 6 encoded thereby.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/06092

Continuation of I.2

Claims: 6, 8

The current Claim 6 relates to a DNA molecule characterized as a partial sequence or combination of partial sequences of the DNA molecule that codes the major allergen Phl p4. The DNA molecule is further characterized by a desirable property of the coded Phl p4 fragment, namely an immunomodulatory T-cell reactive activity.

The claims therefore encompass all fragment-encoding DNA molecules of indefinite length that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the molecule in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought.

Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning the DNA molecules according to Claim 7, supported by the examples given by Figures 4 and 5.

Analogously, the search for the DNA molecule of Claim 8 was limited to the preferred embodiment according to Claim 9. The DNA molecule of Claim 8 is also defined by a desirable property, the immunomodulatory T-cell reactive activity of the coded fragment, without disclosure of the specific technical features required for realizing this property (PCT Article 6).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination

(PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06092

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7 C07K14/415 C12N15/11 C12N15/63 A61K38/16 A61K39/36 A61K48/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K C12N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SUCK R ET AL: "The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (<i>Phleum pratense</i>) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 30, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 1395-1402, XP002260344 ISSN: 0954-7894 in der Anmeldung erwähnt Seite 1396, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1 Seite 1397, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 1 --- -/-	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
5. November 2003		17/11/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Brenz Verca, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06092

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FISHER S ET AL: "Characterization of Phl p4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, Bd. 98, Nr. 1, Juli 1996 (1996-07), Seiten 189-198, XP000953216 ISSN: 0091-6749 in der Anmeldung erwähnt Seite 191, linke Spalte, Absätze 2,3; Abbildung 4 ---	1-20
X	FAHLBUSCH B ET AL: "Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 28, Nr. 7, Juli 1998 (1998-07), Seiten 799-807, XP002260345 ISSN: 0954-7894 in der Anmeldung erwähnt	13
X	Seite 801, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 802, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 1A das ganze Dokument ---	13
A		
A	SUCK R ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING AND EXPRESSION OF A NEWLY RECOGNIZED HIGHMOLECULAR MASS ALLERGEN PHL P 13 FROM TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE)" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, Bd. 30, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 324-332, XP000953168 ISSN: 0954-7894 in der Anmeldung erwähnt Seite 325, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 326, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1B ---	1-13
P,X	STUMVOLL SABINE ET AL: "Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential." BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 383, Nr. 9, September 2002 (2002-09), Seiten 1383-1396, XP002260346 ISSN: 1431-6730 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/06092

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. 6 8
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 06092

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:1 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:2 betrifft.

2. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:3 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:4 betrifft.

3. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:5 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:6 betrifft.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 6 8

Der Patentanspruch 6 bezieht sich auf ein DNA-Molekül, charakterisiert als Teilsequenz oder Kombination von Teilsequenzen des DNA-Moleküls, das das Majorallergen Phl p4 kodiert. Ferner ist das DNA-Molekül dadurch charakterisiert, dass das kodierte Phl p 4 Fragment eine erstrebenswerte Eigenschaft haben soll, nämlich eine immunomodulatorische, T-Zell-reaktive Aktivität.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Fragment-kodierende DNA-Moleküle unbestimmter Länge, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Molekül über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die DNA-Moleküle gemäss Anspruch 7, unterstützt durch die Beispiele von Abbildung 4 und 5.

In Analogie, wurde die Recherche für das DNA-Molekül von Anspruch 8 auf die bevorzugte Ausführungsform gemäss Anspruch 9 beschränkt. Das DNA-Molekül von Anspruch 8 ist nämlich auch durch eine erstrebenswerte Eigenschaft definiert, nämlich die immunomodulatorische T-Zell-reaktive Aktivität des kodierten Fragments, ohne dass die nötigen konkreten technischen Merkmale zum Erreichen dieser Eigenschaft offenbart sind (A6 PCT).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/564 (2006.01)	G 0 1 N 33/564	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 フィービック, ヘルムート
ドイツ連邦共和国 2 1 4 9 3 シュヴァルツェンベック、ベッカーヴェーク 1 0
- (72) 発明者 ナンディー, アンドレアス
ドイツ連邦共和国 2 2 1 7 5 ハンブルク、ヌッスラーカンブ 8 9
- (72) 発明者 ズック, ローラント
ドイツ連邦共和国 2 2 3 0 1 ハンブルク、ゲラーシュトラーセ 1 5
- (72) 発明者 クロムウェル, オリバー
ドイツ連邦共和国 2 1 4 6 5 ヴェントルフ、ローエンシェーヘ 2
- (72) 発明者 ベーターセン, アルント
ドイツ連邦共和国 2 3 7 9 5 バート ゼーゲベルク、キークト 8
- (72) 発明者 ベッカー, ヴォルフ - マインハルト
ドイツ連邦共和国 2 3 9 7 5 メーツェン、ドルフシュトラーセ 5 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA02 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
HA01 HA03
4B064 AG31 CA01 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA88X AA88Y AA90X AB01 BA01 CA24 CA45
4C084 AA13 NA14 ZB13
4C085 AA03 BB11 DD62 EE01 EE03
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA30 DA86 EA31 FA72 FA74

