

(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2009-539354

(P2009-539354A)

(43) 公表日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B064
C07K 14/005 (2006.01)	C07K 14/005	4B065
C07K 14/195 (2006.01)	C07K 14/195	4C085
C07K 14/37 (2006.01)	C07K 14/37	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-513514 (P2009-513514)	(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 0, トップ 1, ラツァレットガッセ 1 9
(86) (22) 出願日	平成19年6月11日 (2007.6.11)	(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21年1月13日 (2009.1.13)	(72) 発明者	ヴァレンタ, ルドルフ オーストリア, アー-2604 テレージ エンフェルド, ベートーヴェンシュトラ セ 18
(86) 国際出願番号	PCT/AT2007/000281	(72) 発明者	フォッカーテイケル, マルガレーテ オーストリア, アー-1140 ウィーン 、ウーテンドルフガッセ 22
(87) 国際公開番号	W02007/140505		
(87) 国際公開日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		
(31) 優先権主張番号	A994/2006		
(32) 優先日	平成18年6月9日 (2006.6.9)		
(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】 ワクチン担体

(57) 【要約】

本発明は、アレルゲンから得られる少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子から構成される低アレルギー誘発性タンパク質であって、当該少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子が少なくとも1つの第2の非アレルギー誘発性タンパク質またはこれらの断片と融合されているかまたは接合されている、低アレルギー誘発性タンパク質に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレルギーから得られる少なくとも 1 つの低アレルギー誘発性分子から構成される低アレルギー誘発性タンパク質であって、当該少なくとも 1 つの低アレルギー誘発性分子が少なくとも 1 つの第 2 の非アレルギー誘発性タンパク質またはこれらの断片と融合されているかまたは接合されている、低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項 2】

上記少なくとも 1 つの低アレルギー誘発性分子が、上記少なくとも 1 つの第 2 のタンパク質またはこれらの断片の N 末端および / または C 末端に対して融合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

10

【請求項 3】

上記少なくとも 1 つの第 2 のタンパク質が、ウイルスタンパク質、特に RNA もしくは DNA ウイルスタンパク質、細菌タンパク質、真菌タンパク質または原生生物タンパク質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項 4】

上記ウイルスタンパク質がカプシドタンパク質であることを特徴とする請求項 3 に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項 5】

上記ウイルスタンパク質の少なくとも 1 つが、ヒト病原性ウイルス、好ましくはピコルナウイルス科のウイルスから得られることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

20

【請求項 6】

ピコルナウイルス科の上記ウイルスが、ライノウイルス属、好ましくはヒトラインウイルス、特にヒトラインウイルス 89 または 14 の種に属することを特徴とする請求項 5 に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項 7】

上記アレルギーが、主要なカンバ花粉アレルギー、特に Bet v 1 および Bet v 4 ; 主要なオオアワガエリ花粉アレルギー、特に Phl p 1、Phl p 2、Phl p 5、Phl p 6 および Phl p 7 ; 主要なイエダニアレルギー、特に Der p 1 および Der p 2 ; 主要なネコアレルギー、特に Fel d 1 および Fel d 2 ; 主要なミツバチアレルギー; 主要なスズメバチアレルギー; プロフィリン、特に Phl p 12 ; オリーブアレルギー、特に Ole e 1 ; パリエタリア ユダイカアレルギー、特に Par j 2 ; ブタクサアレルギー、特に Amb a 1 ; ヨモギ花粉アレルギー、特に Art v 1 ; ならびに貯蔵庫ダニアレルギー、特に Lep d 2 からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

30

【請求項 8】

低アレルギー誘発性分子が、低下した IgE 結合能を示すことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項 9】

低アレルギー誘発性分子が、低下した T 細胞反応性を示すことを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

