

(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2008-521837

(P2008-521837A)

(43) 公表日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415 Z N A	4 B O 2 4
C07K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	4 C O 8 5
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Q	
GO1N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-543647 (P2007-543647)	(71) 出願人	507180423 ビオマイ アクチエンゲゼルシャフト オーストリア, ヴィエンナ アー-109 O, トップ 1, ラツァレットガッセ 1 9
(86) (22) 出願日	平成17年12月2日 (2005.12.2)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月31日 (2007.5.31)	(72) 発明者	ヴェストリッチュニング, ケルスティン オーストリア, ヴィエンナ アー-118 O, ゲンツガッセ 92-94/2/20
(86) 国際出願番号	PCT/AT2005/000486	(72) 発明者	フォッケ, マルガレーテ オーストリア, ヴィエンナ アー-114 O, ウーテンドルフガッセ 22
(87) 国際公開番号	W02006/058359		
(87) 国際公開日	平成18年6月8日 (2006.6.8)		
(31) 優先権主張番号	A2028/2004		
(32) 優先日	平成16年12月2日 (2004.12.2)		
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 タンパク質アレルゲン誘導体

(57) 【要約】

本発明は、アレルゲン活性が低下した野生型タンパク質アレルゲン誘導体を生成する方法に関するものである。本発明は、アレルゲン活性を有する野生型タンパク質アレルゲンを用意する工程と、上記野生型タンパク質アレルゲンを、アレルゲン活性が低下した、またはアレルゲン活性が欠失した2つのフラグメントにスプライシングし、上記2つのフラグメントを逆方向に再結合する工程を含むことを特徴としている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレルギー活性が低下した野生型タンパク質アレルギー誘導体を生成する方法であって、
アレルギー活性を有する野生型タンパク質アレルギーを用意する工程と、
上記野生型タンパク質アレルギーを、アレルギー活性が低下した、またはアレルギー活性が欠如した2つのフラグメントにスプライシングする工程と、
上記2つのフラグメントを逆方向に再結合する工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

上記誘導体は、宿主によって組換えタンパク質として生成され、当該宿主は特に高い発現能力を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

上記野生型タンパク質アレルギーは、Phl p 12 に代表されるプロフィリン、Bet v 4 に代表されるカンパアレルギー、Der p 2 に代表されるチリダニアレルギー、Lep d 2 に代表される貯蔵庫ダニアレルギー、および Phl p 7 に代表されるオオアワガエリアレルギーからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記野生型アレルギーと比較したときの上記誘導体による IgE 結合能の抑制低下率が、少なくとも 10%、好ましくは 20%、さらに好ましくは 30% であることによって、上記誘導体のアレルギー活性の低下を評価することを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

アレルギーに感作した患者の血清 IgE 抗体が、点染色した上記誘導体に対して結合しないことによって、上記誘導体のアレルギー活性の低下を評価することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

上記誘導体を薬学的に許容される添加剤と組み合わせて、医薬調整物とすることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

上記誘導体を適当なワクチン補助剤と組み合わせて、薬学的に許容されたワクチン調整物とすることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

上記誘導体をさらなるアレルギーと組み合わせて、混合ワクチン調整物とすることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

上記アレルギーは、野生型アレルギーであり、好ましくは野生型アレルギーの混合物、組換え野生型アレルギーの混合物、野生型タンパク質アレルギー誘導体の混合物またはこれらの混合物であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

上記調整物は、アレルギー抽出物をさらに含有していることを特徴とする請求項 6 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

1 から Z のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する野生型タンパク質アレルギーのアレルギー誘導体であって、

上記誘導体は、野生型アレルギーの2つのフラグメントを、N末端からC末端に向かう方向に隣接して含有し、N末端側の当該フラグメントは、X～Zのアミノ酸からなるアミノ酸配列により示され、C末端側の当該フラグメントは、1～Xのアミノ酸からなるアミノ酸配列によって示されるものであり、当該2つのフラグメントは、アレルギー活性が低下または欠落していることを特徴とするアレルギー誘導体。

50

【請求項 1 2】

上記 X ~ Z のアミノ酸からなるアミノ酸配列、および上記 1 ~ X のアミノ酸からなるアミノ酸配列は、少なくとも 30 アミノ酸、好ましくは少なくとも 50 アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも 60 アミノ酸からなることを特徴とする請求項 1 1 に記載のアレルゲン誘導体。

【請求項 1 3】

上記 X ~ Z のアミノ酸からなるアミノ酸配列と、上記 1 ~ X のアミノ酸からなるアミノ酸配列とは、その全長において、50%未満、好ましくは30%未満、より好ましくは20%未満相違することを特徴とする請求項 1 1 または 1 2 に記載のアレルゲン誘導体。

【請求項 1 4】

上記野生型アレルゲンは、I型アレルゲン、好ましくは表 1 に示すのアレルゲン、より好ましくは Phl p 1 2 に代表されるオオアワガエリ (*Phelum pratense*) 花粉アレルゲン、Bet v 4 に代表されるカンバ (*Betula verrucosa*) 花粉アレルゲン、スズメバチ (*Vespula vulgaris*) 毒アレルゲン、アシナガバチ (*Polistes annularis*) 毒アレルゲン、カベイラクサ花粉アレルゲン、ライグラス花粉アレルゲン、Der p 2 に代表されるチリダニアレルゲン、またはこれらの混合物であることを特徴とする請求項 1 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体と、さらなるアレルゲン、好ましくは野生型アレルゲン、より好ましくは野生型アレルゲンの混合物、組換え野生型アレルゲンの混合物、野生型タンパク質アレルゲン誘導体の混合物またはそれらの混合物とを含有していることを特徴とするアレルゲン組成物。

【請求項 1 6】

アレルゲン抽出物をさらに含有していることを特徴とする請求項 1 5 に記載のアレルゲン組成物。

【請求項 1 7】

薬学的に許容される添加剤をさらに含有していることを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載のアレルゲン組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体またはアレルゲン組成物を、アレルゲン特異的免疫療法の調整医薬として使用する使用方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体またはアレルゲン組成物を、受動免疫のための調整医薬として使用する使用方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体またはアレルゲン組成物を、予防免疫のための調整医薬として使用する使用方法。

【請求項 2 1】

上記調整医薬は、補助剤、希釈剤、防腐剤またはこれらの混合物をさらに含有することを特徴とする請求項 1 8 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の使用方法。

【請求項 2 2】

上記組換えアレルゲン誘導体を 10 ng ~ 1 g、好ましくは 100 ng ~ 10 mg、より好ましくは 0.5 ~ 200 μg 含有することを特徴とする請求項 1 8 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の使用方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体を生成する方法であって、

請求項 1 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体をコードする DNA を用意する工程と、

上記 DNA を用いて宿主細胞を形質転換する工程と、

10

20

30

40

50

上記宿主細胞において上記誘導体を発現させ、上記誘導体を単離する工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 24】

上記宿主細胞は、高い発現能力を有していることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 11 から 17 のいずれか 1 項に記載のアレルゲン誘導体を、化学合成により生成することを特徴とするアレルゲン誘導体の生成方法。

【請求項 26】

請求項 1 から 10 または 23 から 25 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる第 1 の野生型プロフィリン分子から得られるプロフィリン誘導体、または

請求項 11 から 14 のいずれかに記載された第 1 の野生型プロフィリン分子のアレルゲン誘導体を、

第 2 の野生型プロフィリン分子によって引き起こされるアレルギー疾患を予防または治療するための調整医薬を生成するために用いる使用方法。

【請求項 27】

上記第 1 および上記第 2 の野生型プロフィリン分子は、Phl p 12、Bet v 2、Art v 4、Ana c、Api g 4、Mus xp 1、Cor a 2、および Dau c 4 からなる群より選択されることを特徴とする請求項 26 に記載の使用法。

【請求項 28】

上記第 1 の野生型プロフィリン分子は Pfl p 12 であり、かつ上記第 2 のプロフィリン分子は、Bet v 2、Art v 4、Ana c、Api g 4、Mus xp 1、Cor a 2、および Dau c 4 からなる群より選択されることを特徴とする請求項 26 に記載の使用法。

【請求項 29】

プロフィリンアレルギーに寄与する花粉と食品との交差性感作の治療および予防の少なくとも一方のための調整医薬の生成に用いることを特徴とする請求項 27 または 28 に記載の使用法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、野生型タンパク質アレルゲンのアレルゲン活性を低下させる方法、新規アレルゲン誘導体、およびアレルギー予防接種に関するものである。

【0002】

アレルギーは、通常は無害である外来（すなわち、非自己）物質（“アレルゲン”）に対する反応能力の、遺伝的あるいは後天的な特異的な変化である。アレルギーは、影響を受けた器官系（皮膚、結膜、鼻、咽頭、気管支粘膜、胃腸管）における炎症反応と、アレルギー性鼻炎、結膜炎、皮膚炎、アナフィラキシーショック、および喘息などの即時性の病徴と、喘息の後期反応やアトピー性皮膚炎などの慢性的な病気の徴候と関連している。

【0003】

I 型アレルギーは遺伝的に決められている過敏性疾患であり、産業化した世界人口のおよそ 20% に影響を与えている。I 型アレルギーの病態生理学的な顕著な特徴は、ほかの無害な抗原（アレルゲン）に対する免疫グロブリン E（IgE）の産出である。

【0004】

現在、アレルギーを引き起こす原因に対する唯一の治療法は、アレルゲン特異的な免疫療法である。アレルゲン特異的な免疫療法では、アレルゲン特異的な反応を引き起こさなくするために、一回の投薬量を増加させながら患者に投薬を行う。アレルゲン特異的な免疫療法の臨床効果を示すいくつかの研究がある一方で、その基礎をなすメカニズムは完全には明らかになっていない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

アレルギー特異的な免疫療法の最大の欠点は、環境由来のアレルゲン抽出物の使用に依存していることである。環境中のアレルゲン抽出物を、少なくとも産業生産レベルまで規格化するのは、不可能ではないにしろ難しい。また、そのような環境中のアレルゲン抽出物は、異なったアレルゲン性および非アレルゲン性の化合物からなりたっている。このために、投与した抽出物に特定のアレルゲンが含まれていないという可能性がある。さらに悪い場合には、含まれる成分に対する新しいIgE特異性を、治療している間に患者が作り出す可能性もありうる。抽出物に基づく免疫療法のほかの欠点は、生物学的に活性なアレルゲン調製物の投与は、アナフィラキシー性の副作用を引き起こすことがあるという事実によるものである。

10

【 0 0 0 6 】

分子生物学の技術を、アレルゲンの特徴づけの分野に応用することにより、環境中のアレルゲンに関連のあるすべてをコードするcDNAを単離することができ、組み換えアレルゲンを生成することができるようになった。このような組み換えアレルゲンをを用いることによって、*in vitro*の診断方法（たとえば、血清中のアレルゲン特異的なIgE抗体の検出）、あるいは*in vivo*の検査により、個々の患者における反応性の特徴を決めることが可能となった。この技術に基づき、アレルギー、特にI型アレルギーに対する患者の免疫感作の特徴に合わせた、構成物質に基づく新規な予防接種方策を発展させることが可能になったようである。しかしながら組み換えアレルゲンは、それらに対応する自然界の物質に類似しているため、組み換えアレルゲンもまた重大なアレルゲン活性を呈していた。組み換えアレルゲンは、野生型アレルゲンのアレルゲン活性を非常によく模倣している。したがって、環境由来のアレルゲンを投与する免疫療法においてみられるような、アレルゲン活性に関連するすべての障害は、組み換えアレルゲンにおいてもみられた。よって免疫療法を改善するためには、組み換えアレルゲンのアレルゲン活性を低下させる必要がある。それにより、アナフィラキシー性の副作用を引き起こす危険性をわずかにして、投与するアレルゲンの一回の投与量を増加させることができるようになる。

20

【 0 0 0 7 】

T細胞のエピトープのみを含むペプチドの投与は、アレルゲン特異的T細胞の活性だけに影響を与えるということはこれまで示唆されている。T細胞エピトープは、無傷のアレルゲンが抗原提示細胞によりタンパク質分解されて生じた低分子ペプチドである。そのようなT細胞エピトープは合成ペプチドとして産出可能である。T細胞エピトープを用いてこれまでにこなった試験では、芳しくない実験結果および低い効果しか得られなかった。T細胞ペプチドに基づいた免疫療法において低い効果しか得られなかった原因の説明として、いくつか考えられる。第一に、活性ではなくT細胞寛容を獲得するのに適した量を投与することが難しいという可能性がある。第二に、低分子のT細胞エピトープペプチドは生体内における半減期が短い可能性がある。第三に、アトピー性の個々の患者におけるIgE産生は記憶免疫応答であるという多くの証拠があることである。記憶免疫応答は、新たなクラススイッチを必要とせず、したがってT細胞由来のサイトカインによっては制御されない。T細胞エピトープの投与だけに基づいている免疫療法の手法は、それゆえ、アレルゲン特異的T細胞の活性を調節しているかもしれないが、すでにクラススイッチした記憶B細胞によるアレルゲン特異的IgE抗体の産出にほとんど影響を及ぼしていないかもしれない。

30

40

【 0 0 0 8 】

組み換えDNA技術もしくはペプチド合成により、低アレルゲン性アレルゲン誘導体または断片を産出することがさらに示唆されている。そのような誘導体あるいは断片は、T細胞エピトープを有しており、天然のアレルゲンに対するIgEの認識と競合するIgG抗体を誘導できる。アレルゲンのタンパク質分解により低分子アレルゲン断片が生じることは20年以上前に示されている。低分子のアレルゲン断片は、部分的にIgE結合能を保持しているが、即時型の免疫応答を引き起こすことはない。アレルゲンのタンパク質分解を制御および規格化するのは難しいが、分子生物学はIgE結合ハプテンを産出する新

50

たな手法を切り開いた。そのような I g E 結合ハプテンは、アナフィラキシー効果の危険性を低下させる能動免疫化、および、受動免疫療法に実用的である。受動免疫療法は、アレルゲンと接触するよりも前にエフェクター細胞に結合した I g E を飽和させることにより、アレルゲンにより誘導される仲介物質の放出を阻止する。

【0009】

遺伝子工学により、低アレルゲン性のアレルゲンの変形を産出することがさらに示唆されていた。これは、アレルゲンは自然界では、数アミノ酸残基のみが異なるアイソフォーム、および/または、構造が異なり I g E との結合能が低いアイソフォームとして存在するという観察結果に基づくものである。たとえば、カバノキの主要な花粉アレルゲン B e t V 1 の遺伝子工学によるオリゴマー化は、アレルゲン活性が大幅に低下した組み換え三量体を生み出した。別の例として、点変異の導入は、アレルゲン構造における立体構造の変化を引き起こして非連続性の I g E エピトープを分離させるか、または I g E 結合能に直接影響を及ぼすことが示唆されている (Valenta et al., Biol.Chem.380 (1999), 815-824)。

10

【0010】

また、アレルゲンを複数の部分(たとえば、2つの部分)に断片化させると、生来の折りたたみ構造に類似の構造が失われるために、アレルゲンの I g E 結合能およびアレルゲン活性がほぼ完全に欠損することが示された。たとえば、B e t v 1 に関しては、V r t a l a et al. (J.Clin.Invest.99 (1997), 1673-1681)、B e t v 4 に関しては、T w a r d o s z et al. (BBRC 239 (1997), 197-204)、A l n g 4 に関しては、H a y e k et al. (J. Immunol.161 (1998), 7031-7039)、ウシ鱗屑アレルゲン (bovine dander allergen) に関しては Z e i l e r et al. (J.Allergy Clin. Immunol.100 (1997), 721-727)、L e p d 2 に関しては、E l f m a n (Int.Arch.Allergy Immunol.117 (1998), 167-173)、P h l p 7 に関しては、W e s t r i t s c h n i g (J.Immunol.172 (2004), 5684-5692)などである。

20

【0011】

非連続性/立体配座の I g E エピトープを主として含んでいるタンパク質の断片化は、アレルゲンの I g E 結合能を大幅に低下させる。この知見に基づき、そのような低アレルゲン性のアレルゲン断片は、i n v i v o において防御免疫応答を引き起こすことが可能であるかどうか、従来技術において研究されており、以下の文献に示されている。W e s t r i t s c h n i g et al. (Curr. Opinion in Allergy and Clin. Immunol. 3 (2003), 495-500)。

30

【0012】

本発明は、上記知見に基づいて改善したアレルギー免疫療法の方法および手段を提供することを目的とする。本方法は、効果的であり、アナフィラキシーショックの危険が低下しており、容易に個々の患者の必要性に適用し、その必要性に合わせることができ、かつ容易に産業上の規模まで変換されるだろう。

【0013】

したがって、本発明は、アレルゲン活性が低下した野生型タンパク質アレルゲン誘導体を生成する方法であって、アレルゲン活性を有する野生型タンパク質アレルゲンを用意する工程と、アレルゲン活性が低下した、またはアレルゲン活性が欠如した2つのフラグメントに上記野生型タンパク質アレルゲンを分割する工程と、逆方向に上記2つのフラグメントを再結合する工程とを含むことを特徴としている。

40

【0014】

本発明に係る方法は、初期不連続/高次構造 I g E エピトープを含有するタンパク質を断片化することによって、アレルゲンの I g E 結合能の実質的な低下が引き起こされるという事実に基づいている。しかし、特定のアレルゲンのフラグメントは、抗原性が非常に低いため、防御抗体応答を生じない (W e s t r i t s c h n i g et al., (2004))。

【0015】

本発明に係る新規かつ定義されたタンパク質アレルゲン誘導体は、T細胞およびB細胞エピトープに基づいた手法を組み合わせた利点を提供する。同時に、フラグメントのみの

50

ワクチン接種、またはフラグメントの精密な処理（例えば、I g E 結合ハプテンおよび3つ以上のフラグメントの混合）による不都合は、本発明のアレルゲン誘導体には存在しない。

【0016】

事実、野生型アレルゲンに非常によく似た（構成成分が完全に一致する）構造（言い換えれば、野生型アレルゲンの全てのアミノ酸に関して類似した構造）において得られる最適の結果が、本発明においても示されている。しかしながら、上記構造のアレルゲンは、アレルゲン活性を有していない（または、アレルゲン活性が十分に低下している）。もちろん、アレルゲン誘導体を生成する間に、いくつかのアミノ酸残基の欠失（削除）または追加（挿入）があればよく、またフラグメントを直接結合する代わりに架橋により結合する場合であっても、依然として本発明の利点は保持される。

10

【0017】

このアレルゲン活性の低下または欠如は、公知のまたは一般的な手法にしたがって、アレルゲンを特定のフラグメントに分割することによって達成される。この一般的な手法に加えて、アレルゲンの2つのフラグメントを、逆方向に再結合する。これによって、アレルゲンの有する本来の関連構造情報を全て含むが（本発明に係るアレルゲン誘導体において、アレルゲンのアミノ酸配列は完全、またはほぼ完全に含まれる）、野生型アレルゲンと比較してアレルゲン活性をほとんど残していないアレルゲン誘導体を提供する。

【0018】

本発明に係るこれらの head to tail 型の誘導体は、個々のアレルギー患者に対して好適であり、かつ効果的な免疫療法を可能にする。また、上記誘導体を用いることによって、一連の工程の規模を容易に拡大可能である。本発明に係る誘導体は、患者の I g E と野生型アレルゲンとの結合をブロックする保護 I g G 抗体を誘導し、アレルゲンが誘導する好塩基球脱顆粒を阻害する。

20

【0019】

本発明の方法は、組換え DNA 技術に特に適している。ひとたび誘導体が遺伝子工学によって生成されれば、好適な宿主における導入遺伝子発現によって、産業上規模の多量の誘導体を容易に得ることができる。本発明に係るアレルゲン誘導体は、高い発現能力を有する宿主において生成されることが好ましい。

【0020】

本発明に係る変異した好適なアレルゲンは、例えば、www.allergen.org/List.htmに基づいており、全ての主要なタンパク質アレルゲンが含まれる。本発明に係るアレルゲンとして特に好ましいアレルゲングループとして、プロフィリン、特に Ph l p 12、カンパアレルゲン、特に B e t v 4、チリダニアレルゲン、特に D e r p 2、貯蔵庫ダニアレルゲン、特に L e p d 2、およびオオアワガエリアレルゲン、特に Ph l p 7、および表 1 に示すアレルゲンが挙げられる。

30

【0021】

表 1 は、本発明に係るフラグメントの移し替えによって変異される好適なアレルゲンである（参考文献も含む）。

【0022】

40

【表 1】

アレルゲン
種名

アレルゲン名	Biochem.ID or 旧名	MW	cDNA or タンパク質	参考, Acc.No.
Ambrosia artemisiifolia				
short ragweed				
Amb a 1	antigen E	8	C	8, 20
Amb a 2	antigen K	38	C	8, 21
Amb a 3	Ra3	11	C	22
Amb a 5	Ra5	5	C	11, 23
Amb a 6	Ra6	10	C	24, 25
Amb a 7	Ra7	12	P	26
Ambrosia trifida				
giant ragweed				
Amb t 5	Ra5G	4.4	C	9, 10, 27
Artemisia vulgaris				
mugwort				
Art v 1		27-29	C	28
Art v 2		35	P	28A
Art v 3	lipid transfer protein	12	P	53
Art v 4	profilin	14	C	29
Helianthus annuus				
sunflower				
Hel a 1		34		29A
Hel a 2	profilin	15.7	C	Y15210
Mercurialis annua				
Mer a 1	profilin	14-15	C	Y13271
Caryophyllales				
Chenopodium album				
lamb's-quarters, pigweed,				
Che a 1		17	C	AY049012, 29B
white goosefoot				
Che a 2	profilin	14	C	AY082337
Che a 3	polcalcin	10	C	AY082338
Salsola kali				
Russian-thistle				
Sal k 1		43	P	29C
Rosales				
Humulus japonicus				
Japanese hop				
Hum j 4w			C	AY335187
Parietaria judaica				
Par j 1	lipid transfer protein 1	15	C	see list of isoallergens
Par j 2	lipid transfer protein 2		C	see list of isoallergens
Par j 3	profilin		C	see list of isoallergens
Parietaria officinalis				
Par o 1	lipid transfer protein	15		29D
B. Grasses				
Poales				
Cynodon dactylon				
Bermuda grass				
Cyn d 1		32	C	30, S83343
Cyn d 7			C	31, X91256
Cyn d 12	profilin	14	C	31a, Y08390
Cyn d 15		9	C	AF517686
Cyn d 22w	enolase	data		pending
Cyn d 23	Cyn d 14	9	C	AF517685
Cyn d 24	Pathogenesis-related p.	21	P	pending
Dactylis glomerata				
orchard grass				
Dac g 1	AgDg1	32	P	32
Dac g 2		11	C	33, S45354
Dac g 3			C	33A, U25343
Dac g 5		31	P	34
Festuca pratensis				
meadow fescue				
Fes p 4w		60	-	
Holcus lanatus				
velvet grass				
Hol l 1			C	Z27084
Lolium perenne				
rye grass				
Lol p 1	group I	27	C	35, 36
Lol p 2	group II	11	P	37, 37A, X73363
Lol p 3	group III	11	P	38
Lol p 5	Lol p IX, Lol p Ib	31/35	C	34, 39