专利名称(译)	重组方法DNA序列与花粉过敏原Phlp4的产生		
公开(公告)号	JP2006510346A	公开(公告)日	2006-03-30
申请号	JP2004514687	申请日	2003-06-11
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	フィービックヘルムート ナンディーアンドレアス ズックローラント クロムウェルオリバー ペーターセンアルント ベッカーヴォルフマインハルト		
发明人	フィービック, ヘルムート ナンディー, アンドレアス ズック, ローラント クロムウェル, オリバー ペーターセン, アルント ベッカー, ヴォルフ-マインハルト		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/415 A61K39/00 A61K48/00 A61P37/08 G01N33/53 G01N33/564 C12N15/29 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/36 C12N15/11 C12N15/63 C12P21/00 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/415 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/36 A61K39/39 A61K45/06 A61K48/00 G01N33/6893 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K14/415 A61K39/00. H A61K48/00 A61P37/08 G01N33/53.D G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B064/AG31 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA88X 4B065/AA88Y 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB13 4C085 /AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2002013953 2002-06-25 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

对应于序列 (SEQ ID.No.1) , (SEQ ID.No.3) 和 (SEQ ID.No.5) 的DNA分子 (I) , 全部为1503bp (在说明书中定义) 是新的。以下还包括独立权利要求 : (1) DNA (Ia) , 其包含从位置70开始的 (I) 的序列 , 并编码具有Phleum pratense的主要过敏原Phl p4的性质的多肽 (II) ; (2) 对应于编码Phl p4的序列的DNA (Ib) ; (3) 在严格条件下与 (I) , (Ia) 或 (Ib) 杂交并衍生自禾本科的DNA (Ic) ; (4) 编码与Phl p4免疫交叉反应并衍生自禾本科的多肽 (IIa) 的DNA (Id) ; (5) 含有 (I) - (Id) 和 (I) 的片段或片段组合的DNA (Ie) 编码第4组禾本科过敏原的免疫调节性T细胞反应形式; (6) (I) - (Ie) 中的任一种编码免疫调节性T细胞反应性片段 , 其通过个别密码子的靶向突变 , 消除或添加而改变; (7) 重组DNA表达载体 , 或克隆系统 , 含有与表达控制序列连接的 (I) - (Ie) 或 (6) 的突变体中的任一种; (8) 用任何新DNA或 (7) 的载体转化的宿主生物; (9) 通过培养 (8) 的宿主制备多肽的方法; (10) 由 (I) - (Ie) 中任一种编码的多肽 (IIb) 或 (6) 的突变体。活动 : 抗过敏。没有给出抗过敏活性测试的细节。作用机制 : 疫苗;脱敏作用。

プライマー番号	ペプチド/DNA	センス/アンチセンス	配列番号	ヌクレオチド配列
29	Phi p 4-P1	s	46	YTN TAY GCN AAR WSN WSN CCN GCN TAY CC
30	Phi p 4-P2	s	47	CAY MGN AAR GGN GTN YTN TTY AAY ATM C
37	Phi p 4-P6	as	48	TAR TTN GCR TAN GCY TGN ACN GGR TT
82	Phi p 4-DNA-NYW	s	49	ACT ACT GGT TCG CCC CGG GAG CC
85	Phi p 4-DNA-GLV	as	50	TGA AGT ATT TCT GGC CCC ACA CCA AAC C
86	Phi p 4-DNA-QRL	as	51	CCC TTG GTG ATG GCG AGC CTC
				TGG
88	Phi p 4-DNA-PSV	s	52	CTC AGT CCT GGG GCA GAC CAT CC