40

【請求項 10】

上記アレルギー断片が、Phl p 1 の 151 ~ 177、87 ~ 117、1 ~ 30、43 ~ 70 もしくは 212 ~ 241 番目のアミノ酸、Phl p 5 の 93 ~ 128、98 ~ 128、26 ~ 53、26 ~ 58、132 ~ 162、217 ~ 246、252 ~ 283 もしくは 176 ~ 212 番目のアミノ酸、Fel d 1 の鎖 1 の 1 ~ 34 もしくは 35 ~ 70 番目のアミノ酸、Fel d 1 の鎖 2 の 1 ~ 34、35 ~ 63 もしくは 64 ~ 92 番目のアミノ酸、Bet v 1 の 30 ~ 59、50 ~ 79 もしくは 75 ~ 104 番目のアミノ酸、Der p 2 の 1 ~ 33、21 ~ 51、42 ~ 73、62 ~ 103

50

もしくは98～129番目のアミノ酸、Der p 7の1～30、20～50、50～80、90～125、125～155もしくは165～198番目のアミノ酸、Der p 21の1～35、35～72、70～100もしくは90～122番目のアミノ酸、クローン30の1～32、15～48もしくは32～70番目のアミノ酸、Alt a 1の19～58、59～95、91～120もしくは121～157番目のアミノ酸、Par j 2の31～60、45～80、60～96もしくは97～133番目のアミノ酸、Ole e 1の1～40、36～66、63～99、86～120もしくは107～145番目のアミノ酸、Fel d 2の25～58、99～133、154～183、277～307、334～363、373～402、544～573、579～608、58～99、125～165、183～224、224～261、252～289、303～340、416～457、460～500もしくは501～542番目のアミノ酸、Can f 2の19～58、52～91、82～119、106～144もしくは139～180番目のアミノ酸、Can f 1の19～56、51～90、78～118、106～145もしくは135～174番目のアミノ酸、Art v 1の27～70、70～100もしくは92～132番目のアミノ酸、Amb a 1の31～70、80～120、125～155、160～200、225～263、264～300 305～350もしくは356～396番目のアミノ酸、Alt a 6の1～34、35～74、74～115、125～165、174～213、241～280、294～333、361～400もしくは401～438番目のアミノ酸、Alt a 2の1～40、41～80、81～120もしくは121～160番目のアミノ酸、またはこれらの断片もしくは配列変異によって構成されることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか1項に記載の融合した低アレルギー誘発性タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸分子を包含するベクター。

【請求項13】

上記ベクターが発現ベクターであることを特徴とする請求項12に記載のベクター。

【請求項14】

上記ベクターが、細菌ベクター、真菌ベクター、昆虫ベクター、ウイルスベクターまたは哺乳類ベクターであることを特徴とする請求項12または13に記載のベクター。

【請求項15】

請求項11に記載の核酸分子または請求項12～14のいずれか1項に記載のベクターを包含する宿主。

【請求項16】

請求項1～10のいずれか1項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質に対して対象化された抗体。

【請求項17】

上記抗体がモノクロナル抗体またはポリクロナル抗体であることを特徴とする請求項16に記載の抗体。

【請求項18】

請求項1～10のいずれか1項に記載の低アレルギー誘発性複合体または請求項16もしくは17に記載の抗体を包含するワクチンの調合物。

【請求項19】

上記調合物が、少なくとも1つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または防腐剤をさらに包含することを特徴とする請求項18に記載の調合物。

【請求項20】

上記調合物が、10ng～1g、好ましくは100ng～10mg、特に0.5μg～200μgの上記低アレルギー誘発性タンパク質または抗体を包含することを特徴とする

10

20

30

40

50

請求項 18 または 19 に記載の調合物。

【請求項 21】

ヒトもしくは動物におけるウイルス感染および/またはアレルギーを処置するかまたは予防する薬剤の製造に対する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性タンパク質または請求項 16 もしくは 17 に記載の抗体の利用。

【請求項 22】

上記薬剤が、少なくとも 1 つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または保存剤をさらに包含することを特徴とする請求項 21 に記載の利用。