10

20

30

40

Lol p 11 hom: trypsin inhibitor	16		39A	
Phalaris aquatica				
canary grass				
Pha a 1		C	40, S80654	
Phleum pratense				
timothy	27	C	X78813	
Phl p 1		C	X75925, 41	
Phl p 2		C	41A	
Phl p 4		P	42	
Phl p 5	32	C	Z27082, 43	
Phl p 6		C	AF521563, 43A	
Phl p 11 trypsin inhibitor hom.	20	C	X77583, 44	
Phl p 12 profilin		C	AJ238848	
Phl p 13 polygalacturonase	55-60	C		
Poa pratensis				
Kentucky blue grass				
Poa p 1	33	P	46	
Poa p 5	31/34	C	34, 47	10
Sorghum halepense				
Johnson grass				
Sor h 1		C	48	
C. Trees				
Arecales				
Phoenix dactylifera				
date palm				
Pho d 2	14.3	C	Asturias p.c.	
Fagales				
Alnus glutinosa				
alder				
Aln g 1	17	C	S50892	
Betula verrucosa				
birch				
Bet v 1	17	C	see list of isoallergens	20
Bet v 2	15	C	M65179	
Bet v 3		C	X79267	
Bet v 4	8	C	X87153, S54819	
Bet v 6 h: isoflavone reductase	33.5	C	see list of isoallergens	
Bet v 7	18	P	P81531	
Carpinus betulus				
hornbeam				
Car b 1	17	C	see list of isoallergens	
Castanea sativa				
chestnut				
Cas s 1	22	P	52	
Cas s 5 chitinase				
Cas s 8 lipid transfer protein	9.7	P	53	
Corylus avellana				
hazel				
Cor a 1	17	C	see list of isoallergens	
Cor a 2 profilin	14	C		
Cor a 8 lipid transfer protein	9	C		
Cor a 9 11S globulin-like protein	40/?	C	Beyer p.c.	30
Cor a 10 luminal binding prot.	70	C	AJ295617	
Cor a 11 7S vicilin-like prot.	48	C	AF441864	
Quercus alba				
White oak				
Que a 1	17	P	54	
Lamiales				
Oleaceae				
Fraxinus excelsior				
ash	20	P	58A, AF526295	
Ligustrum vulgare				
privet	20	P	58A	
Olea europea				
olive				
Ole e 1	16	C	59, 60	
Ole e 2 profilin	15-18	C	60A	
Ole e 3	9.2		60B	
Ole e 4	32	P	P80741	40
Ole e 5	16	P	P80740	
Ole e 6	10	C	60C, U86342	
Ole e 7	?	P	60D, P81430	
Ole e 8	21	C	60E, AF078679	
Ole e 9	46	C	AF249675	
Ole e 10 glycosyl hydrolase hom.	11	C	60F, AY082335	
Syringa vulgaris				
lilac	20	P	58A	
Plantaginaceae				
Plantago lanceolata				
English plantain				
Pla l 1	18	P	P842242	

Pinales					
Cryptomeria japonica					
sugi Cry j 1	41-45	C		55, 56	
Cry j 2		C		57, D29772	
Cupressus arizonica					
cypress					
Cup a 1	43	C		A1243570	
Cupressus sempervirens					
common cypress					
Cup s 1	43	C		see list of isoallergens	
Cup s 3w	34	C		ref pending	
Juniperus ashei					
mountain cedar					
Jun a 1	43	P		P81294	
Jun a 2		C		57A, AJ404653	
Jun a 3	30	P		57B, P81295	
Juniperus oxycedrus					
prickly juniper					
Jun o 4 hom: calmodulin	29	C		57C, AF031471	
Juniperus sabinoides					
mountain cedar					
Jun s 1	50	P		58	
Juniperus virginiana					
eastern red cedar					
Jun v 1	43	P		P81825, 58B	
Platanaceae					
Platanus acerifolia					
London plane tree					
Pla a 1	18	P		P82817	
Pla a 2	43	P		P82967	
Pla a 3 lipid transfer protein	10	P		Iris p.c.	
D. Mites					
Acarus siro			arthropod		
mite Aca s 13 fatty acid binding prot.	14*	C		AJ006774	
Blomia tropicalis					
mite Blo t 1 cysteine protease	39	C		AF277840	
Blo t 3 trypsin	24*	C		Cheong p.c.	
Blo t 4 alpha amylase	56	C		Cheong p.c.	
Blo t 5		C		U59102	
Blo t 6 chymotrypsin	25	C		Cheong p.c.	
Blo t 10 tropomyosin	33	C		61	
Blo t 11 paramyosin	110	C		AF525465, 61A	
Blo t 12 Bt11a		C		U27479	
Blo t 13 Bt6, fatty acid bind prot.		C		U58106	
Blo t 19 anti-microbial pep. hom.	7.2	C		Cheong p.c.	
Dermatophagoides farinae					
American house dust mite					
Der f 1 cysteine protease	25	C		69	
Der f 2	14	C		70, 70A, see list of isoaller-	30
gens					
Der f 3 trypsin	30	C		63	
Der f 7	24-31	C		SW:Q26456, 71	
Der f 10 tropomyosin		C		72	
Der f 11 paramyosin	98	C		72A	
Der f 14 mag3, apolipoprotein		C		D17686	
Der f 15 98k chitinase	98	C		AF178772	
Der f 16 gelsolin/villin	53	C		71A	
Der f 17 Ca binding EF protein	53	C		71A	
Der f 18w 60k chitinase	60	C		Weber p.c.	
Dermatophagoides microceras					
house dust mite					
Der m 1 cysteine protease	25	P		68	
Dermatophagoides pteronyssinus					
European house dust mite					
Der p 1 antigen P1, cysteine protease	25	C		62, see list of isoallergens	
Der p 2	14	C		62A-C, see list of isoallergens	
Der p 3 trypsin	28/30	C		63	40
Der p 4 amylase	60	P		64	
Der p 5	14	C		65	
Der p 6 chymotrypsin	25	P		66	
Der p 7	22/28	C		67	
Der p 8 glutathione transferase		C		67A	
Der p 9 collagenolytic serine pro.		P		67B	
Der p 10 tropomyosin	36	C		Y14906	
Der p 14 apolipoprotein like prot.		C		Epton p.c.	
Euroglyphus maynei					

mite	Eur m 2			C	see list of isoallergens
	Eur m 14	apolipophorin	177	C	AF149827
Glycyphagus domesticus					
storage mite					
	Gly d 2			C	72B, see isoallergen list
Lepidoglyphus destructor					
storage mite					
	Lep d 2	Lep d 1	15	C	73, 74, 74A, see isoallergen
list					
	Lep d 5			C	75, AJ250278
	Lep d 7			C	75, AJ271058
	Lep d 10	tropomyosin		C	75A, AJ250096
	Lep d 13			C	75, AJ250279
Tyrophagus putrescentiae					
storage mite					
	Tyr p 2			C	75B, Y12690
E. Animals					
Bos domesticus					
domestic cattle					
	Bos d 2	Ag3, lipocalin	20	C	76, see isoallergen list
(see also foods)					
	Bos d 3	Ca-binding S100 hom.	11	C	L39834
	Bos d 4	alpha-lactalbumin	14.2	C	M18780
	Bos d 5	beta-lactoglobulin	18.3	C	X14712
	Bos d 6	serum albumin	67	C	M73993
	Bos d 7	immunoglobulin	160		77
	Bos d 8	caseins	20-30		77
Canis familiaris					
(Canis domesticus)					
	Can f 1		25	C	78, 79
dog	Can f 2		27	C	78, 79
	Can f 3	albumin		C	S72946
	Can f 4		18	P	A59491
Equus caballus					
domestic horse					
	Equ c 1	lipocalin	25	C	U70823
	Equ c 2	lipocalin	18.5	P	79A, 79B
	Equ c 3	Ag3 - albumin	67	C	79C, X74045
	Equ c 4		17	P	79D
	Equ c 5	AgX	17	P	Goubran Botros p.c.
Felis domesticus					
cat (saliva)					
	Fel d 1	cat-1	38	C	15
	Fel d 2	albumin		C	79E, X84842
	Fel d 3	cystatin	11	C	79F, AF238996
	Fel d 4	lipocalin	22	C	AY497902
	Fel d 5w	immunoglobulin A	400		Adedoyin p.c.
	Fel d 6w	immunoglobulin M			
800-					
1000					
		Adedoyin p.c.			
	Fel d 7w	immunoglobulin G	150		Adedoyin p.c.
Cavia porcellus					
guinea pig					
	Cav p 1	lipocalin homologue	20	P	SW:P83507, 80
	Cav p 2		17	P	SW:P83508
Mus musculus					
mouse (urine)					
	Mus m 1	MUP	19	C	81, 81A
Rattus norvegicus					
rat (urine)					
	Rat n 1		17	C	82, 83
F. Fungi (moulds)					
1. Ascomycota					
1.1 Dothideales					
Alternaria alternata					
	Alt a 1		28	C	U82633
	Alt a 2		25	C	83A, U62442
	Alt a 3	heat shock prot.	70	C	U87807, U87808
	Alt a 4	prot. disulfideisomerase	57	C	X84217
	Alt a 6	acid ribosomal prot. P2	11	C	X78222, U87806
	Alt a 7	YCP4 protein	22	C	X78225
	Alt a 10	aldehyde dehydrogenase	53	C	X78227, P42041
	Alt a 11	enolase	45	C	U82437
	Alt a 12	acid ribosomal prot. P1	11	C	X84216
Cladosporium herbarum					

10

20

30

40

Cla h 1	13		83B, 83C	
Cla h 2	23		83B, 83C	
Cla h 3 aldehyde dehydrogenase	53	C	X78228	
Cla h 4 acid ribosomal prot. P2	11	C	X78223	
Cla h 5 YCP4 protein	22	C	X78224	
Cla h 6 enolase	46	C	X78226	
Cla h 12 acid ribosomal prot. P1	11	C	X85180	
1.2 Eurotiales				
Aspergillus flavus				
Asp fl 13 alkaline serine protease	34		84	
Aspergillus fumigatus				
Asp f 1	18	C	M83781, S39330	
Asp f 2	37	C	U56938	
Asp f 3 peroxisomal protein	19	C	U20722	
Asp f 4	30	C	AJ001732	
Asp f 5 metalloprotease	40	C	Z30424	
Asp f 6 Mn superoxide dismut.	26.5	C	U53561	10
Asp f 7	12	C	AJ223315	
Asp f 8 ribosomal prot. P2	11	C	AJ224333	
Asp f 9	34	C	AJ223327	
Asp f 10 aspartic protease	34	C	X85092	
Asp f 11 peptidyl-prolyl isomerases	24		84A	
Asp f 12 heat shock prot. P90	90	C	85	
Asp f 13 alkaline serine protease	34		84B	
Asp f 15	16	C	AJ002026	
Asp f 16	43	C	g3643813	
Asp f 17		C	AJ224865	
Asp f 18 vacuolar serine protease	34		84C	
Asp f 22w enolase	46	C	AF284645	
Asp f 23 L3 ribosomal protein	44	C	85A, AF464911	
Aspergillus niger				
Asp n 14 beta-xylosidase	105	C	AF108944	
Asp n 18 vacuolar serine protease	34	C	84B	
Asp n 25 3-phytase B	66-100	C	85B, P34754	20
Asp n ?	85	C	Z84377	20
Aspergillus oryzae				
Asp o 13 alkaline serine protease	34	C	X17561	
Asp o 21 TAKA-amylase A	53	C	D00434, M33218	
Penicillium brevicompactum				
Pen b 13 alkaline serine protease	33		86A	
Penicillium chrysogenum (formerly P. notatum)				
Pen ch 13 alkaline serine protease	34		87	
Pen ch 18 vacuolar serine protease	32		87	
Pen ch 20 N-acetyl glucosaminidase	68		87A	
Penicillium citrinum				
Pen c 3 peroxisomal mem. prot.	18		86B	
Pen c 13 alkaline serine protease	33		86A	
Pen c 19 heat shock prot. P70	70	C	U64207	
Pen c 22w enolase	46	C	AF254643	
Pen c 24 elongation factor 1 beta		C	AY363911	
Penicillium oxalicum				
Pen o 18 vacuolar serine protease	34		87B	30
1.3 Hypocreales				
Fusarium culmorum				
Fus c 1 ribosomal prot. P2	11*	C	AY077706	
Fus c 2 thioredoxin-like prot.	13*	C	AY077707	
1.4 Onygenales				
Trichophyton rubrum				
Tri r 2		C	88	
Tri r 4 serine protease		C	88	
Trichophyton tonsurans				
Tri t 1	30	P	88A	
Tri t 4 serine protease	83	C	88	
1.5 Saccharomycetales				40
Candida albicans				
Cand a 1	40	C	89	
Cand a 3 peroxisomal protein	29	C	AY136739	
Candida boidinii				
Cand b 2	20	C	J04984, J04985	
2. Basidiomycotina				
2.1 Hymenomycetes				
Psilocybe cubensis				
Psi c 1				

Psi c 2	cyclophilin	16		89A	
Coprinus comatus shaggy cap					
Cop c 1	leucine zipper protein	11	C	AJ132235	
Cop c 2				AJ242791	
Cop c 3				AJ242792	
Cop c 5				AJ242793	
Cop c 7				AJ242794	
2.2 Urediniomycetes					
Rhodotorula mucilaginosa					
Rho m 1	enolase	47	C	89B	
Rho m 2	vacuolar serine protease	31	C	AY547285	
2.3 Ustilaginomycetes					
Malassezia furfur					
Mala f 2	MF1, peroxisomal membrane protein	21	C	AB011804, 90	
Mala f 3	MF2, peroxisomal membrane protein	20	C	AB011805, 90	
Mala f 4	mitochondrial malate dehydrogenase	35	C	AF084828, 90A	
Malassezia sympodialis					
Mala s 1			C	X96486, 91	
Mala s 5		18*	C	AJ011955	
Mala s 6		17*	C	AJ011956	
Mala s 7			C	AJ011957, 91A	
Mala s 8		19*	C	AJ011958, 91A	
Mala s 9		37*	C	AJ011959, 91A	
Mala s 10	heat shock prot. 70	86	C	AJ428052	
Mala s 11	Mn superoxide dismut.	23	C	AJ548421	
3. Deuteromycotina					
3.1 Tuberculariales					
Epicoccum purpurascens (formerly E. nigrum)					
Epi p 1	serine protease	30	P	SW:P83340, 91B	
G. Insects					
Aedes aegyptii mosquito					
Aed a 1	apyrase	68	C	L12389	
Aed a 2		37	C	M33157	
Apis mellifera honey bee					
Api m 1	phospholipase A2	16	C	92	
Api m 2	hyaluronidase	44	C	93	
Api m 4	melittin	3	C	94	
Api m 6		7-8	P	Kettner p.c.	
Api m 7	CUB serine protease	39	C	AY127579	
Bombus pennsylvanicus bumble bee					
Bom p 1	phospholipase	16	P	95	
Bom p 4	protease		P	95	
Blattella germanica German cockroach					
Bla g 1	Bd90k		C		
Bla g 2	aspartic protease	36	C	96	
Bla g 4	calycin	21	C	97	
Bla g 5	glutathione transferase	22	C	98	
Bla g 6	troponin C	27	C	98	
Periplaneta americana American cockroach					
Per a 1	Cr-PII		C		
Per a 3	Cr-PI	72-78	C	98A	
Per a 7	tropomyosin	37	C	Y14854	
Chironomus kiliensis midge					
Chi k 10	tropomyosin	32.5*	C	AJ012184	
Chironomus thummi thummi midge					
Chi t 1-9	hemoglobin	16	C	99	
Chi t 1.01	component III	16	C	P02229	
Chi t 1.02	component IV	16	C	P02230	
Chi t 2.0101	component I	16	C	P02221	
Chi t 2.0102	component IA	16	C	P02221	
Chi t 3	component II-beta	16	C	P02222	
Chi t 4	component IIIA	16	C	P02231	
Chi t 5	component VI	16	C	P02224	
Chi t 6.01	component VIIA	16	C	P02226	
Chi t 6.02	component IX	16	C	P02223	
Chi t 7	component VIIB	16	C	P02225	
Chi t 8	component VIII	16	C	P02227	

10

20

30

40

Chi t 9	component X	16	C	P02228	
Ctenocephalides felis felis					
cat flea					
Cte f 1					
Cte f 2	M1b	27	C	AF231352	
Cte f 3		25	C		
Thaumetopoea pityocampa					
pine processionary moth					
Tha p 1		15	P	PIR:A59396, 99A	
Lepisma saccharina					
silverfish					
Lep s 1	tropomyosin	36	C	AJ309202	
Dolichovespula maculata					
white face hornet					
Dol m 1	phospholipase A1	35	C	100	
Dol m 2	hyaluronidase	44	C	101	
Dol m 5	antigen 5	23	C	102, 103	10
Dolichovespula arenaria					
yellow hornet					
Dol a 5	antigen 5	23	C	104	
Polistes annularies					
wasp					
Pol a 1	phospholipase A1	35	P	105	
Pol a 2	hyaluronidase	44	P	105	
Pol a 5	antigen 5	23	C	104	
Polistes dominulus					
Mediterranean paper wasp					
Pol d 1				Hoffman p.c.	
Pol d 4	serine protease	32-34	C	Hoffman p.c.	
Pol d 5				P81656	
Polistes exclamans					
wasp					
Pol e 1	phospholipase A1	34	P	107	
Pol e 5	antigen 5	23	C	104	
Polistes fuscatus					
wasp					
Pol f 5	antigen 5	23	C	106	
Polistes gallicus					
wasp					
Pol g 5	antigen 5	24	C	P83377	20
Polistes metricus					
wasp					
Pol m 5	antigen 5	23	C	106	
Vespa crabo					
European hornet					
Vesp c 1	phospholipase	34	P	107	
Vesp c 5	antigen 5	23	C	106	
Vespa mandarina					
giant asian hornet					
Vesp m 1				Hoffman p.c.	
Vesp m 5				P81657	
Vespula flavopilosa					
yellowjacket					
Ves f 5	antigen 5	23	C	106	
Vespula germanica					
yellowjacket					
Ves g 5	antigen 5	23	C	106	
Vespula maculifrons					
yellowjacket					
Ves m 1	phospholipase A1	33.5	C	108	30
Ves m 2	hyaluronidase	44	P	109	
Ves m 5	antigen 5	23	C	104	
Vespula pennsylvanica					
yellowjacket					
Ves p 5	antigen 5	23	C	106	
Vespula squamosa					
yellowjacket					
Ves s 5	antigen 5	23	C	106	
Vespula vidua					
wasp					
Ves vi 5	antigen 5	23	C	106	
Vespula vulgaris					
yellowjacket					
Ves v 1	phospholipase A1	35	C	105A	
Ves v 2	hyaluronidase	44	P	105A	
Ves v 5	antigen 5	23	C	104	
Myrmecia pilosula					
Australian jumper ant					
Myr p 1			C	X70256	40
Myr p 2			C	S81785	
Solenopsis geminata					
tropical fire ant					
Sol g 2				Hoffman p.c.	
Sol g 4				Hoffman p.c.	
Solenopsis invicta					
fire ant					
Sol i 2		13	C	110, 111	
Sol i 3		24	C	110	
Sol i 4		13	C	110	
Solenopsis saevissima					
Brazilian fire ant					