【請求項 23】

上記薬剤が、能動免疫または受動免疫に使用されることを特徴とする請求項 21 または 22 に記載の利用。

10

【請求項 24】

上記薬剤が、10 ng ~ 1 g、好ましくは 100 ng ~ 10 mg、特に 0.5 μg ~ 200 μg の上記低アレルギー誘発性タンパク質または抗体を包含することを特徴とする請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の利用。

【請求項 25】

上記薬剤が、0.01 mg/kg 体重 ~ 5 mg/kg 体重、好ましくは 0.1 mg/kg 体重 ~ 2 mg/kg 体重の量において個体に投与されることを特徴とする請求項 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の利用。

【請求項 26】

個体におけるアレルギーおよび/またはウイルス感染の診断に対する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性複合体または請求項 16 もしくは 17 に記載の抗体の利用。

20

【請求項 27】

薬剤もしくはワクチンにおける担体としての、またはウイルス感染、特に風邪の診断に対する、ピコルナウイルス属のウイルスから得られるウイルスカプシドタンパク質の利用。

【請求項 28】

上記ウイルスが、ヒトライノウイルス、特にヒトライノウイルス 89 または 14 の種に属することを特徴とする請求項 27 に記載の利用。

30

【請求項 29】

C 末端および/または N 末端の切り詰め (truncation) を有し、かつ野生型の Phl p 5 と比較して低下した IgE 結合能を示す Phl p 5 から得られる低アレルギー誘発性分子。

【請求項 30】

切り詰めた (truncated) 上記分子が、低下した T 細胞反応性を示すことを特徴とする請求項 29 に記載の分子。

【請求項 31】

切り詰めた上記 Phl p 5 が、Phl p 5 の 93 ~ 128、98 ~ 128、26 ~ 53、26 ~ 58、252 ~ 283 番目のアミノ酸またはこれらの配列変異によって構成されることを特徴とする請求項 30 に記載の分子。

40

【請求項 32】

切り詰めた上記 Phl p 5 が、Phl p 5 の 132 ~ 162、217 ~ 246、176 ~ 212 番目のアミノ酸またはこれらの配列変異によって構成される請求項 29 に記載の分子。

【請求項 33】

C 末端および/または N 末端の切り詰めに有し、かつ低下した IgE 結合能を示す Fel d 1 から得られる低アレルギー誘発性分子。

【請求項 34】

切り詰めた上記分子が、低下した T 細胞反応性を示すことを特徴とする請求項 33 に記

50

載の分子。

【請求項 35】

切り詰めた上記 F e l d 1 が、F e l d 1 の鎖 1 の 1 ~ 34 もしくは 35 ~ 70 番目のアミノ酸、F e l d 1 の鎖 2 の 1 ~ 34、35 ~ 63 もしくは 64 ~ 92 番目のアミノ酸またはこれらの配列変異によって構成されることを特徴とする請求項 33 または 34 に記載の分子。

【請求項 36】

C 末端および / または N 末端の切り詰めを有し、かつ低下した I g E 結合能を示す D e r p 2 から得られる低アレルギー誘発性分子。

【請求項 37】

切り詰めた上記分子が、低下した T 細胞反応性を示すことを特徴とする請求項 36 に記載の分子。

【請求項 38】

切り詰めた上記 D e r p 2 が、D e r p 2 の 1 ~ 33、21 ~ 51、42 ~ 73、62 ~ 103、98 ~ 129 番目のアミノ酸またはこれらの配列変異によって構成されることを特徴とする請求項 36 または 37 に記載の分子。