Sol s 2					Hoffman p.c.	
Triatoma protracta						
California kissing bug						
Tria p 1	Procalin		20	C	AF179004, 111A.	
H. Foods						
Gadus callarias						
cod						
Gad c 1	allergen M		12	C	112, 113	
Salmo salar						
Atlantic salmon						
Sal s 1	parvalbumin		12	C	X97824	
Bos domesticus						
domestic cattle						
Bos d 4	alpha-lactalbumin		14.2	C	M18780	
(milk) Bos d 5	beta-lactoglobulin		18.3	C	X14712	10
see also animals						
Bos d 6	serum albumin		67	C	M73993	
Bos d 7	immunoglobulin		160		77	
Bos d 8	caseins		20-30		77	
Gallus domesticus						
chicken						
Gal d 1	ovomucoid		28	C	114, 115	
Gal d 2	ovalbumin		44	C	114, 115	
Gal d 3	Ag22, conalbumin		78	C	114, 115	
Gal d 4	lysozyme		14	C	114, 115	
Gal d 5	serum albumin		69	C	X60688	
Metapenaeus ensis						
shrimp Met e 1	tropomyosin			C	U08008	
Penaeus aztecus						
shrimp Pen a 1	tropomyosin		36	P	116	
Penaeus indicus						
shrimp Pen i 1	tropomyosin		34	C	116A	20
Penaeus monodon						
black tiger shrimp						
Pen m 1	tropomyosin		38	C		
Pen m 2	arginine kinase		40	C	AF479772, 117	
Todarodes pacificus						
squid Tod p 1	tropomyosin		38	P	117A	
Helix aspersa						
brown garden snail						
Hel as 1	tropomyosin		36	C	Y14855, 117B	
Haliotis midae						
abalone						
Hal m 1			49		117C	
Rana esculenta						
edible frog						
Ran e 1	parvalbumin alpha		11.9*	C	AJ315959	
Ran e 2	parvalbumin beta		11.7*	C	AJ414730	
Brassica juncea						
oriental mustard						
Bra j 1	2S albumin		14	C	118	30
Brassica napus						
rapeseed						
Bra n 1	2S albumin		15	P	118A, P80208	
Brassica rapa						
turnip Bra r 2	hom: prohevein		25		P81729	
Hordeum vulgare						
barley Hor v 15	BMAI-1		15	C	119	
Hor v 16	alpha-amylase					
Hor v 17	beta-amylase					
Hor v 21	gamma-3 hordein		34	C	119A,	
SW:P80198						
Secale cereale						
rye Sec c 20	secalin				see isoall. list	
Triticum aestivum						
wheat Tri a 18	agglutinin					
Tri a 19	omega-5 gliadin		65	P	PIR:A59156	40
Zea mays						
maize, corn						
Zea m 14	lipid transfer prot.		9	P	P19656	
Oryza sativa						
rice Ory s 1				C	119B, U31771	
Apium graveolens						
celery Api g 1	hom: Bet v 1		16*	C	Z48967	
Api g 4	profilin				AF129423	
Api g 5			55/58	P	P81943	
Daucus carota						
carrot Dau c 1	hom: Bet v 1		16	C	117D, see isoallergen list	
Dau c 4	profilin			C	AF456482	

Corylus avellana						
hazelnut						
	Cor a 1.04	hom: Bet v 1	17	C	see list of isoallergens	
	Cor a 2	profilin	14	C	AF327622	
	Cor a 8	lipid transfer protein	9	C	AF329829	
Malus domestica						
apple						
	Mal d 1	hom: Bet v 1		C	see list of isoallergens	
	Mal d 2	hom: thaumatin		C	AJ243427	
	Mal d 3	lipid transfer protein	9	C	Pastorello p.c.	
	Mal d 4	profilin	14.4*	C	see list of isoallergens	
Pyrus communis						
pear						
	Pyr c 1	hom: Bet v 1	18	C	AF05730	
	Pyr c 4	profilin	14	C	AF129424	
	Pyr c 5	hom: isoflavone reductas	33.5	C	AF071477	
Persea americana						
	avocado	Pers a 1	endochitinase	32	C	Z78202
Prunus armeniaca						
apricot						
	Pru ar 1	hom: Bet v 1		C	U93165	
	Pru ar 3	lipid transfer protein	9	P		
Prunus avium						
sweet cherry						
	Pru av 1	hom: Bet v 1		C	U66076	
	Pru av 2	hom: thaumatin		C	U32440	
	Pru av 3	lipid transfer protein	10	C	AF221501	
	Pru av 4	profilin	15	C	AF129425	
Prunus domestica						
European plum						
	Pru d 3	lipid transfer protein	9	P	119C	
Prunus persica						
peach						
	Pru p 3	lipid transfer protein	10	P	P81402	
	Pru p 4	profilin	14	C	see isoallergen list	
Asparagus officinalis						
Asparagus						
	Aspa o 1	lipid transfer protein	9	P	119D	
Crocus sativus						
	saffron crocus	Cro s 1	21		Varasteh A-R p.c.	
Lactuca sativa						
lettuce						
	Lac s 1	lipid transfer protein	9		Vieths p.c.	
Vitis vinifera						
grape						
	Vit v 1	lipid transfer protein	9	P	P80274	
Musa x paradisiaca						
	banana	Mus xp 1	profilin	15	C	AF377948
Ananas comosus						
pineapple						
	Ana c 1	profilin	15	C	AF377949	
	Ana c 2	bromelain	22.8*	C	119E-G, D14059	
Citrus limon						
	lemon	Cit l 3	lipid transfer protein	9	P	Torrejon p.c.
Citrus sinensis						
sweet orange						
	Cit s 1	germin-like protein	23	P	Torrejon p.c.	
	Cit s 2	profilin	14	P	Torrejon p.c.	
	Cit s 3	lipid transfer protein	9	P	Torrejon p.c.	
Litchi chinensis						
	litchi	Lit c 1	profilin	15	C	AY049013
Sinapis alba						
yellow mustard						
	Sin a 1	2S albumin	14	C	120	
Glycine max						
soybean						
	Gly m 1	HPS	7	P	120A	
	Gly m 2		8	P	A57106	
	Gly m 3	profilin	14	C	see list of isoallergens	
	Gly m 4	(SAM22) PR-10 prot.	17	C	X60043, 120B	
Vigna radiata						
mung bean						
	Vig r 1	PR-10 protein	15	C	AY792956	
Arachis hypogaea						
peanut						
	Ara h 1	vicilin	63.5	C	L34402	
	Ara h 2	conglutin	17	C	L77197	
	Ara h 3	glycinin	60	C	AF093541	
	Ara h 4	glycinin	37	C	AF086821	
	Ara h 5	profilin	15	C	AF059616	
	Ara h 6	hom: conglutin	15	C	AF092846	
	Ara h 7	hom: conglutin	15	C	AF091737	
	Ara h 8	PR-10 protein	17	C	AY328088	
Lens culinaris						
lentil						
	Len c 1	vicilin	47	C	see list of isoallergens	
	Len c 2	seed biotinylated prot.	66	P	120C	
Pisum sativum						
pea						
	Pis s 1	vicilin	44	C	see list of isoallergens	

Pis s 2	convicilin	63	C	pending
Actinidia chinensis				
kiwi	Act c 1 cysteine protease	30	P	P00785
	Act c 2 thaumatin-like protein	24	P	SW:P81370, 121
Capsicum annuum				
bell pepper				
	Cap a 1w osmotin-like protein	23	C	AJ297410
	Cap a 2 profilin	14	C	AJ417552
Lycopersicon esculentum				
tomato	Lyc e 1 profilin	14	C	AJ417553
	Lyc e 2 b-fructofuranosidase	50	C	see isoallergen list
	Lyc e 3 lipid transfer prot.	6	C	U81996
Solanum tuberosum				
potato	Sola t 1 patatin	43	P	P15476
	Sola t 2 cathepsin D inhibitor	21	P	P16348
	Sola t 3 cysteine protease inhibitor	21	P	P20347
	Sola t 4 aspartic protease inhibitor	16+4	P	P30941
Bertholletia excelsa				
Brazil nut				
	Ber e 1 2S albumin	9	C	P04403, M17146
	Ber e 2 11S globulin seed storage protein	29	C	AY221641
Juglans nigra				
black walnut				
	Jug n 1 2S albumin	19*	C	AY102930
	Jug n 2 vicilin-like prot.	56*	C	AY102931
Juglans regia				
English walnut				
	Jug r 1 2S albumin		C	U66866
	Jug r 2 vicilin	44	C	AF066055
	Jug r 3 lipid transfer protein	9	P	Pastorello
Anacardium occidentale				
Cashew	Ana o 1 vicilin-like protein	50	C	see isoallergen list
	Ana o 2 legumin-like protein	55	C	AF453947
	Ana o 3 2S albumin	14	C	AY081853
Ricinus communis				
Castor bean				
	Ric c 1 2S albumin		C	P01089
Sesamum indicum				
sesame	Ses i 1 2S albumin	9	C	121A, AF240005
	Ses i 2 2S albumin	7	C	AF091841
	Ses i 3 7S vicilin-like globulin	45	C	AF240006
	Ses i 4 oleosin	17	C	AAG23840
	Ses i 5 oleosin	15	C	AAD42942
Cucumis melo				
muskmelon				
	Cuc m 1 serine protease	66	C	D32206
	Cuc m 2 profilin	14	C	AY271295
	Cuc m 3 pathogenesis-rel p. PR-1	16*	P	P83834
I, Others				
Anisakis simplex				
nematode				
	Ani s 1	24	P	121B, A59069
	Ani s 2 paramyosin	97	C	AF173004
	Ani s 3 tropomyosin	41	C	121C, Y19221
	Ani s 4	9	P	P83885
Argas reflexus				
pigeon tick				
	Arg r 1	17	C	AJ697694
Ascaris suum				
worm	Asc s 1	10	P	122
Carica papaya				
papaya	Car p 3w papain	23.4*	C	122A, M15203
Dendronephthya nipponica				
soft coral				
	Den n 1	53	P	122B
Hevea brasiliensis				
rubber (latex)				
	Hev b 1 elongation factor	58	P	123, 124
	Hev b 2 1,3-glucanase	34/36	C	125
	Hev b 3	24	P	126, 127
	Hev b 4 component of microhelix complex	100-115	P	128
	Hev b 5	16	C	U42640
	Hev b 6.01 hevein precursor	20	C	M36986, p02877
	Hev b 6.02 hevein	5	C	M36986, p02877
	Hev b 6.03 C-terminal fragment	14	C	M36986, p02877
	Hev b 7.01 hom: patatin from B-serum	42	C	U80598
	Hev b 7.02 hom: patatin from C-serum	44	C	AJ223038
	Hev b 8 profilin	14	C	see list of isoallergens
	Hev b 9 enolase	51	C	AJ132580

10

20

30

40

Hev b 10 Mn superoxide dismut.	26	C	see list of isoallergens
Hev b 11 class 1 chitinase		C	see list of isoallergens
Hev b 12 lipid transfer protein	9.3	C	AY057860
Hev b 13 esterase	42	P	P83269
Homo sapiens			
human autoallergens			
Hom s 1	73*	C	Y14314
Hom s 2	10.3*	C	X80909
Hom s 3	20.1*	C	X89985
Hom s 4	36*	C	Y17711
Hom s 5	42.6*	C	P02538
Triplochiton scleroxylon			
obeche Trip s 1 class 1 chitinase	38.5	P	Kespohl p.c.

【 0 0 2 3 】

〔 参考文献 〕

1. Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an allergen database. IUI S, Baltimore, MD, Edition 1.0.
2. Marsh, D. G., L. Goodfriend, T. P. King, H. Lowenstein, and T. A. E. Platt-Mills. 1986. Allergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.
3. King, T.P., P.S. Norman, and J.T. Cornell. 1964. Isolation and characterization of allergen from ragweed pollen. II. Biochemistry 3:458-468.
4. Lowenstein, H. 1980. Timothy pollen allergens. Allergy 35:188-191.
5. Aukrust, L. 1980. Purification of allergens in Cladosporium herbarum. Allergy 35:206-207.
6. Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark, and P. E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics 54:61-75. 20
7. Bodmer, J. G., E. D. Albert, W. F. Bodmer, B. Dupont, H. A. Erlich, B. Mach, S. G. E. Marsh, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasuki, G. M. Th. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard, and P. I. Terasaki. 1991. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. Immunogenetics 33:301-309.
8. Griffith, I.J., J. Pollock, D.G. Klapper, B.L. Rogers, and A.K. Nault. 1991. Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambr osia artemisiifolia* (short ragweed). Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
9. Roebber, M., D. G. Klapper, L. Goodfriend, W. B. Bias, S. H. Hsu, and D. G. Marsh. 1985. Immunochemical and genetic studies of Amb t V (Ra5G), an Ra5 homologue from giant ragweed pollen. J. Immunol. 134:3062-3069. 30
10. Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roebber, M. Friedrichs, D. G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Solution structures of ragweed allergen Amb t V. Biochemistry 31:5117-5127.
11. Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roebber, D. G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Proton resonance assignments and three-dimensional solution structure of the ragweed allergen Amb a V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry 31:8697-8705.
12. Goodfriend, L., A.M. Choudhury, J. Del Carpio, and T.P. King. 1979. Cytochromes C: New ragweed pollen allergens. Fed. Proc. 38:1415. 40
13. Ekramoddoullah, A. K. M., F. T. Kisil, and A. H. Sehon. 1982. Allergenic cross reactivity of cytochrome c from Kentucky bluegrass and perennial ryegrass pollens. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
14. Ansari, A. A., E. A. Killoran, and D. G. Marsh. 1987. An investigation of human response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p X). J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
15. Morgenstern, J.P., I.J. Griffith, A.W. Brauer, B.L. Rogers, J.F. Bond, M.D. Chapman, and M. Kuo. 1991. Amino acid sequence of Fel d I, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. Proc. Natl. 50

Acad. Sci. USA 88:9690-9694.

16. Griffith, I.J., S. Craig, J. Pollock, X. Yu, J.P. Morgenstern, and B.L. Rogers. 1992. Expression and genomic structure of the genes encoding Fd1, the major allergen from the domestic cat. *Gene* 113:263-268.

17. Weber, A., L. Marz, and F. Altmann. 1986. Characteristics of the asparagine-linked oligosaccharide from honey-bee venom phospholipase A2. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B:321-324.

18. Weber, A., H. Schroder, K. Thalberg, and L. Marz. 1987. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. *Allergy* 42:464-470.

19. Stanworth, D. R., K. J. Dorrington, T. E. Hugli, K. Reid, and M. W. Turner. 1990. Nomenclature for synthetic peptides representative of immunoglobulin chain sequences. *Bulletin WHO* 68:109-111.

20. Rafnar, T., I. J. Griffith, M. C. Kuo, J. F. Bond, B. L. Rogers, and D.G. Klapper. 1991. Cloning of Amb a I (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* 266: 1229-1236.

21. Rogers, B.L., J.P. Morgenstern, I.J. Griffith, X.B. Yu, C.M. Counsell, A.W. Brauer, T.P. King, R.D. Garman, and M.C. Kuo. 1991. Complete sequence of the allergen Amb a II: recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. *J. Immunol.* 147:2547-2552.

22. Klapper, D.G., L. Goodfriend, and J.D. Capra. 1980. Amino acid sequence of ragweed allergen Ra3. *Biochemistry* 19:5729-5734.

23. Ghosh, B., M.P. Perry, T. Rafnar, and D.G. Marsh. 1993. Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Immunol.* 150:5391-5399.

24. Roebber, M., R. Hussain, D. G. Klapper, and D. G. Marsh. 1983. Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6. *J. Immunol.* 131:706-711.

25. Lubahn, B., and D.G. Klapper. 1993. Cloning and characterization of ragweed allergen Amb a VI (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.

26. Roebber, M., and D.G. Marsh. 1991. Isolation and characterization of allergen Amb a VII from short ragweed pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:324.

27 Goodfriend L, Choudhury AM, Klapper DG, Coulter KM, Dorval G, DelCarpio J, Osterland CK. Ra5G, a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: isolation, HLA-DR-associated activity and amino acid sequence. *Mol Immunol* 22: 899-906, 1985.

28 Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F, van Ree R, Briza P, Richter K, Ebner C, Ferreira F. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 17: 106-108, 2003.

28A Nilsen, B. M., K. Sletten, M. O'Neill, B. Smestad Paulsen, and H. van Halbeek. 1991. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris*). *J. Biol. Chem.* 266:2660-2668.

29 Wopfner N, Willeroidee M, Hebenstreit D, van Ree R, Aalbers M, Briza P, Thalmer J, Ebner C, Richter K, Ferreira F. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biol Chem* 383: 1779-1789, 2002.

29A Jimenez A, Moreno C, Martinez J, Martinez A, Bartolome B, Guerra F, Palacios R 1994. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int Arch Allergy Immunol* 105:297-307.

29B Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodriguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy I*

10

20

30

40

50

mmunol 127: 47-54, 2002.

29C Carnes J, Fernandez-Caldas E, Casanovas M, Lahoz C, Colas C. Immunochemical characterization of *Salsola kali* pollen extracts. *Allergy* 56, Supplement 68: 274, 2001.

29D Giuliani A, Pini C, Bonini S, Mucci N, Ferroni L, Vicari G: Isolation and purification of a major allergen from *Parietaria officinalis* pollen. *Allergy* 42: 434-440, 1987.

30 Smith, P.M., Suphioglu, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B. and Singh, M. B. 1996. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:331-343. 10

31 Suphioglu, C., Ferreira, F. and Knox, R.B. 1997. Molecular cloning and immunological characterisation of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* 402:167-172.

31a. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, and Palacios R. 1997. Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Exp Allergy* 27:1307-1313.

32. Mecheri, S., G. Peltre, and B. David. 1985. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: The Ag Dg 1. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78:283-289. 20

33. Roberts, A.M., L.J. Bevan, P.S. Flora, I. Jepson, and M.R. Walker. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the Group II allergen of Cocksfoot/Orchard grass (*Dactylis glomerata*), Dac g II. *Allergy* 48:615-623.

33a. Guerin-Marchand, C., Senechal, H., Bouin, A.P., Leduc-Brodard, V., Taudou, G., Weyer, A., Peltre, G. and David, B. 1996. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol. Immunol.* 33:797-806.

34. Klysner, S., K. Welinder, H. Lowenstein, and F. Matthiesen. 1992. Group V allergens in grass pollen IV. Similarities in amino acid compositions and amino terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin. Exp. Allergy* 22: 491-497. 30

35. Perez, M., G. Y. Ishioka, L. E. Walker, and R. W. Chesnut. 1990. cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. *J. Biol. Chem.* 265:16210-16215.

36. Griffith, I. J., P. M. Smith, J. Pollock, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, T. Hough, M. B. Singh, R. J. Simpson, L. D. Ward, and R. B. Knox. 1991. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. *FEBS Letters* 279:210-215.

37. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D.G. Marsh. 1989. Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* 264:11181-11185. 40

37a. Sidoli, A., Tamborini, E., Giuntini, I., Levi, S., Volonte, G., Painsi, C., De Lalla, C., Siccardi, A.G., Baralle, F.E., Galliani, S. and Arosio, P. 1993. Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* 268:21819-21825.

38. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D. G. Marsh. 1989. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II: Comparison with known Lol p I and II sequences. *Biochemistry* 28:8665-8670.

39. Singh, M. B., T. Hough, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, P. M. 50

- Smith, P. Taylor, R. J. Simpson, L. D. Ward, J. McCluskey, R. Puy, and R.B. Knox. 1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1384-1388.
- 39a. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman CA, Grande M, van Leeuwen WA, Aalberse RC. 1995. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 95:970-978.
40. Suphioglu, C. and Singh, M.B. 1995. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Pha a 1 and four isoforms of Pha a 5, the major allergens of canary grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* 25:853-865. 10
- 41 Dolecek, C., Vrtala, S., Laffer, S., Steinberger, P., Kraft, D., Scheiner, O. and Valenta, R. 1993. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335:299-304.
- 41A Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98:189-198.
- 42 Matthiesen, F., and H. Lowenstein. 1991. Group V allergens in grass pollens. I. Purification and characterization of the group V allergen from *Phleum pratense* pollen, Phl p V. *Clin. Exp. Allergy* 21:297-307. 20
- 43 Petersen, A., Bufe, A., Schramm, G., Schlaak, M. and Becker, W.M. 1995. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55-59.
- 43A Marknell DeWitt A, Niederberger V, Lehtonen P, Spitzauer S, Sperr WR, Valenta P, Valenta R, Lidholm J. Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clin Exp Allergy* 32: 1329-1340, 2002.
- 44 Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchene, M., Kraft, D. and Scheiner, O. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:106-118. 30
- 46 Esch, R. E., and D. G. Klapper. 1989. Isolation and characterization of a major cross-reactive grass group I allergenic determinant. *Mol. Immunol.* 26:557-561.
47. Olsen, E., L. Zhang, R. D. Hill, F. T. Kisil, A. H. Sehon, and S. Mohapatra. 1991. Identification and characterization of the *Poa p IX* group of basic allergens of Kentucky bluegrass pollen. *J. Immunol.* 147:205-211.
48. Avjioglu, A., M. Singh, and R.B. Knox. 1993. Sequence analysis of Sor h I, the group I allergen of Johnson grass pollen and its comparison to rye-grass Lol p I (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:340. 40
52. Kos T, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F, Hirschwehr R, Ahorn H, Horak F, Jager S, Sperr W, Kraft D, Scheiner O. 1993. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of a new major allergen from European chestnut pollen--Cas s 1. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1086-92.
53. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G. 2000. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 30:1403-1410. 50

54. Ipsen, H., and O.C. Hansen. 1991. The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) *Aln g I*, birch (*Betula verrucosa*) *Bet v I*, hornbeam (*Carpinus betulus*) *Car b I* and oak (*Quercus alba*) *Que a I pollens*. *Mol. Immunol.* 28: 1279-1288.
55. Taniai, M., S. Ando, M. Usui, M. Kurimoto, M. Sakaguchi, S. Inouye, and T. Matuhasi. 1988. N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j I*). *FEBS Lett.* 239:329-332.
56. Griffith, I.J., A. Lussier, R. Garman, R. Koury, H. Yeung, and J. Pollock. 1993. The cDNA cloning of *Cry j I*, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339. 10
57. Sakaguchi, M., S. Inouye, M. Taniai, S. Ando, M. Usui, and T. Matuhasi. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45 : 309-312, 1990.
- 57A Yokoyama M, Miyahara M, Shimizu K, Kino K, Tsunoo H. Purification, identification, and cDNA cloning of *Jun a 2*, the second major allergen of mountain cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 195-202, 2000.
- 57B Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Brooks EG. Variable Expression of Pathogenesis-Related Protein Allergen in Mountain Cedar (*Juniperus ashei*) Pollen. *J Immunol* 164: 2188-2192, 2000.
- 57C Tinghino R., Barletta B., Palumbo S., Afferni C., Iacovacci P., Mari A., Di Felice G., Pini, C. Molecular characterization of a cross-reactive *Juniperus oxycedrus* pollen allergen, *Jun o 2*: a novel calcium-binding allergen *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 772-777, 1998. 20
- 58 Gross GN, Zimburean JM, Capra JD. Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen. *Scand J Immunol* 8: 437-441, 1978.
- 58A Obispo TM, Melero JA, Carpizo JA, Carreira J, Lombardero M. The main allergen of *Olea europaea* (*Ole e I*) is also present in other species of the oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 23: 311-316, 1993.
- 58B Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Brooks EG. Identification of mutations in the genes for the pollen allergens of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*). *Clin Exp Allergy* 31: 771-778, 2001. 30
- 59 Lombardero M., Barbas J.A., Moscoso del Prado J., Carreira J. cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e I*. *Clin. Exp. Allergy* 24: 765-770, 1994.
- 60 Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otin, L.M. Sanchez, R.I. Monsalve, M.A. Gonzalez de la Pena, C. Lahoz, and R. Rodriguez. Amino acid sequence of *Ole e I*, the major allergen from olive tree pollen (*Olea europaea*). *Eur. J. Biochem.* 216 : 863-869, 1993.
- 60A Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (*Ole e 1*) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 100: 365-372, 1997. 40
- 60B Batanero E, Villalba M, Ledesma A Puente XS, Rodriguez R. *Ole e 3*, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 241: 772-778, 1996.
- 60C Batanero E, Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R. Purification, amino acid sequence and immunological characterization of *Ole e 6*, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett.* 410: 293-296, 1997.
- 60D Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R. Identification, isolation, and characterization of *Ole e 7*, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 104: 797-802, 1999. 50