【請求項 39】

C 末端および / または N 末端の切り詰めを有し、かつ低下した I g E 結合能を示し、かつ低下した T 細胞反応性を任意に示し、D e r p 7 の 1 ~ 30、20 ~ 50、50 ~ 80、90 ~ 125、125 ~ 155 もしくは 165 ~ 198 番目のアミノ酸、A m i n o 酸、D e r p 10 の 1 ~ 35、36 ~ 70、71 ~ 110、111 ~ 145、140 ~ 170、175 ~ 205、210 ~ 250 もしくは 250 ~ 284 番目のアミノ酸、D e r p 21 の 1 ~ 35、35 ~ 72、70 ~ 100 もしくは 90 ~ 122 番目のアミノ酸、クローン 30 の 1 ~ 32、15 ~ 48 もしくは 32 ~ 70 番目のアミノ酸、A l t a 1 の 19 ~ 58、59 ~ 95、91 ~ 120 もしくは 121 ~ 157 番目のアミノ酸、P a r j 2 の 31 ~ 60、45 ~ 80、60 ~ 96 もしくは 97 ~ 133 番目のアミノ酸、O l e e 1 の 1 ~ 40、36 ~ 66、63 ~ 99、86 ~ 120 もしくは 107 ~ 145 番目のアミノ酸、F e l d 2 の 25 ~ 58、99 ~ 133、154 ~ 183、277 ~ 307、334 ~ 363、373 ~ 402、544 ~ 573、579 ~ 608、58 ~ 99、125 ~ 165、183 ~ 224、224 ~ 261、252 ~ 289、303 ~ 340、416 ~ 457、460 ~ 500 もしくは 501 ~ 542 番目のアミノ酸、C a n f 2 の 19 ~ 58、52 ~ 91、82 ~ 119、106 ~ 144 もしくは 139 ~ 180 番目のアミノ酸、C a n f 1 の 19 ~ 56、51 ~ 90、78 ~ 118、106 ~ 145 もしくは 135 ~ 174 番目のアミノ酸、A r t v 1 の 27 ~ 70、70 ~ 100 もしくは 92 ~ 132 番目のアミノ酸、A m b a 1 の 31 ~ 70、80 ~ 120、125 ~ 155、160 ~ 200、225 ~ 263、264 ~ 300、305 ~ 350 もしくは 356 ~ 396 番目のアミノ酸、A l t a 6 の 1 ~ 34、35 ~ 74、74 ~ 115、125 ~ 165、174 ~ 213、241 ~ 280、294 ~ 333、361 ~ 400 もしくは 401 ~ 438 番目のアミノ酸、A l t a 2 の 1 ~ 40、41 ~ 80、81 ~ 120、121 ~ 160 番目のアミノ酸またはこれらの断片またはこれらの配列変異によって好ましく構成される、D e r p 7、D e r p 21、クローン 30、A l t a 1、P a r j 1、O l e e 1、F e l d 2、C a n f 1、C a n f 1、A r t v 1、A m b a 1、A l t a 2 または A l t a 6 から得られる低アレルギー誘発性分子。

【請求項 40】

低下した I g E 結合能を示し、かつ任意に低下した T 細胞反応性を示す請求項 29 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の分子の少なくとも 2 つを包含する低アレルギー誘発性融合タンパク質。

【請求項 41】

上記分子の少なくとも 2 つが同じアレルギーゲンから得られる場合に、上記分子が野生型の

10

20

30

40

50

アレルギーにおける断片の順番とは異なる順番において互いに融合されていることを特徴とする請求項 40 に記載の融合タンパク質。

【請求項 42】

請求項 29 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性分子または請求項 40 もしくは 41 に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 43】

請求項 42 に記載の核酸分子を包含するベクター。

【請求項 44】

上記ベクターが発現ベクターであることを特徴とする請求項 43 に記載のベクター。

【請求項 45】

上記ベクターが、細菌ベクター、真菌ベクター、昆虫ベクター、ウイルスベクターまたは哺乳類ベクターであることを特徴とする請求項 43 または 44 に記載のベクター。

【請求項 46】

請求項 18 に記載の核酸分子または請求項 43 ~ 45 のいずれか 1 項に記載のベクターを包含する宿主。

【請求項 47】

請求項 29 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性分子または請求項 40 もしくは 41 に記載の融合タンパク質に対して対象化された抗体。

【請求項 48】

上記抗体が、モノクロナル抗体またはポリクロナル抗体であることを特徴とする請求項 47 に記載の抗体。

【請求項 49】

請求項 29 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性分子、請求項 40 もしくは 41 に記載の融合タンパク質または請求項 46 もしくは 47 に記載の抗体を包含するワクチン調合物。