- 60E Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca(2+)-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett* 466: 192-196, 2000.
- 60F Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodriguez R. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity. *J Immunol* 172: 3644-3651, 2004.
- 61 Yi FC, Cheong N, Shek PC, Wang DY, Chua KY, Lee BW. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 32: 1203-1210, 2002. 10
- 61A Ramos JD, Cheong N, Lee BW, Chua KY. cDNA cloning and expression of *Blot 11*, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 126: 286-293, 2001.
- 62 Chua, K. Y., G. A. Stewart, and W. R. Thomas. Sequence analysis of cDNA encoding for a major house dust mite allergen, *Der p I*. *J. Exp. Med.* 167: 175-182, 1988.
- 62A Chua, K. Y., C. R. Doyle, R. J. Simpson, K. J. Turner, G. A. Stewart, and W. R. Thomas. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p II* by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91: 118-123, 1990. 20
- 62B Smith AM, Benjamin DC, Derewenda U, Smith WA, Thomas WR, Chapman MD. Sequence polymorphisms and antibody binding to the group 2 dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 61-63, 2001.
- 62C Smith AM, Benjamin DC, Hozic N, Derewenda U, Smith WA, Thomas WR, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M, Chapman MD. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107: 977-984, 2001.
- 63 Smith WA, Thomas WR. Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 133-140, 1996. 30
- 64 Lake, F.R., L.D. Ward, R.J. Simpson, P.J. Thompson, and G.A. Stewart. House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterisation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 1035-1042, 1991.
- 65 Tovey, E. R., M. C. Johnson, A. L. Roche, G. S. Cobon, and B. A. Baldo. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J. Exp. Med.* 170: 1457-1462, 1989.
- 66 Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, and H. Yamakawa. 1991. Allergenic and proteolytic properties of fourth allergens from *Dermatophagoides* mites. In: "Dust Mite Allergens and Asthma. Report of the 2nd international workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium, pp. 63-64. 40
- 67 Shen, H.-D., K.-Y. Chua, K.-L. Lin, K.-H. Hsieh, and W.R. Thomas. Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin. Exp. Allergy* 23: 934-940, 1993.
- 67A O'Neil GM, Donovan GR, Baldo BA. Cloning and characterisation of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Acta*, 1219: 521-528, 1994.
- 67B King C, Simpson RJ, Moritz RL, Reed GE, Thompson PJ, Stewart GA. The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (*Der* 50

- p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 98: 739-747, 1996.
- 68 Lind P, Hansen OC, Horn N. The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, Der p I of *D. pteronyssinus*. *J. Immunol.* 140: 4256-4262, 1988.
- 69 Dilworth, R. J., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen Der f I. *Clin. Exp. Allergy* 21: 25-32, 1991.
- 70 Nishiyama, C., T. Yunki, T. Takai, Y. Okumura, and H. Okudaira. Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f II. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 159-166, 1993. 10
- 70A Trudinger, M., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. cDNA encoding the major dust mite allergen Der f II. *Clin. Exp. Allergy* 21: 33-38, 1991.
- 71 Shen HD, Chua KY, Lin WL, Hsieh KH, Thomas WR. Molecular cloning and immunological characterization of the house dust mite allergen Der f 7. *Clin Exp Allergy* 25: 1000-1006, 1995.
- 71A Tategaki A, Kawamoto S, Aki T, Jyo T, Suzuki O, Shigeta S, Ono K. Newly described house dust mite allergens. *ACI International suppl.* 1: 74-76, 2000.
- 72 Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K. Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 96: 74-83, 1995. 20
- 72A Tsai L, Sun Y, Chao P, Ng H, Hung M, Hsieh K, Liaw S, Chua K. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98-kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy* 29: 1606-1613, 1999.
- 72B Gafvelin G, Johansson E, Lundin A, Smith AM, Chapman MD, Benjamin DC, Derewenda U, Van Hage-Hamsten M. Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107: 511-518, 2001.
- 73 van Hage-Hamsten, M., T. Bergman, E. Johansson, B. Persson, H. Jornvall, B. Harfast, and S.G.O. Johansson. N-terminal amino acid sequence of major allergen of the mite *Lepidoglyphus destructor* (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:353, 1993. 30
- 74 Varela J, Ventas P, Carreira J, Barbas JA, Gimenez-Gallego G, Polo F. Primary structure of Lep d I, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. *Eur J Biochem* 225: 93-98, 1994.
- 74A Schmidt M, van der Ploeg I, Olsson S, van Hage Hamsten M. The complete cDNA encoding the *Lepidoglyphus destructor* major allergen Lep d 1. *FEBS Lett* 370: 11-14, 1995.
- 75 Eriksson TLJ, Rasool O, Huecas S, Whitley P, Cramer R, Appenzeller U, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M. Cloning of three new allergens from the dust mite *Lepidoglyphus destructor* using phage surface display technology. *Eur. J. Biochem.* 268: 287-294, 2001. 40
- 75A Saarne T, Kaiser L, Rasool O, Huecas S, van Hage-Hamsten M, Gafvelin G: Cloning and characterisation of two IgE-binding proteins, homologous to tropomyosin and α -tubulin, from the mite *Lepidoglyphus destructor*. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 258-265, 2003.
- 75B Eriksson TL, Johansson E, Whitley P, Schmidt M, Elsayed S, van Hage-Hamsten M. Cloning and characterisation of a group II allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Eur. J. Biochem.* 251 (1-2), 443-447, 1998. 40

76. Rautiainen J, Rytönen M, Pelkonen J, Pentikainen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantylarvi R. BDA20, a major bovine dander allergen characterized at the sequence level is Bos d 2. Submitted.
77. Gjesing B, Lowenstein H. Immunochemistry of food antigens. *Ann Allergy* 53:602, 1984.
78. de Groot, H., K.G.H. Goei, P. van Swieten, and R.C. Aalberse. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f I and Can f I-depleted extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1056-1065, 1991.
79. Konieczny, A. Personal communication; Immunologic Pharmaceutical Corp. 10
- 79A. Bulone, V. Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis. Molecular characterization and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins. *Eur J Biochem* 253: 202-211, 1998.
- 79B. Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
- 79C. Dandeu J. P., Rabillon J., Divanovic A., Carmi-Leroy A., David B. (1993). Hydrophobic interaction chromatography for isolation and purification of Equ c 1, the horse major allergen. *J. Chromatogr.* 621:23-31.
- 79D. Goubran Botros H., Rabillon J., Gregoire C., David B., Dandeu J.P. 1998. Hydrophilic absorption chromatography: purification of Equ c 2 and Equ c 3, two horse allergens from horse sweat. *J. Chromatogr. B* 710:57-65. 20
- 79E. Hilger C, Kohlen M, Grigioni F, Lehnert C, Hentges F. Allergic cross-reactions between cat and pig serum albumin. *Allergy* 52:179-187, 1997; and Hilger C, Grigioni F, Hentges F. Sequence of the gene encoding cat (*Felis domesticus*) serum albumin. *Gene* 169:295-296, 1996.
- 79F. Ichikawa K, Vailes LD, Pomes A, Chapman MD. Molecular cloning, expression and modeling of cat allergen, cystatin (*Fel d 3*), a cysteine protease inhibitor. *Clin Exp Allergy*, In Press 2001.
- 80 Fahlbusch B, Rudeschko O, Szilagyi U, Schlott B, Henzgen M, Schlenvoigt G, Schubert H. Purification and partial characterization of the major allergen, Cav p 1, from guinea pig *Cavia porcellus*. *Allergy* 57: 417-422, 2002. 30
- 81 McDonald, B., M. C. Kuo, J. L. Ohman, and L. J. Rosenwasser. 1988. A 29 amino acid peptide derived from rat alpha 2 euglobulin triggers murine allergen specific human T cells (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:251.
- 81A Clarke, A. J., P. M. Cissold, R. A. Shawi, P. Beattie, and J. Bishop. 1984. Structure of mouse urinary protein genes: differential splicing configurations in the 3'-non-coding region. *EMBO J* 3:1045-1052.
82. Longbottom, J. L. 1983. Characterization of allergens from the urines of experimental animals. *McMillan Press, London*, pp. 525-529.
83. Laperche, Y., K. R. Lynch, K. P. Dolans, and P. Feigelsen. 1983. Tissue-specific control of alpha 2u globulin gene expression: constitutive synthesis in submaxillary gland. *Cell* 32:453-460. 40
- 83A. Bush RK, Sanchez H, Geisler D. 1999. Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2. *J Allergy Clin Immunol* 104:665-671.
- 83B. Aukrust L, Borch SM. 1979. Partial purification and characterization of two *Cladosporium herbarum* allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60:68-79.
- 83C. Sward-Nordmo M, Paulsen BS, Wold JK. 1988. The glycoprotein allergen Ag-54 (*Clas h II*) from *Cladosporium herbarum*. Structural studies of the carbohydrate moiety. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:288-294.
- 84 Shen, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:S157, 1999.
- 84A Cramer R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus* 50

- s fumigatus in allergic diseases. Contrib. Microbiol. Vol. 2, Karger, Basel (in press).
- 84B Shen, et al. (manuscript submitted), 1999
- 84C Shen HD, Ling WL, Tan MF, Wang SR, Chou H, Han SH. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.
- 85 Kumar A, Reddy LV, Sochanik A, Kurup VP. 1993. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. J. Allergy Clin Immunol. 91:1024-1030.
- 85A Saxena S, Madan T, Muralidhar K, Sarma PU. 2003. cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic L3 ribosomal protein of *Aspergillus fumigatus*. Clin Exp Immunol 134:86-91. 10
- 85B Baur X, Melching-Kollmuss S, Koops F, Strassburger K, Zober A. IgE-mediated allergy to phytase -- a new animal feed additive. Allergy 57: 943-945, 2002.
- 86A Shen HD, Lin WL, Tsai JJ, Liaw SF, Han SH. 1996. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: crossreactivity among major allergens. Clin Exp Allergy 26:444-451.
- 86B. Shen, et al. Abstract; The XVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.
- 87 Shen HD, Lin WL, Tam MF, Wang SR, Tzean SS, Huang MH, Han SH. Characterization of allergens from *Penicillium oxalicum* and *P. notatum* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. Clin Exp Allergy 29: 642-651, 1999. 20
- 87A Shen HD, Liaw SF, Lin WL, Ro LH, Yang HL, Han SH. Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of *Penicillium notatum* using MoAbs. Clin Exp Allergy 25: 350-356, 1995.
- 87B Shen HD, Wang CW, Lin WL, Lai HY, Tam MF, Chou H, Wang SR, Han SH. cDNA cloning and immunologic characterization of Pen o 18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium oxalicum*. J Lab Clin Med 137: 115-124, 2001.
- 88 Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. 1998. Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. J Biol Chem 273:29489-96. 30
- 88A Deuell, B., L.K. Arruda, M.L. Hayden, M.D. Chapman and T.A.E. Platts-Mills. 1991. Trichophyton tonsurans Allergen I. J. Immunol. 147:96-101.
- 89 Shen, H.D., K.B. Choo, H.H. Lee, J.C. Hsieh, and S.H. Han. 1991. The 40 kd allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. Clin. Exp. Allergy 21:675-681.
- 89A Horner WE, Reese G, Lehrer SB. 1995. Identification of the allergen Psi c 2 from the basidiomycete *Psilocybe cubensis* as a fungal cyclophilin. Int Arch Allergy Immunol 107:298-300. 40
- 89B Chang CY, Chou H, Tam MF, Tang RB, Lai HY, Shen HD. Characterization of Enolase Allergen from *Rhodotorula mucilaginosa*. J Biomed Sci 9: 645-655, 2002.
- 90 Yasueda H, Hashida-Okado T, Saito A, Uchida K, Kuroda M, Onishi Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Takesako K, Akiyama K. Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. Biochem Biophys Res Commun 248: 240-244, 1998. NB:strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmekulturen).
- 90A Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S, Hashida-Okado T, Yagihara T, Uchida K, Yamaguchi H, Akiyama K, Kato I, Takesako K. Two-di 50

- mensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 261: 148-154, 1999. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmekulturen).
- 91 Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindbom L, Hellman U, Whitley P, van der Ploeg I, Harfast B, Scheynius A. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur J Biochem* 246:181-185, 1997. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 91A Rasool O, Zargari A, Almqvist J, Eshaghi H, Whitley P, Scheynius A. Cloning, characterization and expression of complete coding sequences of three IgE binding *Malassezia furfur* allergens, Mal f 7, Mal f 8 and Mal f 9. *Eur J Biochem* 267: 4355-4361, 2000. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 91B NB: ; strain 4625 (Indian Agricultural Research Institute, PUSA; New Delhi , India).
- 92 Kuchler, K., M. Gmachl, M. J. Sippl, and G. Kreil. 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honey bee venom glands: The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184:249-254.
- 93 Gmachl, M., and G. Kreil. 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3569-3573.
- 93A Hoffman DR. 1977. Allergens in bee venom III. Identification of allergen B as an acid phosphatase. *J Allergy Clin. Immunol.* 59:364-366.
- 94 Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177:314-322.
- 95 Hoffman DR, Jacobson RS. 1996. Allergens in Hymenoptera venom XXVII: Bumblebee venom allergy and allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:812-821.
- 95A Hoffman DR, El-Choufani AE, Smith MM, de Groot H. 2001. Occupational allergy to bumblebee venom: Allergens of *Bombus terrestris*. *J Allergy Clin Immunol* In press.
- 95B Helm R, Cockrell G, Stanley JS, Brenner RJ, Burks W, Bannon GA. 1996. Isolation and characterization of a clone encoding a major allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE mediated cockroach hypersensitivity. *J Allerg Clin Immunol* 98:172-180.
- 95C Pomes A, Melen E, Vailes LD, Retief JD, Arruda LK, Chapman MD. 1998. Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from German and American cockroach. *J Biol Chem* 273:30801-30807.
- 96 Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, Hayden ML, Chapman MD. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 270:19563-19568, 1995.
- 97 Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 270:31196-31201, 1995.
- 98 Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German Cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 107:295-297, 1995.
- 98A Wu CH, Wang NM, Lee MF, Kao CYY, Luo SF. 1998. Cloning of the American cockroach Cr-P11 allergens: Evidence for the existence of cross-reactive allergens between species. *J Allergy Clin Immunol* 101:832-840.
- 98B Melen E, Pomes A, Vailes LD, Arruda LK, Chapman MD. 1999. Molecular cloning of Per a 1 and definition of the cross-reactive Group 1 cockroach allergens. *J*

Allergy Clin Immunol 103:859-64.

98C Wu CH, Lee MF, Liao SC, Luo SF. Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. *J Biol Chem* 271:17937-17943, 1996.

98D Wu CH, Lee MF, Wang NM, Luo SF. Sequencing and immunochemical characterization of the American cockroach Per a 3 (Cr-PI) isoallergenic variants. *Molecular Immunol* 34:1-8, 1997.

98E Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VPL, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, Arruda LK. 1999. Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 104:329-337. 10

98F Asturias JA, Gomez-Bayon N, Arilla MC, Martinez A, Palacios R, Sanchez-Gascón, Martinez J. 1999. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *J Immunol* 162:4342-4348.

99 Mazur, G., X. Baur, and V. Liebers. 1990. Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monog. Allergy* 28:121-137.

99A Moneo I, Vega JM, Caballero ML, Vega J, Alday E. Isolation and characterization of Thap 1, a major allergen from the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Allergy* 58: 34-37, 2003. 20

100 Soldatova, L., L. Kochoumian, and T.P. King. 1993. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS Letters* 320:145-149.

101 Lu, G., L. Kochoumian and T.P. King. Whiteface hornet venom allergen hyaluronidase: cloning and its sequence similarity with other proteins (abst.). 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.

102 Fang, K. S. F., M. Vitale, P. Fehlner, and T. P. King. 1988. cDNA cloning and primary structure of a white-faced hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.

103 King, T. P., D. C. Moran, D. F. Wang, L. Kochoumian, and B.T. Chait. 1990. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266. 30

104. Lu, G., M. Villalba, M.R. Coscia, D.R. Hoffman, and T.P. King. 1993. Sequence analysis and antigen cross reactivity of a venom allergen antigen 5 from hornets, wasps and yellowjackets. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.

105. King, T. P. and Lu, G. 1997. Unpublished data.

105A. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N and Soldatova L. 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600. 40

106. Hoffman, D.R. 1993. Allergens in hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.

107. Hoffman DR. 1992. Unpublished data.

108. Hoffman DR. The complete amino acid sequence of a yellowjacket venom phospholipase (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187, 1993.

109. Jacobson RS, Hoffman DR, Kemeny DM. The cross-reactivity between bee and vespid hyaluronidases has a structural basis (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292, 1992.

110. Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: The amino acid sequence 50

- s of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J. Allergy Clin. Immunol* 91: 71-78, 1993.
111. Schmidt M, Walker RB, Hoffman DR, McConnell TJ. Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II. *FEBS Letters* 319: 138-140, 1993.
- 111A. Paddock CD, McKerrow JH, Hansell E, Foreman KW, Hsieh I, Marshall N. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J Immunol* 167: 2694-2699, 2001.
112. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of Allergen M from cod. *Scand J Immunol* 3: 683-686, 1974. 10
113. Elsayed S, Aas K, Sletten K, Johansson SGO. Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochimistry* 9: 647-661, 1972.
114. Hoffman, D. R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 481-486.
115. Langeland, T. 1983. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. IV. specific IgE antibodies to individual allergens in hen's egg white related to clinical and immunological parameters in egg-allergic patients. *Allergy* 38:493-500.
- 116 Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. In: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Sehon, eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 291-293. 20
- 116A Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Subba Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* 151: 5354-5363, 1993.
- 117 Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and Immunological Analysis of a Novel Shrimp Allergen, Pen m 2. *J Immunol* 170: 445-453, 2003.
- 117A Miyazawa M, Fukamachi H, Inagaki Y, Reese G, Daul CB, Lehrer SB, Inouye S, Sakaguchi M. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 948-953, 1996. 30
- 117B Asturias JA, Eraso E, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Inacio F, Martinez A. Cloning, isolation, and IgE-binding properties of *Helix aspersa* (brown garden snail) tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 128: 90-96, 2002.
- 117C Lopata AL, Zinn C, Potter PC. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal-m-1) in abalone (*Haliotis midae*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 642-648, 1997.
- 117D Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Puhringer H, Scheiner O, Breiteneder H. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin. Exp. Allergy* 29: 840-847, 1999. 40
- 118 Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodriguez R. Characterization of a new mustard allergen, Bra j IE. Detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* 293: 625-632 1993.
- 118A. Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lopez-Otin C, Fiandor A, Fernandez C, Villalba M, Rodriguez R. 1997. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin Exp Allergy* 27:833-841.
119. Mena, M., R. Sanchez-Monge, L. Gomez, G. Salcedo, and P. Carbonero. A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monome 50

- ric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Molec. Biol.* 20: 451-458, 1992.
- 119A. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 634-638, 2001.
- 119B. Xu H, Theerakulpisut P, Goulding N, Suphioglu C, Singh M. B. Bhalla P. L. Cloning expression and immunological characterization of Ory s 1, the major allergen of rice pollen. *Gene* 164: 255-259, 1995.
- 119C. Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Borga A, Benigetsson A, Incorvaia C, Berti C, Zanussi C. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 699-707, 1994.
- 119D. Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D, Salcedo G. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J Allergy Clin Immunol* 110: 790-796, 2002.
- 119E Galleguillos F, Rodriguez JC. Asthma caused by bromelain inhalation. *Clin Allergy* 8: 21-24, 1978.
- 119F Baur X. Studies on the specificity of human IgE-antibodies to the plant proteases papain and bromelain. *Clin Allergy* 9: 451-457, 1979.
- 119G Gailhofer G, Wilders-Truschnig M, Smolle J, Ludvan M. Asthma caused by bromelain: an occupational allergy. *Clin Allergy* 18: 445-450, 1988.
120. Menendez-Arias, L., I. Moneo, J. Dominguez, and R. Rodriguez. 1988. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *Eur. J. Biochem.* 177:159-166.
- 120A Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 346:48-49, 1995.
- 120B Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Hausteil UF, Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 110: 797-804, 2002.
- 120C Sanchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, Fernandez-Crespo J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 955-961, 2000.
- 121 Gavrovic-Jankulovic M, clrkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojgic G, Burazer L, Jankov RM. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol* 110: 805-810, 2002.
- 121A Pastorello EA, Varin E, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Trambaioli C, Fortunato D, Giuffrida MG, Rivolta F, Robino A, Calamari AM, Lacava L, Conti A. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 756: 85-93, 2001.
- 121B Moneo I, Caballero ML, Gomez F, Ortega E, Alonso MJ. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 177-182, 2000.
- 121C Asturias JA, Eraso E, Martinez A. 2000. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 55:898-899.
- 122 Christie, J. F., B. Dunbar, I. Davidson, and M. W. Kennedy. 1990. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology* 69:596-602.
- 122A Baur X, Konig G, Bencze K, Fruhmant G. Clinical symptoms and results of skin test, RAST and bronchial provocation test in thirty-three papain workers: evidence for strong immunogenic potency and clinically relevant 'proteolytic effects

- of airborne papain'. Clin Allergy 12: 9-17, 1982.
- 122B Onizuka R, Kamiya H, Muramoto K, Goto R, Inoue K, Kumamoto K, Nakajima Y, Iida S, Ishigami F. Purification of the major allergen of red soft coral (*Dendrocythya nipponica*). Int Arch Allergy Immunol 125: 135-143, 2001.
123. Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. J Allergy Clin Immunol 92:690-697, 1993.
124. Attanayaka DPSTG, Kekwick RGO, Franklin FCH. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *hevea brasiliensis*. Plant Mol Biol 16:1079-1081.
125. Chye ML, Cheung KY. 1995. J 1,3-glucanase is highly expressed in Laticifers of *Hevea brasiliensis*. Plant Mol Biol 26:397-402.
126. Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Makinen-Kiljunen S, Turjanmaa K Fink J. 1993. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in Latex-allergic children with Spina bifida and other congenital anomalies. Int Arch Allergy Immunol 102:61-66.
127. Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardosa MJ. 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. J Allerg Clin Immunol in press.
128. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardosa MJ. 1995. Latex B-serum J-1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major Latex allergens. J nat Rubb Res 10:82-99..

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

アレルゲン活性の顕著な低下は、本発明に係るスプライシング / h e a d t o t a i l 型変異により得ることができる。上記の方法によれば、野生型タンパク質アレルゲンから、上記活性をほとんど消失させることができる。本発明の好適な実施態様において、上記野生型アレルゲンと比較したときの上記誘導体による I g E 結合能の抑制低下率が、少なくとも 10 %、好ましくは 20 %、さらに好ましくは 30 % であることによって、上記誘導体のアレルゲン活性の低下を評価する。好適な評価方法は、下記の実施例において示す。

【 0 0 2 5 】

また、アレルゲン活性の低下を特定するための好適な方法として、I g E 結合の測定も使用可能である。点染色した上記誘導体に対して、アレルギー患者の血清 I g E 抗体が結合しないことによって、最も顕著にアレルゲン活性の低下を評価することができる。この方法についても、下記実施例において示す。

【 0 0 2 6 】

本発明に係る生成方法によって得られた誘導体は、薬学的に許容される添加剤と容易に組み合わせることが可能であり、医薬調整物とすることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明に係る誘導体は、好適なワクチン補助剤と組み合わせることによって、薬学的に許容されるワクチン調整物とすることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

好適な実施態様によれば、本発明に係る誘導体は、当該誘導体を混合ワクチンとするために、さらなるアレルゲンを組み合わせることが可能である。上記アレルゲンは、野生型アレルゲン、特に野生型アレルゲンの混合物、組換え野生型アレルゲンの混合物、野生型タンパク質アレルゲン誘導体の混合物、またはこれらの混合物であることが好ましい。上記混合物は、特定の患者のニーズ (アレルゲンの特徴) に対して特異的に用いることができる。

【 0 0 2 9 】

好適な実施態様において、上記調整物は、アレルゲン抽出物をさらに含有している。

【0030】

本発明に係る他の態様によれば、アレルゲン誘導体は、1からZのアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する野生型タンパク質アレルゲンのアレルゲン誘導体であって、上記誘導体は、野生型アレルゲンの2つのフラグメントを、N末端からC末端に向かう方向に隣接して含有し、N末端側の当該フラグメントは、X～Zのアミノ酸からなるアミノ酸配列により示され、C末端側の当該フラグメントは、1～Xのアミノ酸からなるアミノ酸配列によって示されるものであることを特徴としている。上記2つの野生型アレルゲンのフラグメントは、アレルゲン活性が低下または欠失している。

【0031】

本発明に係るアレルゲン誘導体において、上記X～Zのアミノ酸からなるアミノ酸配列、および上記1～Xのアミノ酸からなるアミノ酸配列は、少なくとも30アミノ酸、好ましくは少なくとも50アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも60アミノ酸からなるを特徴としていることが好ましい。

【0032】

上記X～Zのアミノ酸からなるアミノ酸配列と、上記1～Xのアミノ酸からなるアミノ酸配列とは、その全長において、50%未満、好ましくは30%未満、より好ましくは20%未満相違することが、より一層好ましい。

【0033】

特に好ましい本発明に係るアレルゲン誘導体は、アレルゲンI型、好ましくは表Aのアレルゲン、より好ましくは、オオアワガエリ (*Phelum pratense*) 花粉、特に P h l p 1 2、カンバ (*Betula verrucosa*) 花粉、特に B e t v 4、スズメバチ (*Vespula vulgaris*) 毒、アシナガバチ (*Polistes annularis*) 毒、カベイラクサ花粉、ライグラス花粉、チリダニアレルゲン、特に D e r p 2 などから選択される。

【0034】

本発明に係る誘導体は、1つのアレルゲンだけでなく、2つ以上のアレルゲンを含有するアレルゲン組成物であることが好ましい。上記誘導体は、アレルゲン抽出物と混合することもできる。アレルゲン抽出物は、非加工の抽出物中における特定のアレルゲンの不足を代用するために、本発明の誘導体によって補われる。アレルゲンの混合物は、アレルギー反応を示すアレルゲンが1つだけでない患者に対して、特に必要とされている。したがって、上記誘導体をさらに(他の)アレルゲンと混合して、混合ワクチンとして提供することも好適である。

【0035】

したがって、本発明に係るアレルゲン誘導体は、アレルゲン組成物、特に野生型アレルゲンの混合物、組換え野生型アレルゲンの混合物、野生型タンパク質アレルゲン誘導体の混合物またはそれらの混合物に、野生型アレルゲンを混合することが好ましい。アレルゲン組成物は、同一および/または異なるアレルゲンならびに/あるいはそのイソ型もしくは突然変異体のいずれかであり、医薬品中の野生型タンパク質アレルゲンまたは組換えアレルゲンと比較して全体的にアレルゲン活性が低下したものである。

【0036】

上記医薬品は、アレルゲン抽出物をさらに含有していることが好ましい。

【0037】

本発明に係るアレルゲンまたはアレルゲン組成物は、薬学的に許容される添加剤を含有していることが好ましい。

【0038】

本発明の他の態様は、アレルゲン特異的免疫療法の調整医薬として本発明に係るアレルゲン誘導体を使用することに関する。

【0039】

本発明のさらに他の態様は、受動免疫のための調整医薬として本発明に係るアレルゲン誘導体またはアレルゲン組成物を使用することに関する。

10

20

30

40

50

【0040】

本発明の他の態様は、予防免疫のための調整医薬として本発明に係るアレルゲン誘導体またはアレルゲン組成物を使用することに関する。

【0041】

本発明に係るアレルゲン誘導体および組成物は、アレルギーを効果的に抑制するための各個人の予防免疫接種に使用することができる。本発明に係るアレルゲン誘導体および組成物、例えばDer p 2アレルゲン誘導体は、野生型アレルゲンに比べてアレルギー性免疫反応が低下しているため、好ましくない副作用を生じることはない。上記医薬品の利点は、1から3歳の幼児に対して投与できることである。幼児がアレルゲンと接触するより前に予防接種することによって、上記幼児におけるアレルゲン特異的IgE抗体の形成を阻害できる。

10

【0042】

調整医薬は、例えば、補助剤、希釈剤、防腐剤などの好適な成分をさらに含有していることが好ましい。

【0043】

本発明の好適な実施態様によれば、調整医薬は、投与量に対して組換えアレルゲン誘導体を10ng~1g、好ましくは100ng~10mg、より好ましくは0.5~200μg含有することが好ましい。好適な投与方法には、一般的な予防接種として、またはアレルギー免疫療法特有の予防接種として説明および提案されている全ての標準的な投与方法が含まれる。例えば、経口投与、経皮投与、静脈内投与、経鼻投与、および粘膜経路による投与などである。本発明に係る調整医薬を効果的な量投与することによりアレルギーを治療および予防する方法も、本発明の範疇である。

20

【0044】

本発明の他の態様は、本発明に係るアレルゲン誘導体を生成する方法であって、本発明に係るアレルゲン誘導体をコードするDNAを用意する工程と、上記DNAを用いて宿主細胞を形質転換する工程と、上記宿主細胞において上記誘導体を発現させ、上記誘導体を単離する工程とを含むことを特徴としている。

【0045】

上記宿主は、高い発現能力を有していることが好ましい。

【0046】

本明細書において用いる「高い発現能力を有する宿主」とは、培養液1Lあたり少なくとも10mg、好ましくは少なくとも15mg、より好ましくは少なくとも20mgの量の目的とするタンパク質を発現する宿主を意味している。もちろん、発現能力は、選択した宿主および発現システム（例えば、ベクター）にも依存している。本発明における宿主は、大腸菌（*E. coli*）、メタノール資化酵母（*Pichia Pastoris*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）または植物細胞（plant cell）（例えば、タバコ由来）などであることが好ましい。

30

【0047】

もちろん、本発明に係るアレルゲン誘導体は、特に、化学合成または準化学合成といった、他の好適な方法によっても生成できる。

40

【0048】

本発明の他の態様は、本発明に係る方法によって得られる第1の野生型プロフィリン分子から得られるプロフィリン誘導体、または本発明に係る第1の野生型プロフィリン分子のアレルゲン誘導体を、第2の野生型プロフィリン分子によって引き起こされるアレルギー疾患を予防または治療するための調整医薬を生成するために用いることに関する。

【0049】

驚くべきことに、本発明に係る第1の野生型プロフィリン分子のプロフィリン誘導体によって生じた抗体は、他の野生型プロフィリン分子に対しても結合するようになる。したがって、上記誘導体は、多数のアレルギー疾患の治療または予防に用いることができる。上記プロフィリン誘導体は、わずか1つまたは2つの抗原性分子によりそれぞれの免疫を

50

付与し得る広域ワクチンとして用いることができる。プロフィリンは、ほぼ全ての真核細胞において示されるアレルゲンであり、かつ、経口摂取後の口腔アレルギー症（かゆみ、ならびに唇および舌の腫れ）だけでなく呼吸器アレルギー（例えば、鼻の結膜、喘息）を引き起こす汎アレルゲンである。

【0050】

例えば、組み換えた Phl p 12 誘導体である MP12 は、植物由来の食品と同様に花粉におけるプロフィリンを認識して免疫性を付与した後、IgG 抗体を誘導する。MP12 により誘導された抗体は、患者血清 IgE の花粉由来プロフィリンに対する結合を阻害し、さらに植物食品に由来するプロフィリンに対する血清 IgE の結合も阻害する。このように、他の組換えプロフィリン分子と同様に、MP12 も、プロフィリンアレルギーに起因する花粉 - 食品交差性感作の治療のために好適である。

10

【0051】

好適な実施形態によれば、上記第1および上記第2のプロフィリン分子は、Phl p 12、Bet v 2、Art v 4、Ana c、Api g 4、Mus xp 1、Cor a 2、および Dau c 4 からなる群より選択される。

【0052】

特に、これらのアレルゲンは、それらの構造的な相似性のため、本発明に係る使用に好都合である。しかし、相互に構造的な相似性を共有する他のアレルゲンであっても、それ相応に使用できることは明らかである。

【0053】

上記第1のプロフィリン分子は、Phl p 12 であることが好ましく、上記第2のプロフィリン分子は、Bet v 2、Art v 4、Ana c、Api g 4、Mus xp 1、Cor a 2、および Dau c 4 からなる群より選択されることが好ましい。

20

【0054】

特に、Phl p 12 の誘導体を広域ワクチンとして用いることができることが、実験において示されている。特に好適な誘導体は、融合タンパク質からなる。すなわち、野生型 Phl p 12 の1番目～77番目のアミノ酸のN末端に、78番目～131番目のアミノ酸を融合する（図1参照）。

【0055】

本明細書において開示した、および本発明に係る方法によって得られる Bet v 2、Art v 4、Ana c、Api g 4、Mus xp 1、Cor a 2、および Dau c 4 のプロフィリン誘導体は、プロフィリンアレルギーに起因する花粉 - 食品交差性感作の治療および予防の少なくとも一方に用いることが好ましい。

30

【0056】

本発明は、下記実施例および図面によってさらに説明するが、それによって限定されるものではない。

【0057】

実施例1～5において、アレルゲンとしてプロフィリンを用いて、本発明の原理を例示した。プロフィリンは、オオアワガエリ花粉由来プロフィリン (timothy grass pollen profilin) Phl p 12 を用いた。実施例6～11は、主要なダニアレルゲン Der p 2 (ヤケヒョウヒダニ: Dermatophagoides pteronyssinus) に関連する実施例である。実施例12および13では、オオアワガエリ花粉ではなく他の源に由来するプロフィリンと Phl p 12 との交差反応性を示している。実施例12および13では、他のプロフィリンに起因するアレルギー病に対するワクチンとして、Phl p 12 誘導体を用いたときの適合性を、結果として明らかにした。

40

【0058】

〔実施例1：オオアワガエリ花粉由来プロフィリンからの低アレルギー性誘導体の特定〕

50

a) オオアワガエリ花粉プロフィリン Ph1 p12からの低アレルギー性変異体の生成、発現および精製

Ph1 p12誘導体を再構成する技術として、オーバーラップPCR法を用いた。pet17b発現ベクターでサブクローニングしたオオアワガエリ花粉 Ph1 p12をコードするcDNAを、PCRのテンプレートとして用いた。NdeIおよびEcoRIの制限部位とオーバーラップする配列、およびC末端6ヒスチジン残基をコードする配列を含む2つのPCRフラグメントを生成するために、以下のプライマーを用いた。これらの配列は、タンパク質を精製するためのものである。フラグメント1を、MDE-1プライマー：5'CATATGAGGCCCGCGCGCGGTCAATC3'、およびMDE-2プライマー：5'GTACGTCCTGCCACGCCATCATGCTTGTTCACAC3'を用いて生成した。フラグメント2を、MABC-1プライマー：5'GTTGAACAAGGCATGATGTCGTGGCAGACG3'、およびMABC-2プライマー：5'GAATTCCTTAATGGTGGATGGTGGATGGTGGACCCCTGGATGACCATGTA3'を用いて生成した。ついで、上述したように得られた両方のPCR産物を、プライマーMDE-1およびMABC-2を用いたオーバーラップPCR反応のテンプレートとして用いた。このオーバーラップPCR反応は、Ph1 p12誘導体(例えばMP12)をコードするcDNAを生成するために行った(図1に概略図を示した)。MP-12をコードするDNAを、pBluescriptベクターシステム(Stratagene)によりクローニングし、DNA配列をDouble-strand sequencing(MWG Biothch, Germany)により確認した。

【0059】

タンパク質を精製するために、NdeIおよびEcoRI制限酵素をもちいたpet17b発現ベクターシステムにより、MP-12をコードするcDNAをサブクローニングし、再びDouble-strand sequencing(MWG Biothch)によりDNA配列を確認した。

【0060】

タンパク質を精製するために、液体培地中の大腸菌BL21(DE3)(Stratagene, East Kew, Australia)内でMP-12を発現させた。大腸菌をアンピシリン100mg/Lを含むLB培地中で、OD600が0.4になるまで成長させた。イソプロピル-b-チオガラクトピラノシドを添加して組換えタンパク質の発現を最終濃度1mMまで誘導し、さらに、37℃で4時間培養した。培地500mlから遠心分離によって大腸菌細胞を取り出し、バッファA(100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、8M 尿素、pH7.5)中に再懸濁した。20,000rpmで30分間遠心分離した後、上清をNi-NTAアガロースカラム(QuiaGen, Hilden, German)に移し、pH値が低下したバッファAを用いて、6ヒスチジンで標識したタンパク質を溶出した。pH4.9でタンパク質を溶出した後、6~0M 尿素を含むpH7.5のバッファAに対して徐々に透析することによって、タンパク質を再フォールディングさせた。遠心実験により示されるように、MP12が溶解したところで、リン酸塩バッファ(PBS)に対して最終透析工程を行った。

【0061】

タンパク質の精製度をSDS-PAGEによって確認し、Micro BCAキット(Pierce, USA)を用いて定量した。

【0062】

b) 二次構造分析

Jasco J-715分光偏光計で、20℃で平衡状態になるパス長0.1cmの細胞を用いて、円偏光二色性(CD)測定を行った。スキャン速度100nm/min、解像度0.5nmでスペクトルを記録した。結果を3回のスキャン結果の平均値とした。同様の条件下で得たMilliQスペクトルに対応して減算することによって、最終的なスペクトルを基準調整した。結果を二次構造評価プログラムJ-700に適合させ

10

20

30

40

50

た。

【0063】

二次構造評価プログラムの結果は、相当な量の誘導体の二次構造を示した。Phl p 12のスペクトルは、218nmで最小値を示し、200nmより下で最大値を超えた。一方、誘導体の最小値は、より小さい波長にシフトし、零交差曲線は200nmよりも少なかった(図2)。この実験結果は、誘導体内のランダムコイル二次構造部分が増加していることを示している。

【0064】

c) ポリプロリンに対する親和性が欠落した低アレルギー性Phl p 12誘導体
 ポリプロリンに対する親和性は、様々な生物由来のプロフィリンに共通する特徴である。低アレルギー性Phl p 12誘導体であるMP 12は、ポリプロリンに結合せず、それゆえに変化した生化学特性を示すことが明らかにされた。

10

【0065】

PBS中の精製した組換えMP 12のほぼ5mgに対して、PBSで平衡状態にしたポリプロリン-CnBr充填活性化アガロースカラム(Amersham Bioscience、Uppsala、Sweden)処理を行った。カラムにつかない画分を回収した後、カラムを3容量(PBS)で洗浄し、2Mまたは6M尿素をそれぞれ含む5×1ml PBSを用いて溶出した。流れ落ちたもの、洗浄物、および溶出物から10ml分別し、14%のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。そして、Commasie染色してタンパク質を可視化した(図3)。その結果、ポリプロリン結合部位の欠落は、Phl p 12の一次構造の再編成に起因することが示された。

20

【0066】

〔実施例2：MP 12のIgE結合能の減少〕

a) 大幅に低下したIgE結合能を示すMP 12

24人のプロフィリン感受性患者からの血清を点染色分析することによって、組換えMP 12のIgE結合能を、組換えPhl p 12の野生型のIgE結合能と比較した(図4)。Phl p 12およびMP 12は、コントロールとして用いたヒト血清アルブミン(HSA)と同様に、ニトロセルロース上に点染色され、24人のプロフィリン感受性患者の血清で検出された。¹²⁵I標識抗ヒトIgE抗体を用いて、IgE抗体に対する結合を検出した。全ての患者において、Phl p 12野生型のIgE反応性が見られた。一方、24人の患者において、MP 12またはコントロールとして用いたタンパク質HSAがIgEに対して反応した患者は24人中1人もいなかった(図4)。

30

【0067】

MP 12のIgE結合能の減少量に対して、液相抑制を行った。6人のプロフィリン感受性患者から得た目的の血清を、10mgのPhl p 12およびMP 12のいずれかと共にプレインキュベートし、ついでPhl p 12(5mg/ml)を結合させたELISAプレートと共にインキュベートした。アルカリフォスファターゼで標識した抗ヒトIgE抗体(Pharmingén)によって、IgE抗体への結合を検出した。

IgE結合抑制を、以下の式により算出した：

$$\text{抑制(\%)} = 100 \times ((A - B) / A) ;$$

ここで、Aは血清をBSAと共にインキュベートした後に得られるOD値を表し、Bは血清をPhl p 12またはMP 12と共にそれぞれインキュベートした後のOD値を表している。

40

【0068】

IgEのPhl p 12に対する結合を抑制するMP 12の抑制能を、表2において百分率として示した。MP 12に対する抑制率は、20~40%の範囲内で、平均すると31.2%であった。一方、Phl p 12が達する抑制率は、76~91%(平均86%)であった。

【0069】

50

【表 2】

クパク質名	アミノ酸配列	アミノ酸数	算出 Pi	MW (kDa)	構造上の整合性
Phl p 12	MSWQTYVDEHLMCEIEGHHLASAAILGHDGTVWAQS ADFPQFKPEEITGIMKDFDEPGHLAPTGMFVAGAKYM <u>VIQGEPEGAVIRGKKKGAGGITIKKTGQALVVGIYDEPM</u> <u>TPGQCNMVVERLGDYLVEQGM</u>	131	4.92	14.1	+
MP 12	<u>MEPGAVIRGKKKGAGGITIKKTGQALVVGIYDEPMTPGQ</u> <u>CNMVVERLGDYLVEQGM</u> .MSWQTYVDEHLMCEIEGH HLASAAILGHDGTVWAQSADFPQFKPEEITGIMKDFD EPGHLAPTGMFVAGAKYMVIQGHHHHHH	137	5.68	15	+

10

【0070】

表 2 は、Phl p 12 および MP 12 を用いた、固定した Phl p 12 に対する抗体結合の抑制の結果を示している。IgE 抗体結合は、6 人のプロフィリン感受性患者からの血清を、野生型 Phl p 12 または MP 12 と共にプレインキュベートすることによって抑制された。抗体結合の平均抑制率を算出し、表中に示した。