【請求項 50】

上記調合物が、少なくとも 1 つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および / または防腐剤をさらに包含することを特徴とする請求項 49 に記載の調合物。

【請求項 51】

上記調合物が、10 ng ~ 1 g、好ましくは 100 ng ~ 10 mg、特に 0.5 μg ~ 200 μg の上記低アレルギー誘発性分子または抗体を包含することを特徴とする請求項 49 または 50 に記載の調合物。

【請求項 52】

個体におけるアレルギーを処置するかまたは予防する薬剤の製造に対する、請求項 29 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の低アレルギー誘発性分子、請求項 40 もしくは 41 に記載の融合タンパク質、請求項 42 に記載の核酸分子、請求項 43 ~ 45 のいずれか 1 項に記載のベクター、または 47 もしくは 48 に記載の抗体の利用。

【請求項 53】

上記薬剤が、少なくとも 1 つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および / または防腐剤をさらに包含することを特徴とする請求項 52 に記載の利用。

【請求項 54】

上記薬剤が、10 ng ~ 1 g、好ましくは 100 ng ~ 10 mg、特に 0.5 μg ~ 200 μg の上記免疫原性分子、核酸分子、ベクター、宿主または抗体を包含することを特徴とする請求項 52 または 53 に記載の利用。

【請求項 55】

上記薬剤が、0.01 mg / kg 体重 ~ 5 mg / kg 体重、好ましくは 0.1 mg / 体重 ~ 2 mg 体重の量において個体に投与されることを特徴とする請求項 52 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の利用。

【請求項 56】

上記個体が、アレルギーになる危険性にさらされていることを特徴とする請求項 52 ~

10

20

30

40

50

5 5 のいずれか 1 項に記載の利用。

【請求項 5 7】

個体におけるアレルギーの診断またはアレルギー療法の推移の監視に対する、請求項 2 9 ~ 3 9 に記載の低アレルギー誘発性分子、請求項 4 0 に記載の融合タンパク質、または請求項 4 7 もしくは 4 8 に記載の抗体の利用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、新規な低アレルギー誘発性分子およびこれらの利用に関する。

【0 0 0 2】

タイプ I アレルギーは、人口のほぼ 2 5 % を冒している I g E 媒介過敏性疾患である。それは、本質的に無害な抗原源（例えば、花粉、昆虫、カビおよび動物タンパク質）から得られる無害な風媒、昆虫、毒物、食物のアレルゲンおよび接触アレルゲン抗原の、特異的な免疫グロブリン E による認識に基づく。効果細胞結合 I g E 抗体の架橋が、炎症性媒介物（例えば、ヒスタミン、ロイコトリエン）の放出を導き、そしてこのようにしてアレルギーの即時型の症状に導く。I g E 依存性および I g E 非依存性の機序を介する T 細胞活性化は、慢性的なアレルギー炎症の原因になる。

【0 0 0 3】

アレルギー処置のおそらく唯一の原因作用形態は、ほとんどの起源に関するアレルゲン抽出物の漸次的に増加する量の繰り返し投与に基づく、アレルゲン特異的な免疫療法である。多くの臨床研究は、注入免疫療法の臨床的有効性を立証しており、かつこの処置の基礎を成す種々の免疫学的機序に関する証拠がある。あるアレルゲン源に対する高品質なアレルゲン抽出物を調製することの困難性、および患者に対するアレルゲンの投与が種々の副作用の原因になる可能性があるという事実に起因して、アレルゲン特異的な免疫療法は、ある患者の群およびある疾患の症状に対してのみ推奨され得る。種々のアレルゲン源に対する共感作を有する患者、および重篤な疾患症状（例えば、アレルギー喘息）にかかっている患者に対する処置は、特に困難である。アレルギーの最も激しい症状の 1 つであるアレルギー喘息は、日々の生活の質に対して重篤に影響するので、高い入院の割合を招き、かつ患者の集中的な看護を必要とする深刻な生命に関わる形態においてそれ自身を明確に示すことができる。