【0071】

20

b) MP 12 が示す減少したアレルゲン活性

ついで、プロフィリンアレルギー患者の好塩基性白血球からのヒスタミン放出誘因能を、再構成した Phl p 12 と野生型 Phl p 12 とにおいて比較した。

【0072】

ヘパリン処理したオオアワガエリ花粉アレルギー患者の血液サンプルから、デキストラン沈降により顆粒球を単離した。単離後、様々な濃度に調整した Phl p 12、MP 12、またはコントロールとして用いるモノクローナル抗ヒト IgE 抗体 (Immunotech、Marseille、France) と共に、細胞をインキュベートした。上清に放出されたヒスタミンを、放射線免疫検定法 (Immunotech) により測定した。細胞を凍結解凍した後、総ヒスタミン量を決定した。結果を重複測定の平均値として示し、総ヒスタミン量の比率を表している。

30

【0073】

図 5 に例示するように、Phl p 12 によって、両患者からの好塩基球におけるヒスタミン放出は、添加量に依存して強く誘導された。そして、最大ヒスタミン放出をもたらす濃度は $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ mg/ml}$ であった。一方、 10^{-2} mg/ml の濃度において、MP 12 と共にインキュベートした細胞からはヒスタミン放出が観察されなかった。これは、アレルゲン活性が 1000 倍以上減少したことを示している。さらに、MP 12 添加後の好塩基球からの最大ヒスタミン放出量は、野生型 Phl p 12 によって達する最大量よりも低いと考えられる。

【0074】

40

〔実施例 3 : 他の花粉由来のプロフィリンと同様に野生型 Phl p 12 を認識する IgG 抗体の、MP 12 免疫による誘導〕

再構成 Phl p 12 による免疫によって、野生型 Phl p 12 および他の花粉由来のプロフィリンに反応する IgG 抗体が誘導されるかどうかを実験するために、フロイントの完全および不完全アジュバント (200 mg / 注入) (Charles River、Kisslegg、Germany) を用いて、ウサギを Phl p 12 または MP 12 により 3 回免疫した。血清サンプルを 4 週間間隔で得た。得られた血清を、分析するまで -20°C で保存した。

【0075】

MP 12 および Phl p 12 の IgG 抗体誘導反応性を、ELISA によって調べた

50

(図6)。カバ(Bet v 2)およびヨモギ由来のプロフィリンと同様に、Phl p 12を用いてELISAプレート(5mg/ml)上をコーティングし、ウサギ抗血清を1:2000~1:64000の間で順次希釈調整したものと共にインキュベートした。1:1000に希釈した、ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ抗血清(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて、結合したウサギ抗体を検出した。

【0076】

MP12はIgG抗Phl p 12抗体反応を誘導した。この結果は野生型Phl p 12で誘導したものに匹敵した(図6A)。さらに、IgG抗体を誘導したPhl p 12およびMP12は、カバおよびヨモギ由来プロフィリンと交差反応した(図6Bおよび図6C)。

【0077】

〔実施例4：抗MP12抗体による、芝花粉アレルギー患者から得た血清IgEの完全なPhl p 12に対する結合抑制〕

アレルギー患者のIgEがPhl p 12に結合するのを抑制する、MP12誘導ウサギIgGの可能性をELISA競合分析によって調査した。ELISAプレート(Nunc Maxisorp、Roskilde、Denmark)をPhl p 12(1μg/ml)でコーティングし、それぞれ1:250で希釈した抗MP12抗血清、またはPhl p 12抗血清と共にプレインキュベートした。また、コントロールとして、それぞれに対応する免疫前の血清と共にPhl p 12をプレインキュベートした。洗浄後、7人のPhl p 12感受性芝花粉アレルギー患者からの血清を1:3に希釈したものと共にプレートをインキュベートした。ついで、モノクローナルラット抗ヒトIgE抗体(Pharmingen、San Diego、CA)を1:1000に希釈し、これを用いて処理した後、1:2000に希釈したHRP結合ヒツジ抗ラットIg抗血清(Amersham)で処理することによって、結合IgE抗体を検出した。抗ペプチドまたは抗変異抗血清と共にプレインキュベートすることによるIgE結合抑制率を、次式により算出した：

$$\% \text{ IgE 結合抑制} = 100 - \text{ODI} / \text{ODP} \times 100$$

ここでODIおよびODPは、ウサギ免疫血清および対応する免疫前血清と共に、それぞれプレインキュベートした後の吸光度を表している。表3に示すように、抗Phl p 12抗体用いて達したPhl p 12に対する患者由来IgE結合抑制は、30.2~66.7%の間であった(平均抑制率49.8%)。同様に、MP12に対する抗体を用いた場合、10.8~27.6%(平均抑制率20.8%)の範囲の抑制を示し、抗Phl p 12のIgE反応性が大幅に減少したことを観察した(表3)。

【0078】

【表3】

患者	抑制 (%)	
	抗 Phl p12	抗 MP12
1	66.7	27.6
2	53.8	18.8
3	46.0	16.2
4	43.2	18.9
5	45.7	27.0
6	30.2	10.8
7	63.0	26.1
平均	49.8	20.8

【0079】

表3は、アレルギー患者から得たIgEのrPhl p 12への結合のウサギ抗体によ

る抑制を示している。7人のPhl p 12アレルギー患者から得たIgEのrPhl p 12結合抑制率を、ウサギ抗血清（ウサギ抗Phl p 12、抗MP 12）と共にプレインキュベートすることによって調査し、平均抑制率を算出して示した。

【0080】

〔実施例5：抗MP 12抗血清による好塩基球脱顆粒の抑制〕

ペプチド刺激IgG抗体の生物学上の関連性および有効な保護活性を、アレルギー特異的IgEを導入したラット好塩基球白血球（RBL）細胞を用いた確立した細胞モデルシステムにおいて調査した。

【0081】

RBL-2H3細胞を96ウエル組織培養プレートに播種した（ 4×10^4 細胞/ウエル）後、7% CO₂の雰囲気下において、37℃で24時間インキュベートした。プロフィリン反応IgEを含むマウス血清を用いて、最終希釈1:30で2時間、受動感作を行った。タイロード液（137mM NaCl、2.7mM KCl、0.5mM MgCl₂、1.8mM CaCl₂、0.4mM NaH₂PO₄、5.6mM D-glucose、12mM NaHCO₃、10mM HEPESおよび0.1% w/v BSA、pH 7.2）中で細胞層を2回洗浄することによって、結合していない抗体を除去した。事前にPhl p 12特異的マウスIgEを導入したRBL細胞をrPhl p 12（0.005mg/ml）にさらした。Phl p 12免疫ウサギおよびMP 12免疫ウサギから得たウサギ抗血清、またはこれらに対応する免疫前血清0、2、5、7.5または10% v/vと共に、タイロード液中でPhl p 12を37℃で2時間プレインキュベートした。

10

20

【0082】

プレインキュベートしたPhl p 12を、湿気のある雰囲気下において37℃で30分間、RBL細胞に添加し、上清を80mM 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosamide（Sigma-Aldrich、Vienna、Austria）と共に、クエン酸塩バッファ（0.1M、pH 4.5）中において、37℃で1時間インキュベートすることによって、β-ヘキソサミニダーゼ活性を分析した。グリシンバッファ（0.2M グリシン、0.2M NaCl、pH 10.7）100mlを添加することによって反応を終了した。蛍光マイクロプレートリーダー（Spectrafluor、Tecan、Austria）を用いて、ex: 360/nm、em: 465 nmで、蛍光度を測定した。結果を、細胞を1% Triton X-100と共に細胞を溶菌した後の蛍光単位および総β-ヘキソサミニダーゼ放出率として記録した。

30

40

【0083】

図7に例示するように、様々な濃度のウサギ抗MP 12抗体（2~10% v/v）、およびウサギ抗Phl p 12抗体、それぞれと共にPhl p 12をプレインキュベートすることによって、Phl p 12特異的マウスIgEを事前に導入したRBL細胞からのrPhl p 12刺激中間物の放出の量依存的抑制が導かれた。免疫前Igと同じ濃度でアレルギーをプレインキュベートしたとき、好塩基球脱顆粒の抑制は観察されなかった。

【0084】

〔実施例6：ヤケヒョウヒダニアレルギーDer p 2（Der p 2ハイブリッド）由来低アレルギー誘導体の発現、精製および特定〕

ハウスダストダニ（HDM）アレルギーは、全てのアレルギー患者の50%以上に影響する、世界中で最も一般的なアレルギーに属する。ヤケヒョウヒダニは、ヨーロッパにおいて、ハウスダスト中のアレルギーの最も重要な原因として同定された。

【0085】

これまでに、20グループのダニアレルギーが特定されており、グループ2のアレルギーが、主要なダニアレルギーとして同定された。このグループ2のアレルギーに対して、80%以上のダニアレルギー患者が感受性を示し、これらのアレルギーは主にダニの排泄

50

物に存在している。グループ2のアレルゲンは、当初、高いIgE結合活性を有する14000~18000Daのアレルゲンとして特定された。Der p 2をコードするcDNAクローンの単離および分析によって、Der p 2は、129アミノ酸残基を有するアレルゲンを含むことが明らかになった。このアレルゲンの算出された分子量は14000Dsであり、N-グリコシル化部位を有していない。グループ2のアレルゲンは、3つのジスルフィド結合を含んでおり、2つの逆平行シートを構成している。Der p 2のT細胞エピトープは、タンパク質の全領域に位置しており、IgEエピトープはコンフォメーションになることが示された。

【0086】

海産物に対して新しいIgE反応活性を誘発したのと同様に(van Ree, R., et al. (1996) Allergy 51:108)、天然のダニ抽出物を用いた免疫療法の研究は、HDM抽出物を用いた免疫療法中に生じるかもしれない系統面の危険な影響を明らかにしている(Akcakeya, N., et al. (2000) Ann Allergy Asthma Immunol 85:317)。

10

【0087】

抽出物を基本とした免疫療法の欠点を克服するために、様々な方策が低アレルギー性アレルゲン誘導体の開発に適用されている。Der p 2の場合、部位直接変異によるジスルフィド結合を破壊する、N末端およびC末端を毛質させてジスルフィド結合を破壊する、または変異を導入することによって、IgE反応性が低下した変異体が開発された。しかしながら、これらの生物学的活性には疑問がある。

【0088】

以下に例示する、グループ2アレルゲンであるヤケヒョウヒダニ(Der p 2)の2つの組換えフラグメントを合成した。このフラグメントは、1~53アミノ酸および54~129アミノ酸を含み、B細胞エピトープの配座が破壊されている。さらに、2つのrDer p 2を、PCRを基礎としたgene-SOEing法によって逆オーダーで組み替えて、組換えDer p 2ハイブリッド分子(54~129+1~53アミノ酸)を構築した。

20

【0089】

Der p 2の2つの組換えフラグメントは、1~53アミノ酸および54~129アミノ酸を含み、実施例1に概要を示したように、これらのフラグメントはPCR増幅により構築した(図8参照のこと)。Der p 2ハイブリッド分子を、PCRを基礎としたgene-SOEing法によって逆オーダー(54~129+1~53アミノ酸)で合成した(Linhart et al., FASEB J.16 (2002), 1301-1303)。

30

【0090】

a) Der p 2、Der p 2フラグメント、およびDer p 2ハイブリッドの大腸菌内における発現および精製

ヒスチジン標識したDer p 2、Der p 2フラグメント(1~53アミノ酸+54~129アミノ酸)、およびDer p 2ハイブリッド(54~129+1~53アミノ酸)をコードするcDNAを、表4に示したプライマー(MWG、Ebersberg、Germany)を用いたPCR増幅により合成した。また、Der p RNAから逆転写することによって、Der p 2cDNAを得た。

40

【0091】

【表 4】

プライマー

配列

1 (F)	5'- <u>GGAATTC</u> CAATATGGATCAAGTCGATGTC-3'
2 (R)	5'-GGAATTCCTTAGT <u>GATGGTGATGGTGATGTT</u> CAATTTAGCGGT-3'
3 (F)	5'-GGAATTC <u>CAATATGATCAAAGCCT</u> CAAT-3'
4 (R)	5'-GGAATTCCTTAGT <u>GATGGTGATGGTGATGATCGCGG</u> ATTTTA-3'
5 (オーバーラップ)	5'-CTTTGACATCGACTTGATCATCGCGGATTTTAGCAT-3'
6 (オーバーラップ)	5'-CATGCTAAAATCCGCGATGATCAAGTCGATGTCAA-3'

10

【0092】

表 4 には、フォワードプライマー (F)、リバースプライマー (R) およびオーバーラッププライマーを示した。EcoRI 部位および NdeI 部位に下線を付した。ヒスチジンタグをコードする核酸を、太線の斜体文字で示した。

【0093】

プライマー 1 および 4 を rDer p 2 cDNA の増幅にもちいた。rDer p 2 フラグメント 1 (1~53 アミノ酸) をコードする cDNA の増幅にはプライマー 1 および 2 を用いた。そして、rDer p 2 フラグメント 2 (54~129 アミノ酸) をコードする cDNA の増幅には、プライマー 3 および 4 を用いた。rDer p 2 ハイブリッドをプライマー 2 および 3、ならびに 2 つのオーバーラッププライマー 5 および 6 を用いて、PCR を基礎とした gene-SOEing 法によって合成した。上流のプライマーは NdeI および EcoRI 部位を含み、下流プライマーは、6 つのヒスチジンコドンと同様に EcoRI を含む。PCR 産物を NdeI/EcoRI で切断し、ゲルによって精製し、プラスミド pET17b の NdeI/EcoRI 部位にサブクローニングした。塩化カルシウム法を用いて、プラスミドを XL-1 Blue で染色した大腸菌に形質転換した。プラスミド DNA を NucleoBond AX kit-maxi-prep (Macherey-Nagel, Germany) を用いて単離し、cDNA の挿入配列を自動シーケンシングシステム (MWG, Germany) を用いて両 DNA 鎖の配列を確認した。

30

【0094】

C 末端ヘキサヒスチジン尾部を含む組換えタンパク質を、液体培地中の BL21 (DE3) で染色した大腸菌内で発現させた。OD600 を 1 で、37 °C で 5 時間、0.5 mM の isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) を用いて発現誘導した。4 °C で、4,000 × g、15 分間遠心分離することによって、細胞を回収した。

【0095】

11 の液体培地から得た微生物ペレットを、25 mM イミダゾール 10 ml、pH 7.4、0.1% v/v Triton X-100 中に再懸濁し、リゾチーム 100 μg を用いて、室温で 30 分間処理した。凍結および解凍 (-70 °C / +50 °C) サイクルを 3 回行うことによって、細胞を溶解し、室温で 10 分間 1 μg の DNase I と共にインキュベートすることによって、DNA を分解した。そして、細胞破砕物を 4 °C で 30 分間、10,000 × g で遠心分離することによって取り除いた。rDer p 2 フラグメント 1 を可溶性破砕物中から得て、自然な条件下で、Ni-NTA 樹脂アフィニティカラム (QIAGEN, Germany) を通して精製した。

40

【0096】

rDer p 2、rDer p 2 フラグメント 2、および rDer p 2 ハイブリッドを封入体のペレット中から得た。このペレットを、室温で 60 分間、pH 8 の

50

条件下で、8 M 尿素、100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris - Clに可溶であった。

【0097】

不溶な残留物を遠心分離(10,000 × g、15 min、4 °C)によって取り除き、rDer p 2、rDer p 2 フラグメント2、およびrDer p 2 ハイブリッドを変質した条件下で、Ni - NTA樹脂アフィニティカラムを通して精製した(Q IAGEN)。

【0098】

90%以上の精製された組換えタンパク質を含む画分を、pH7の50 mM NaH₂PO₄に対して透析し、最終タンパク質濃度をMicro BCAタンパク質分析キット(Pierce、USA)を用いて決定した。

10

【0099】

上述したハイブリッド分子の構造は、Der p 2の2つのシートの少なくとも1つ、およびC8およびC119の間のジスルフィド結合が崩壊していた。それゆえに、Der p 2のIgEエピトープの今フォメーションが破壊され、主要なT細胞エピトープは保存されていた。バンドに見られるように、rDer p 2誘導体は、明白な蓄積が生じた大腸菌で過剰発現した(図9の第1レーン)。rDer p 2 フラグメント1を可溶画分において検出した。一方、他のタンパク質は、不溶な封入体画分に蓄積していたが、尿素には可溶であった。rDer p 2およびrDer p 2誘導体を、ニッケルアフィニティクロマトグラフィにより精製し、大腸菌培養液1 L当り20~30 mgタンパク質が得られた。(図9、第2レーン)。透析によりリフォールディングした後、rDer p 2、rDer p 2 フラグメント1、およびrDer p 2 ハイブリッド0.5 mg/ml~1 mg/mlの濃度の生理学バッファ中に溶解した。一方、rDer p 2 フラグメント2は、0.1 mg/ml以下の濃度の生理学バッファ中に溶解した。SDS - PAGEによる分析結果は、タンパク質が90%以上精製され、モノマー構造および二量体構造として分離したことを示した(図9、第2レーン)。

20

【0100】

b) rDer p 2およびrDer p 2誘導体のマトリックス支援レーザー脱離および飛行イオン化時間型(MALDI - TOF)質量分析法による分析

レーザー脱離質量スペクトルを、飛行時間Compact MALDI II instrument(Kratos、U.K.; piCHEM、Austria)を用いて線形モードで得た。10%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸、および - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸(60%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸が溶解している)中に溶解したサンプルを、マトリックスとして用いた。サンプルの準備のために、タンパク質およびマトリックス溶液を1:1で含む混合液を標的に堆積し、空気乾燥した。

30

【0101】

MALDI - TOF質量分析による4つのタンパク質の分析によって、rDer p 2、rDer p 2 フラグメント1、rDer p 2 フラグメント2、およびrDer p 2 ハイブリッドの分子量が、それぞれ15072.9 Da、6806.7 Da、9216.3 Da、および15001.8 Daであることが明らかになった。この結果は、これたのタンパク質のアミノ酸配列から算出した理論上の分子量と一致する(図10)。

40

【0102】

c) 円偏光二色性(CD)分析

JASCO J715分光偏光計を用いて、製造者が推奨した方法にしたがってネオジウムガラスを用いて波長を測定し、精製した組換えタンパク質CDスペクトルを記録した。2回蒸留した室温の水に溶解したrDer p 2およびrDer p 2誘導体(c = 0.1~0.5 mg/ml)のCD測定を行った。0.1 cmのパス長を有する円形の石英キュベットを用いて、解像度0.2 nm、スキャン速度50 nm/分でスペクトルを記

50

録した。少なくとも3回のスキャンデータを蓄積し、スペクトルを信号平均した。その結果を、一定の波長で残留した楕円率の平均として示した。

【0103】

精製した組換えDer p 2の遠紫外線CDスペクトルは、217nmに負のバンドを示した。これは、シートコンフォメーションを意味している(図11)。対照的に、rDer p 2誘導体のCDスペクトルは、これらのタンパク質が主としてフォールディングしていないことを示した。rDer p 2フラグメント1は、200nmまでの負のバンドによって特定される、典型的なランダムコイルコンフォメーションを示した。また、rDer p 2フラグメント2は、顕著なランダムコイルコンフォメーションを示したが、信号の輝度は非常に低かった。rDer p 2ハイブリッドのスペクトルは、少量のシート構造と共に、主としてランダムコイルコンフォメーションを吸着した(図11)。円偏光二色性分析によって、3次元コンフォメーションが破壊されていることが確認された。野生型rDer p 2と比較してrDer p 2誘導体において、シート構造の欠落または減少が見られた。

【0104】

〔実施例7：IgE結合能が大きく減少した組換えDer p 2ハイブリッド(rDer p 2ハイブリッド)〕

精製した組換えDer p 2、フラグメント1(1~53アミノ酸)およびフラグメント2(54~129アミノ酸)の2つのrDer p 2フラグメント、ならびにrDer p 2ハイブリッドについて、非変性点染色分析によりIgE反応性を調べた。精製したタンパク質(0.1mg/ml)を2マイクロリットル、およびコントロールとしてBSAを、ニトロセルロース膜片(Schleicher & Schuell, Germany)上に点在させた。点染色したタンパク質を含むニトロセルロース片を、バッファA(40mM Na₂HPO₄、0.6mM NaH₂PO₄、pH 7.5、0.5% [v/v] Tween 20、0.5% [w/v] BSA、0.05% [w/v] NaN₃)中に固定し、ダニアレルギー患者の血清、非アレルギー患者の血清(1:10に希釈)、または血清を含まないバッファAと共にインキュベートした。IgE抗体結合を、125I標識抗ヒトIgE抗体を用いて検出し、オートラジオグラフィにより可視化した。

【0105】

非変性点染色分析によって、野生型アレルゲンrDer p 2のIgE結合能を、2つのrDer p 2フラグメント、およびrDer p 2ハイブリッドと比較した。17のダニアレルギー個体の血清(第1~17レーン)において、ニトロセルロースに点在したrDer p 2に対するIgE反応が異なっていることを示した。一方、rDer p 2フラグメント1に対するIgE反応は、ほとんど検出されなかった。3つの血清だけが、rDer p 2フラグメント2に対して非常に弱い結合を示し、また、2つの血清だけがrDer p 2ハイブリッドに反応した(図12)。血清を含まないバッファと同様に、非アレルギー個体の血清は、rDer p 2またはrDer p 2誘導体に対してIgE反応を示さなかった(図12、第18および19レーン)。コントロールタンパク質として用いたBSAに対するIgE反応は検出されなかった(図12)。コンフォメーションの欠失、およびそれによるコンフォメーションIgEエピトープの欠失(実施例7参照のこと)の結果として、rDer p 2誘導体は、野生型rDer p 2と比較したIgE結合能が、ほぼ完全に失われたことが示された。

【0106】

〔実施例8：CD 203c発現によって測定したrDer p 2誘導体の減少したアレルゲン活性〕

ヘパリンで処理した血液サンプルをアレルギー患者から得た。様々な濃度のrDer p 2、rDer p 2フラグメント、rDer p 2ハイブリッド、モノクローナル抗IgE抗体(Immunotech, Marseille, France)、またはPBS中において、血液サンプル(100μl)を37℃で15分間インキュベートし

10

20

30

40

50

た。Hauswirth, A. W.らによる *J Allergy Clin Immunol* 110:102 (2002) に記載の方法で、CD 203c 発現を測定した。上記文献には、CD 203c のアップレギュレーションが、アレルゲン刺激好塩基球活性および脱顆粒のための代用マーカーとして記載されている。それゆえに、ハウスダストダニアレルギー患者の好塩基球において CD 203c のアップレギュレーションを測定することによって、組換え rDer p 2、rDer p 2 フラグメント、および rDer p 2 ハイブリッドの各アレルギー反応活性を比較した (図 13 および 14)。図 13 に、代表的な 3 人の患者の結果を示す。調査した各患者において、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の野生型 rDer p 2 と共にインキュベートした好塩基球は、顕著に CD 203c 発現をアップレギュレートした。一方同じ濃度の個々のフラグメント、または 2 つのフラグメントの等モル混合物とインキュベートした好塩基球は、アップレギュレートしなかった (図 13)。加えて異なる濃度 ($5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.32 \text{ ng}/\text{ml}$) の rDer p 2 および rDer p 2 ハイブリッドを 1:5 で希釈し、同じ 10 人の患者の好塩基球をさらした。図 14 に、代表的な 6 人の患者の結果を示す。 $40 \text{ ng}/\text{ml}$ および $5000 \text{ ng}/\text{ml}$ の間の濃度において、rDer p 2 ハイブリッドにさらした好塩基球が CD 203c をアップレギュレートした。一方、野生型 rDer p 2 は、 $8 \text{ ng}/\text{ml}$ および $200 \text{ ng}/\text{ml}$ の間の濃度ですでに CD 203c のアップレギュレートを引き起こした。10 人中 8 人の患者において、rDer p 2 と比較して rDer p 2 ハイブリッドの好塩基球活性化能が 10 倍以上減少した。

10

【0107】

20

抗ヒト IgE 抗体は、全ての患者の好塩基球において、CD 203c 発現のアップレギュレーションを引き起こした。一方、バッファのみでは、アップレギュレートしなかった (図 13 および 14)。

【0108】

ダニアレルギー患者の好塩基球における CD 203c 発現の測定によって、rDer p 2 ハイブリッドの生物学的活性が野生型 rDer p 2 と比較して減少していることが示され、rDer p 2 フラグメントでは生物学的活性が見られないことが示された。さらに、RBL 細胞を用いた好塩基球活性分析の結果は、誘導体で刺激した IgE Abs のアナフィラキシーが減少していることを示した。この結果は、免疫療法に用いたとき、低アレルギー性 rDer p 2 誘導体が、野生型 Der p 2 アレルゲンと比較して、IgE が介在する副作用をより低減することを示唆している。

30

【0109】

〔実施例 9: 野生型 rDer p 2 アレルゲンと同様に、マウス中において rDer p 2 特異的 IgG 抗体を刺激する rDer p 2 誘導体〕

8 週齢のメス BALB/c マウスの 5 つのグループに対して、それぞれ精製した $5 \mu\text{g}$ のタンパク質 (rDer p 2、rDer p 2 フラグメント 1、rDer p 2 フラグメント 2、または rDer p 2 ハイブリッド) を用いて免疫し、 $200 \mu\text{l}$ の AluGel-S (SERVA Electrophoresis, Germany) を、20 週間を通じて 4 週間間隔で首の皮下に吸着させた。血液サンプルを各免疫処理の 1 日前に採取し、 -20 で保存した。

40

【0110】

PBS ($c = 5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 中で希釈した rDer p 2 を用いて、ELISA プレート (Greiner, Austria) を 4 で一晚コーティングした。プレートを、PBST (PBS; 0.05% v/v Tween 20) を用いて 2 回洗浄し、ブロッキングバッファ (PBST; 1% w/v BSA) を用いて室温で 3 時間固定した。Der p 2 特異的 IgG 1 を測定するために、0.5% w/v BSA を含む PBST でマウス血清を 1:1000 に希釈した。ウエル毎に $100 \mu\text{l}$ の希釈溶液を加え、4 で一晚おいた。

【0111】

プレートを PBST で 5 回洗浄し、Vrtala, S. による *J Allergy*

50

Clin Immunol 98:913(1996)に記載されているように、モノクローナルラット抗マウスIgG1抗体(BD Pharmingen、USA)を用いて処理した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG抗体(Amersham Bioscience、Sweden)を追加し、結合したIgG1抗体を検出した。

【0112】

rDer p 2およびrDer p 2誘導体で免疫したマウスから得た血清サンプル中で、Der p 2特異的IgG1レベルを測定した(図15)。rDer p 2誘導体と同様に、rDer p 2は抗原性であり、2回目の免疫後のマウス(8週目)においてIgG1反応を刺激した(図15)。2回目の免疫後に、rDer p 2フラグメント1およびrDer p 2ハイブリッドによって刺激したIgG1反応は、rDer p 2で刺激したものよりもさらに高かった(図15)。最後の免疫後に、rDer p 2誘導体で刺激したIgG1反応は、野生型rDer p 2分子で刺激したものに匹敵した(図15)。

10

【0113】

[実施例10:ダニアレルギー患者IgEの野生型rDer p 2に対する結合を抑制する、rDer p 2誘導体で免疫刺激したIgG1抗体]

ELISAプレート(Greiner、Austria)を、100μlの精製したrDer p 2でコーティングし、PBSで希釈して、濃度を5μg/mlにした後、4で一晩おいた。PBSTで2回洗浄し、ブロッキングバッファ(PBST;1% w/v BSA)を用いて室温で3時間固定した後、抗rDer p 2抗血清、抗rDer p 2フラグメント1抗血清、抗rDer p 2フラグメント2抗血清、または抗rDer p 2ハイブリッド抗血清、あるいは対応する免疫前血清と共に、プレートを4で一晩インキュベートした。0.5% w/v BSAを含むPBSTでマウス抗血清を1:20で希釈し、ウサギ抗血清を1:100で希釈した。参考文献44および45に記載されているように、プレートを洗浄後、ダニアレルギー患者の血清を1:10で希釈した溶液と共に、4で一晩インキュベートし、0.5% w/v BSAを含むPBSTで1:2500に希釈したHRP結合ヤギ抗ヒトIgE抗体(KPL、USA)を用いて、結合したヒトIgEを検出した。IgE結合抑制率を次式にしたがって算出した。

20

30

$$100 - (ODs / ODp) \times 100$$

ここで、ODsおよびODpは免疫血清および免疫前血清と共にプレインキュベートした後の消衰係数をそれぞれ表している。

rDer p 2およびrDer p 2誘導体で免疫刺激したマウスIgG1抗体について、ダニアレルギー患者IgEのrDer p 2に対する結合抑制能を、ELISA競合実験により調べた。

【0114】

マウスIgG抗体による、アレルギー患者IgEの野生型rDer p 2に対する結合抑制率を表5および表6に示す。

【0115】

マウス抗rDer p 2抗体により得られた抑制率は、61~87%の間であった(平均75%)。一方、マウス抗rDer p 2ハイブリッド抗体、抗Der p 2フラグメント1抗体、および抗Der p 2フラグメント2抗体は、血清IgEの野生型rDer p 2に対する結合を、それぞれ47~76%(平均62%)、48~66%(平均54%)、および24~52%(平均41%)抑制した(表5)。

40

【0116】

【表 5】

IgE 結合抑制 (%)

抗体	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	平均
rDer p 2 フラグメント 1	48	66	53	50	54
rDer p 2 フラグメント 2	39	50	52	24	41
rDer p 2 ハイブリッド*	59	76	64	47	62
rDer p 2	61	87	77	73	75

【0117】

10

追加の実験において、精製した rDer p 2 および 3 つの rDer p 2 誘導体でウサギを免疫した。ウサギ抗血清による、ダニアレルギー患者 IgE の rDer p 2 に対する結合抑制能もまた、マウス血清から得たのと同様に ELISA 抑制分析により試験した (表 6)。ウサギ抗 rDer p 2 抗体は、患者 IgE の rDer p 2 に対する結合を 47 ~ 89 % (平均 66 %) 抑制した。一方、抗 rDer p 2 ハイブリッド抗体は、ヒト IgE 結合を 20 ~ 86 % (平均 59 %) 抑制した。ウサギ抗 rDer p 2 フラグメント 1 抗体による抑制率は、26 ~ 70 % (平均 52 %) であり、ウサギ抗 rDer p 2 フラグメント 2 抗体による抑制率は、32 ~ 54 % (平均 42 %) であった。抗フラグメント 1 抗体および抗フラグメント 2 抗体の混合物を用いた場合において、患者 IgE の野生型 rDer p 2 に対する結合の抑制率は、平均 55 % までわずかに増加したのみであった (表 6)。

20

【0118】

【表 6】

IgE 結合抑制 (%)

抗体	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5	平均
rDer p 2 フラグメント 1	59	70	49	26	57	52
rDer p 2 フラグメント 2	40	49	33	32	54	42
フラグメント 1 + フラグメント 2	60	69	44	38	66	55
rDer p 2 ハイブリッド*	61	86	61	20	67	59
rDer p 2	60	89	53	47	78	66

30

【0119】

マウスを免疫することによって、3 つのすべての rDer p 2 誘導体が、IgG 抗体反応刺激能を示し、抗原性が明らかになった。ダニアレルギー患者 IgE の Der p 2 に対する結合は、各 rDer p 2 誘導体によって刺激した IgG 抗体によって抑制された。しかしながら、2 つの独立したフラグメントによって刺激した IgG 抗体、およびフラグメント 1 および 2 の混合物によって刺激した IgG 抗体と比較して、rDer p 2 ハイブリッドによって刺激した IgG 抗体はより高い抑制能を示した。ブロックされた抗体は、組換えアレルゲンを用いた SIT における主要な役割を担っていることが示されたので、これらの結果は重要である。

40

【0120】

ELISA 抑制分析により示されたように、マウスを免疫することによって刺激した抗 rDer p 2 抗体および抗 rDer p 2 誘導体抗体は、アレルギー患者 IgE の rDer p 2 に対する結合を抑制した。

【0121】

〔実施例 11 : 野生型 rDer p 2 に基づいたワクチンと比較して、in vivo でアレルギー反応性が低下した rDer p 2 誘導体に基づいたワクチン〕

細胞培養培地 (100 ml RPMI 1649、10% FCS、4 mM L-グル

50

タミン、2 mM ピルビン酸塩ナトリウム、10 mM HEPES、100 μ M 2-メルカプトエタノール、1% Pen/Strep)中のラット好塩基球白血球(RBL)細胞(subline RBL-2H3)を、ELISAプレート(Nunc, Denmark)(100 μ l: 4 x 10⁴細胞)上に播種し、5%二酸化炭素雰囲気下、37で一晩おいた。

【0122】

rDer p 2、rDer p 2フラグメント1、rDer p 2フラグメント2およびrDer p 2ハイブリッドを用いて37で2時間免疫したマウスから得た血清2 μ lを、細胞に導入した。ついで、細胞を200 μ lのタイロッド/BSAバッファ(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.5 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、0.4 mM NaH₂PO₄、5.6 mM D-グルコース、12 mM NaHCO₃、10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)、0.1%ウシ血清アルブミン、pH 7.2)(Sigma-Aldrich, Austria)で2回洗浄し、rDer p 2(c=0.3 μ g/ml)で刺激した。10 μ lの10% v/v Triton X-100(Merck, Germany)を添加し、総ヘキソサミニダーゼ放出を誘導した。

10

【0123】

ヘキソサミニダーゼの放出量を測定するために、50 μ lの分析溶液(80 μ M 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminideを含むpH 4.5の0.1 M クエン酸塩バッファ)を、50 μ lの上清と共に、5%の二酸化炭素雰囲気下、37で1時間インキュベートした。

20

【0124】

100 μ lのグリシンバッファ(0.2 M グリシン、0.2 M NaCl、pH 10.7)を添加することによって反応を終了し、蛍光マイクロプレートリーダー(Dynatech MR 7000, Dynatech Laboratories, USA)を用いて、ex: 360 nm em: 465 nmで蛍光度を測定した。結果を、総ヘキソサミニダーゼ放出率の平均として示した。

【0125】

rDer p 2誘導体をワクチン接種することによって、野生型Der p 2アレルゲンに対するアレルギー免疫反応が誘導されるかどうかを調査するために、rDer p 2、rDer p 2フラグメント1、rDer p 2フラグメント2、およびrDer p 2ハイブリッドそれぞれを用いて、マウスを免疫した。ついで、RBL脱顆粒実験により野生型rDer p 2アレルゲンに対するアレルギー反応量を決定するために、マウスから得た血清サンプルをRBL細胞に導入するのに用いた。マウス抗rDer p 2フラグメント1抗体、抗rDer p 2フラグメント2抗体、および抗rDer p 2ハイブリッド抗体を導入したRBL細胞において、野生型rDer p 2アレルゲンにより得られたヘキソサミニダーゼ放出は、それぞれ0~16.6%(平均6.4%)、0.2~28.6%(平均13.2%)、および4.7~37.1%(平均18.3%)であった。一方、野生型抗rDer p 2抗体を導入したRBL細胞は、野生型rDer p 2で刺激した後、35~39%(平均37%)ヘキソサミニダーゼを放出した(図16)。

30

40

【0126】

〔実施例12:野生型Phl p 12、他の花粉由来プロフィリン、および植物-食品由来プロフィリンを認識する、MP12刺激IgG抗体〕

MP12で免疫した後誘導された抗体が、食品に派生する植物由来のプロフィリンと同様に、花粉由来プロフィリンを認識するか否かを実験するために、ELISA実験を行った。

【0127】

オオアワガエリ花粉由来プロフィリン(Phl p 12)、カバ花粉由来プロフィリン

50

(Bet v 2)、ヨモギ由来花粉由来プロフィリン (Art v 4)、ならびに異なる植物食品由来プロフィリン (カシューナッツ (Ana c)、セロリ (Api g 4)、バナナ (Mus xp 1)、ヘーゼルナッツ (Cor a 2)、およびニンジン (Dau c 4)) を用いて、ELISAプレート (5 µg/ml) 上をコーティングし、1:2000~1:64000まで順次希釈したウサギ抗血清と共にインキュベートした。POX 標識したロバ抗ウサギ抗血清を用いて、結合したウサギ抗体を検出した。

【0128】

野生型 Phl p 12 による誘導と比較して、MP 12 は Ig G 抗体反応を誘導した (図 17)。Phl p 12 および MP 12 で刺激した Ig G 抗体の両方が、花粉 (芝、木、水草) 由来プロフィリン、および植物由来食品プロフィリンに対して交差反応した (図 17)。

【0129】

〔実施例 13 : 木および水草由来のプロフィリン、ならびに植物食品プロフィリンと同様に、完全 Phl p 12 に対する、芝花粉アレルギー患者の血清 Ig E 結合を抑制する抗 MP 12 抗体〕

MP 12 で刺激したウサギ Ig G が、Phl p 12、他の花粉由来プロフィリン、および植物食品由来プロフィリンに対するアレルギー患者 Ig E の結合を抑制するか否かを、ELISA 競合実験により調査した。

【0130】

オオアワガエリ由来プロフィリン (r Phl p 12)、カバ由来プロフィリン (r Bet v 1)、ニンジン由来プロフィリン (r Dau c 4)、ヘーゼルナッツ由来プロフィリン (r Cor a 2)、バナナ由来プロフィリン (r Mus xp 1)、およびカシューナッツ由来プロフィリン (r Ana c 1) により、ELISAプレート (Nunc Maxisorp、Denmark) をコーティングした。各プレートを、1:50 で希釈した抗 Phl p 12 抗血清、抗 MP 12 抗血清、およびコントロールとしてこれらに対応する免疫前血清と共にプレインキュベートした。洗浄後、1:3 に希釈した、8つのプロフィリン感受性患者の血清と共にプレートをインキュベートし、1:2500 に希釈したヤギ由来 HRP 標識抗ヒト Ig E 抗血清 (KPL、USA) を用いて、結合した Ig E 抗体を検出した。抗 Phl p 12 抗血清および抗 MP 12 抗血清と共にプレインキュベートすることによって抑制された Ig E 結合の抑制率を、次式にしたがって算出した。

$$\text{Ig E 結合抑制率 (\%)} = 100 - \text{ODI} / \text{ODP} \times 100$$

ここで、ODI および ODP は、ウサギ免疫血清および対応する免疫前血清とプレインキュベートした後の吸光度をそれぞれ表している (表 7)。

【0131】

【表 7】

IgE 結合抑制率

患者	Phl p 12		Bet v 2		Cor a 2		Mus xp 1		Dau c 4		Ana c 1	
	α-Phl p12	α-MP12	α-Phl p12	α-MP12	α-Phl p12	α-MP12	α-Phl p12	α-MP12	α-Phl p12	α-MP12	α-Phl p12	α-MP12
1	91	82,7	88,3	84,4	61,3	58,7	70,6	46,4	82,7	83,3	70	71,7
2	82,5	72,8	74,9	77,6	73,3	60,3	74,4	50,8	75,5	83,2	62,3	45,1
3	89,4	72,3	75,4	76,4	58,8	61,6	74,4	33,5	65,4	63,1	61,6	56
4	77,4	72	69	69,6	56	52	57,2	39,8	65	66,8	71,5	41,5
5	86,3	65,2	35	66,4	68,6	52	75,5	27,2	97,5	93,8	59,5	56,2
6	71,2	84,7	54,4	72	57	62,7	73,9	25,6	58,5	68,3	44,3	42,6
7	83,6	70,4	60,2	70,8	69,7	59,7	72,5	35,6	72,4	71,3	28,1	32,2
8	89,1	57,4	61	79	57,8	57,8	73	29,6	70	67		
平均	83,8	72,3	64,8	74,5	62,3	58,1	71,4	36,1	73,3	74,6	56,8	53,6

【0132】

Phl p 1 2 刺激抗体およびMP 1 2 刺激抗体による、オオアワガエリ花粉プロフィリンに対するIgE結合の平均抑制率は、それぞれ83.8%および72.3%で、ほぼ同様であった(表7)。カバ花粉プロフィリン(Bet v 2)に対するIgE結合は、Phl p 1 2 刺激抗体(平均抑制率64.8%)よりもMP 1 2 特異的抗体(平均抑制率74.5%)によって強く抑制された。植物食品プロフィリンに対するIgE結合の抑制率は、両方の抗血清において非常に似通っていた(Cor a 2:抗Phl p 1 2 刺激IgGによる平均抑制率62.3%、抗MP 1 2 刺激IgGによる平均抑制率58.1%; Dau c 4:抗Phl p 1 2 刺激IgGによる平均抑制率73.3%、抗MP 1 2 刺激IgGによる平均抑制率74.6%; Ana c 1:抗Phl p 1 2 刺激IgGによる平均抑制率56.8%、抗MP 1 2 刺激IgGによる平均抑制率53.6%)。バナナプロフィリン(Mus xp 1)に対するIgE結合のみが、抗Phl p 1 2 刺激IgGによる抑制率(71.4%)よりも、抗MP 1 2 刺激IgGによる抑制率(36.1%)が低かった(表7)。

10

【0133】

プロフィリンは、すべての真核生物細胞に発現する代表的なアレルゲンである。それゆえに、呼吸器系アレルギー(例えば、鼻結膜炎、ぜんそく)を引き起こし得る全アレルゲンの代表的なものでもある。同様に、感作された患者における薬物の経口投与後の口腔アレルギー症候群(唇および舌の痒みおよび腫れ)を引き起こし得るアレルゲンの代表的なものでもある。

20

【0134】

再構成Phl p 1 2 誘導体であるMP 1 2 は、植物食品由来プロフィリンと同様に花粉由来プロフィリンを認識するように免疫したIgG抗体を誘導する。MP 1 2 刺激抗体は、患者血清IgEの花由来プロフィリンに対する結合と同様に、植物食品由来プロフィリンに対する結合も抑制した。それゆえに、MP 1 2 は、プロフィリンアレルギーに起因する花粉-食品交差性感作の治療に適している。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】MP 1 2 (本発明にしたがって再入れ換えをおこなったPhl p 1 2 アレルゲン)の一次構造を、野生型のPhl p 1 2 と比較して模式的に表した図である。

【図2】野生型Phl p 1 2 とMP 1 2 とのCDスペクトルを示した図であり、Phl p 1 2 および誘導体MP 1 2 の平均残基楕円率[](y軸)をある一定の幅における波長(x軸)に対して示した図である。

30

【図3】ポリプロリンカラムに通した組み換えMP 1 2 の画分を、14%SDS-PAGEで分離し、クマシー染色した図であり、レーンMは分子量マーカであり、レーン1は流出画分であり、レーン2~4は洗浄画分であり、レーン5、6は溶出画分であり、分子量(kDa)は左端に示している。

【図4】ニトロセルロース膜にドット状に載せたPhl p 1 2 およびMP 1 2 のIgEに対する反応性を調べた図であり、ドット状に載せたタンパク質と、ネガティブコントロールであるヒト血清アルブミン(HSA)とを、24人のPhl p 1 2 アレルギー性患者からの血清と反応させており(レーン1~24)、レーンNはコントロールである非アレルギー性の人由来のものであり、結合したIgE抗体は抗ヒトIgE抗体を用いて検出した。

40

【図5】2人のPhl p 1 2 アレルギー性患者における好塩基球ヒスタミン放出の誘導結果を示した図であり、患者の顆粒球をさまざまな濃度(x軸)のPhl p 1 2 (四角)およびMP 1 2 (丸)と反応させ、上清に放出された全ヒスタミンの百分率をy軸に示している。

【図6】オオアワガエリ花粉、カバノキ花粉、およびヨモギ花粉由来のプロフィリンに対するウサギ抗血清の反応性を示した図であり、Phl p 1 2 (ひし形)およびMP 1 2 (四角)に対するウサギ抗血清の、Phl p 1 2 (A)、Bet v 2 (B)および、ヨモギプロフィリン(C)に対する反応性をELISAにより試験した結果であり

50

、血清の希釈率をx軸に、対応するOD値をy軸に示しており、対応する免疫前血清はいずれの反応性試験にも示していない。

【図7】rPhl p 12により誘導される好塩基球の脱顆粒を、抗rPhl p 12 (P12)および抗MP12により誘導されるIgGによって阻害した結果を表す図であり、ラット好塩基球は、Phl p 12特異的マウスIgEにより、すでに負わされていた。

【図8】Der p 2ハイブリッド(本発明にしたがって再入れ換えしたDer p 2アレルゲン)の生成と一次構造をDer p 2野生型と比較して模式的に表した図である。

【図9】Hisタグ-タンパク質としてrDer p 2およびrDer p 2誘導体を発現しているBL21(DE3)のタンパク質抽出物をSDS-PAGEにより分離し、クマシー染色をした図であり、レーン1は抽出物であり、レーン2は精製rDer p 2、精製rDer p 2断片1、断片2および精製rDer p 2ハイブリッドであり、レーンMは分子量マーカである。

【図10】精製rDer p 2および精製rDer p 2誘導体の質量分光法分析の結果を示した図であり、x軸はそれぞれ質量/電荷の比であり、シグナル強度を、最も強いシグナルに対する百分率としてy軸に示している。

【図11】精製組み換えDer p 2、精製rDer p 2断片および精製rDer p 2ハイブリッドの遠紫外線CDスペクトルを表した図であり、タンパク質のスペクトルは、一定の波長(x軸)に対する平均残基楕円率(y軸)として表している。

【図12】組み換えDer p 2および組み換えDer p 2誘導体のIgE認識を示した図であり、ドットプロットした組み換えDer p 2、rDer p 2断片、rDer p 2ハイブリッドおよびBSAを用いて、ダニアレルギーをもつ17人からの血清(レーン1~17)、非アレルギー性の人からの血清(レーン18)、血清を含まないバッファー(レーン19)に関して、IgEの反応性の試験をおこない、結合したIgEを125Iラベルした抗ヒトIgE抗体を用いて検出し、オートラジオグラフィにより可視化した。

【図13】組み換えDer p 2およびrDer p 2誘導体による好塩基球の活性化をCD203cの発現を指標に測定した結果であり、10人のダニアレルギー性患者から採取した血液試料を、それぞれ10μg/mlの、組み換えrDer p 2、それぞれのDer p 2断片、各断片の混合物、IgE、もしくはバッファーと反応させて、CD203cの発現をFACS分析により測定して平均蛍光指数(MFI)として表し、代表として3人の患者の結果を示している。

【図14】組み換えDer p 2およびrDer p 2誘導体による好塩基球の活性化をCD203cの発現を指標に測定した結果であり、同じ10人のダニアレルギー性患者から採取した血液試料を、複数の濃度のrDer p 2、rDer p 2ハイブリッド、IgE、もしくはバッファーと反応させており(x軸)、CD203cの発現はFACS分析により測定して刺激指数(SI)として表し、代表として6人の患者の結果を示している。

【図15】マウスにrDer p 2およびrDer p 2誘導体の免疫を付与することにより誘導したDer p 2特異的IgG₁の進展を示した図であり、5匹のマウスのグループそれぞれに対して、精製したrDer p 2もしくは精製したrDer p 2誘導体により免疫を付与して、誘導されたIgG₁抗体をELISAによって測定し、マウス血清中のIgG₁抗体のレベルに対応した光学密度値(OD_{405nm})をy軸に示した結果を、値の50%が箱の内部に含まれ、はずれ値がバーの外側にある箱ひげ図として示しており、箱の中にある線は中間値を示し、白丸と星印は各マウス群のはずれ値と極値とを示している。

【図16】RBL細胞からの-ヘキソサミニダーゼ放出により可視化した、in vivoにおけるrDer p 2誘導体の低アレルゲン活性を示した図であり、rDer p 2野生型アレルゲンおよびrDer p 2誘導体による免疫付与前(免疫前血清)

10

20

30

40

50

および免疫付与後（免疫血清）から得られたマウス血清をラット好塩基球白血病（RBL）細胞に与え、rDer p 2により -ヘキソサミニダーゼの放出を誘導し、全 -ヘキソサミニダーゼ放出量に対する百分率をy軸に示した（各マウス群の5つの血清における平均値±SD）。

【図17】オオアワガエリ花粉（Phl p 12）、カバノキ花粉（Bet v 2）、ヨモギ花粉（Art v 4）、カシューナッツ（Ana C）、セロリ（Api g 4）、バナナ（Mus xp 1）、ハシバミの実（Cor a 2）、およびニンジン（Dau c 4）からのプロフィリンに対するウサギ抗血清の反応性を示した図であり、Phl p 12（ひし形）およびMP12（四角）に対する抗血清の上記プロフィリンに対する反応性をELISAにより試験した結果を、血清の希釈率をx軸に、対応するOD値をy軸に示しており、対応する免疫前血清はどの反応性試験においても示していない。

10

【図1】

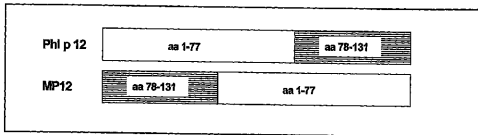
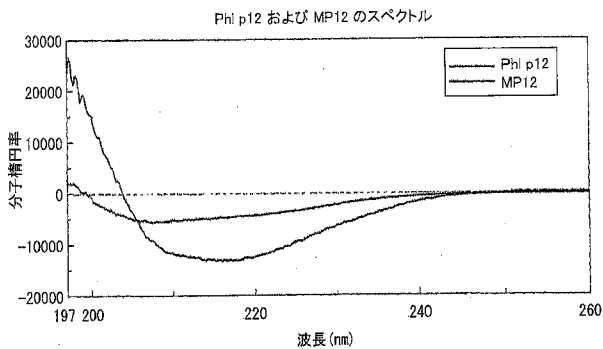


Fig. 1

【図2】



【図3】

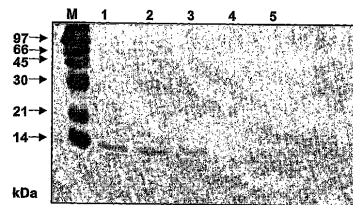


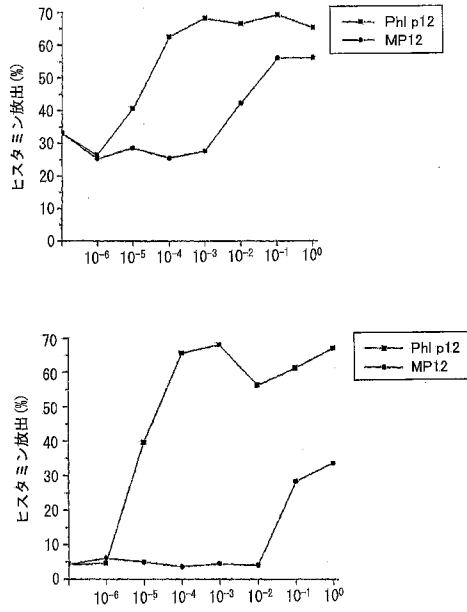
Fig. 3

【図4】

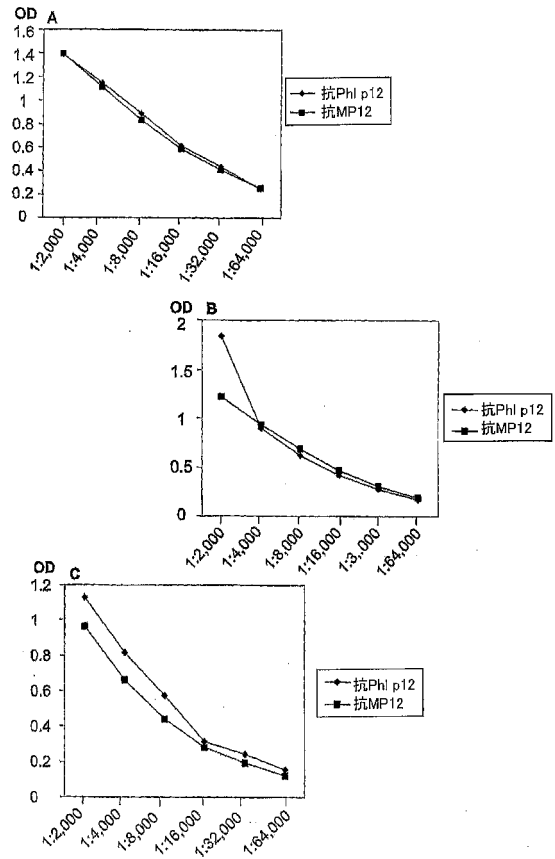


Fig. 4

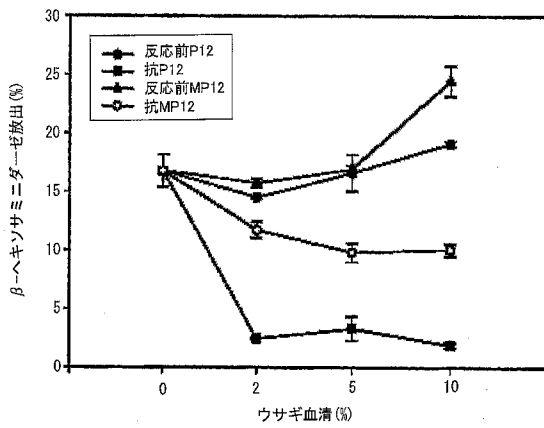
【 図 5 】



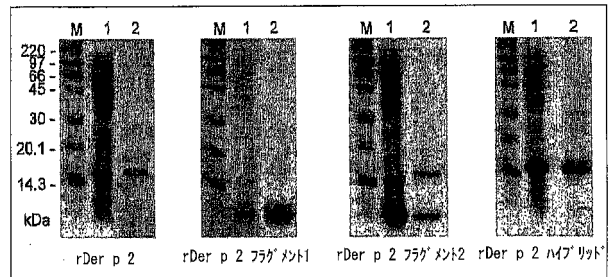
【 図 6 】



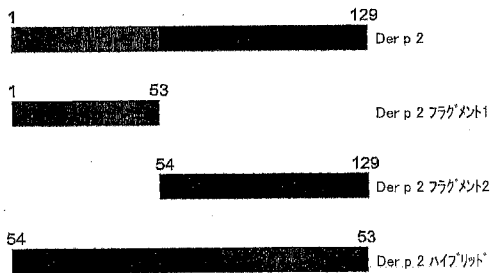
【 図 7 】



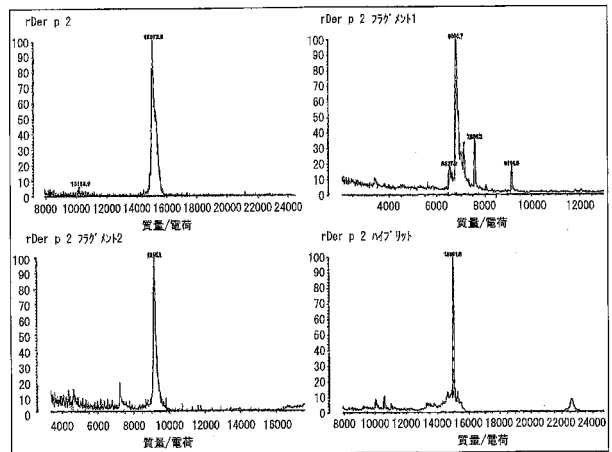
【 図 9 】



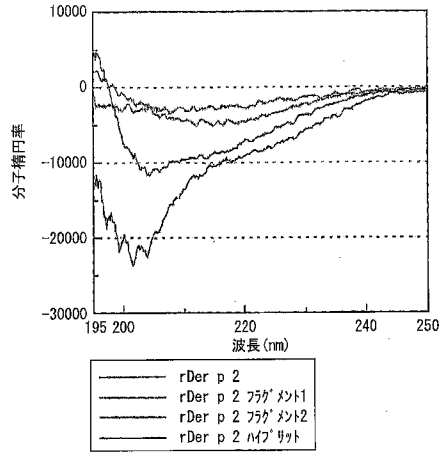
【 図 8 】



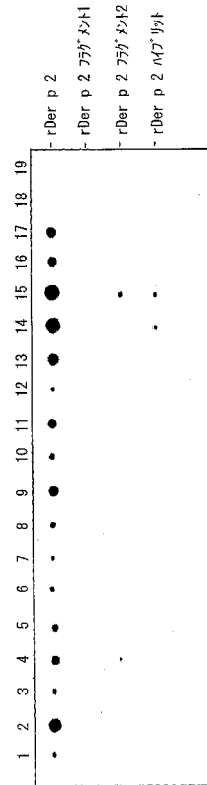
【 図 10 】



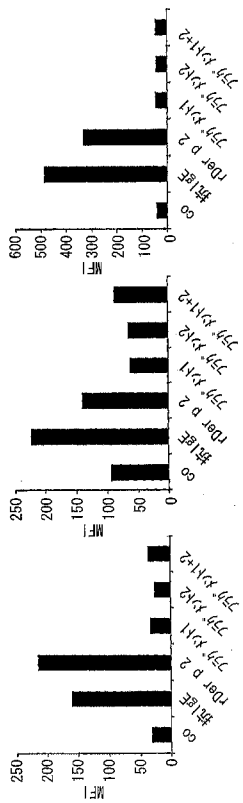
【 図 1 1 】



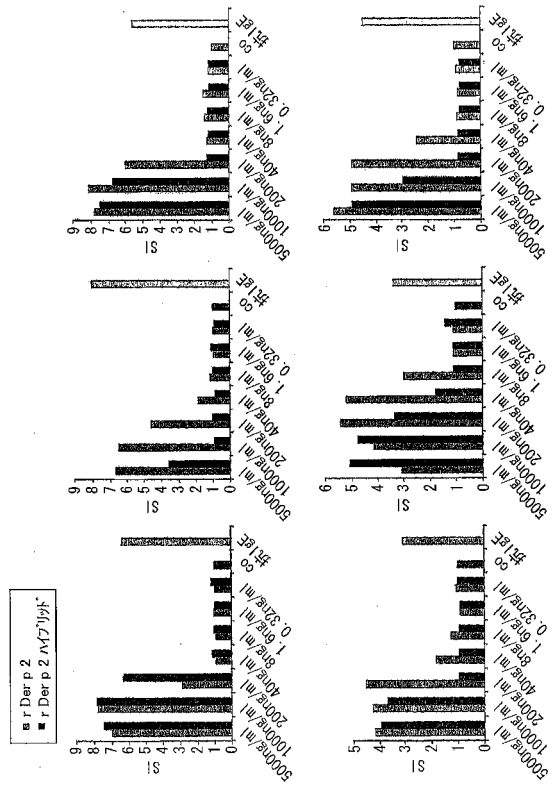
【 図 1 2 】



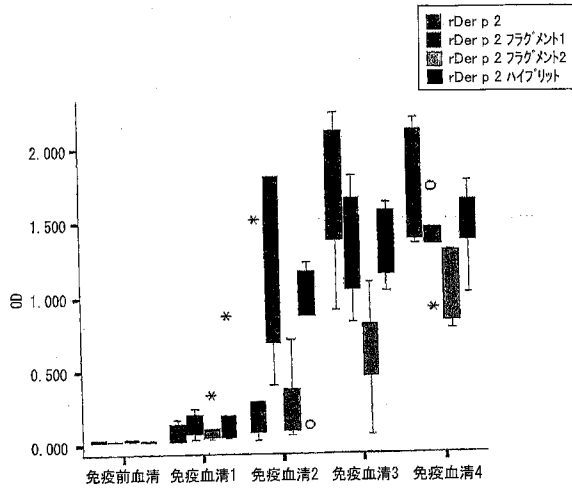
【 図 1 3 】



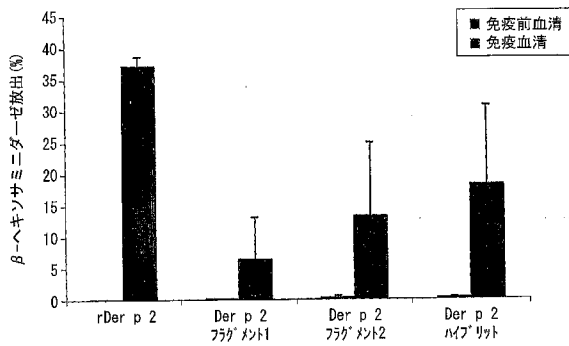
【 図 1 4 】



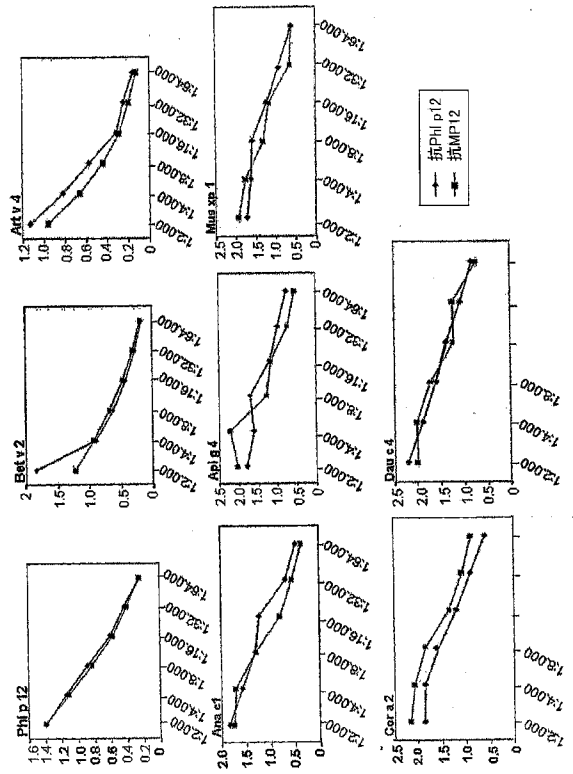
【 図 15 】



【 図 16 】



【 図 17 】



【 配列表 】

2008521837000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2005/000486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/415 A61K38/16		
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) 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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WESTRITSCHNIG KERSTIN ET AL: "Can we genetically engineer safer and more effective immunotherapy reagents?" CURRENT OPINION IN ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. DEC 2003, vol. 3, no. 6, December 2003 (2003-12), pages 495-500, XP009065969 ISSN: 1528-4050 cited in the application the whole document	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 May 2006		Date of mailing of the international search report 29/05/2006
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 Herrmann, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2005/000486

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VRTALA S ET AL: "Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates" METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 313-320, XP004488982 ISSN: 1046-2023 the whole document</p>	1-29
A	<p>EP 1 403 280 A (BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELS- AKTIENGESELLSCHAFT) 31 March 2004 (2004-03-31) the whole document</p>	1-29
A	<p>NIEDERBERGER V ET AL: "Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 101, no. Suppl. 2, 5 October 2004 (2004-10-05), pages 14677-14682, XP002379301 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1-29
A	<p>VALENTA R ET AL: "IDENTIFICATION OF PROFILIN AS A NOVEL POLLEN ALLERGEN IGE AUTOREACTIVITY IN SENSITIZED INDIVIDUALS" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 253, no. 5019, 1991, pages 557-560, XP001246905 ISSN: 0036-8075 the whole document</p>	1-29
A	<p>CARLSSON L ET AL: "ACTIN POLYMERIZABILITY IS INFLUENCED BY PROFILIN A LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN IN NONMUSCLE CELLS" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 115, no. 3, 1977, pages 465-484, XP009065988 ISSN: 0022-2836 the whole document</p>	26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/AT2005/000486

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1403280	A	31-03-2004	
		AT 303402 T	15-09-2005
		AU 2003277906 A1	19-04-2004
		CA 2500234 A1	08-04-2004
		DE 60205907 D1	06-10-2005
		DE 60205907 T2	16-02-2006
		DK 1403280 T3	07-11-2005
		WO 2004029083 A1	08-04-2004
		ES 2244708 T3	16-12-2005
		PT 1403280 T	30-11-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/36	(2006.01)	A 6 1 K 39/36	
A 6 1 K 39/35	(2006.01)	A 6 1 K 39/35	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヴァレント, ベーター

オーストリア, ヴィエンナ アー - 1 1 8 0, シュールガッセ 7 / 1 / 8

(72) 発明者 ケラー, ヴァルター

オーストリア, グラッツ アー - 8 1 1 1, ロッツァーシュトラッセ 8

(72) 発明者 ヴァレンタ, ルドルフ

オーストリア, テレージエンフェルド アー - 2 6 0 4, ベートーフェンシュトラッセ 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 CA06 HA01

4C085 BB03 BB04 DD90 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA30 CA50 CA51 DA83 DA86

EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008521837A5	公开(公告)日	2011-11-17
申请号	JP2007543647	申请日	2005-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	碧欧美公司		
申请(专利权)人(译)	Biomai股份公司		
[标]发明人	ヴェストリッチユニングケルステイン フォッケマルガレーテ ヴァレントペーター ケラーヴァルター ヴァレンタルドルフ		
发明人	ヴェストリッチユニング,ケルステイン フォッケ,マルガレーテ ヴァレント,ペーター ケラー,ヴァルター ヴァレンタ,ルドルフ		
IPC分类号	C07K14/415 C07K14/435 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 A61K39/36 A61K39/35 A61P37/08		
CPC分类号	A61P37/08 C07K14/415 C12N15/62		
FI分类号	C07K14/415.ZNA C07K14/435 C12N15/00.A G01N33/53.Q G01N33/566 A61K39/36 A61K39/35 A61P37/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/CA06 4B024/HA01 4C085/BB03 4C085/BB04 4C085/DD90 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA30 4H045/CA50 4H045/CA51 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2004002028 2004-12-02 AT		
其他公开文献	JP2008521837A		

摘要(译)

本发明涉及具有降低的变应原活性的野生型蛋白质变应原的衍生物的生产方法，其特征在于以下步骤：提供具有变应原活性的野生型变应原，将所述野生型变应原剪接成两部分，所述两个部分具有降低的变应原活性或缺乏变应原活性，并以相反的方向重新连接所述两个片段；以及过敏原衍生物。