【0 0 0 4】

天然のアレルゲン源から調製されるアレルゲン抽出物は、本質的に天然のままであり、かつ技術的手段によって、当該調製物における個々のアレルゲンの質および量に影響を与えることが不可能である。また、それらは、多くの不確定な非アレルギー誘発性成分を含んでおり、かつ種々の最近の研究は、当該抽出物の低品質を指摘しかつそれらの非常な不均一性を立証している。

【0 0 0 5】

ここ 1 0 年において、組み換え D N A 技術を用いた分子アレルゲンの性質決定の分野において、大きな進展がなされている。最も重要な疾患誘発アレルゲンは、分子レベルに至るまで性質決定されており、かつ天然アレルゲン抽出物のエピトープの複雑性を模倣する組み換えアレルゲンが製造されている。さらに、種々の研究団体は、アレルゲン構造に関する知識を用いて、定義済の新たなアレルゲンワクチンを開発している。遺伝子工学、合成ペプチド化学、および免疫刺激性 D N A 配列を用いたアレルゲンの接合が使用されて、新たなワクチンのアレルギー活性を低減させ、かつこのようにして治療誘導副作用の割合を低減させる。まず、有望な臨床研究は、当該アレルゲン誘導体を用いて実施された。興味深いことに、遺伝子工学的な組み換えアレルゲンおよびアレルゲン由来合成 T 細胞含有ペプチドの I g E 反応性が、大きく低減され得るか、または消滅さえし得るが、これらの誘導体が、やはり注入の数時間後に現れる全身性の副作用を誘導し得ることが判明した。例えば、主要なネコアレルゲンである F e l d 1 の T 細胞エピトープペプチドが、内皮注入後の数時間において、喘息および気管支過敏性を誘導したことが、報告され、か

10

20

30

40

50

つこの影響がT細胞媒介性であり、かつMHC限定的であるという強力な証拠がある。

【0006】

これらの結果は、即時型の反応がこれらの免疫治療研究の過程において記録されなかったことから、IgE反応性の排除がIgE媒介性の副作用を減少させることを指し示している。しかし、組み換えアレルゲン誘導体およびペプチド混合物において保持されているアレルゲン特異的T細胞エピトープは、遅発型の副作用（例えば、非常に問題となるか、またはアトピー性の皮膚炎、慢性のT細胞媒介アレルギー性皮膚症状）の原因である。組み換えアレルゲン誘導体の場合に引き起こされる副作用は、相対的に穏やかであって、かつT細胞ペプチドワクチンの場合に引き起こされる副作用は、適切な投薬によって克服され得る。従って、新たな2つの取り組みの両方は、アレルギー性の鼻結膜炎の免疫療法に

10

【0007】

投与するために、およびその結果としてペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質に対する有効な免疫応答を刺激するために、補佐剤および/または担体が定期的に用いられる。例えば、完全フロインド補助液は、利用可能な最も効力のある補佐剤の1つである。しかし、その使用は、その副作用のせいでヒトに対して認可されない。従って、ペプチドおよびポリペプチド由来のアレルゲンに対して強力な免疫応答を誘導できるワクチン組成物に対する要求、およびもちろん完全フロインド補助液の使用を回避する他の抗原の要求が

20

【0008】

また、当該技術において公知の担体タンパク質であるコレラ毒素は、ワクチン組成物における完全フロインド補助液の使用を排除する補佐剤として恒常的に使用される。しかし、コレラ毒素は、相対的および特異的なIgE抗体レベルを増加させ、かつIgE関連炎症性反応を導く。

30

【0009】

ワクチン接種用に使われるほとんどの担体タンパク質によって刺激される副作用に起因して、毒性のある補佐剤を使用することなく、寛容性に乏しい担体タンパク質を用いることなく、かつある状況において強い病理的免疫応答を刺激することなく、アレルゲンまたは他の抗原に対する免疫応答を刺激することができる担体系に対する必要性がある。これらの指定に合致する新規な担体系は、アレルギー性疾患のような疾患の治療または予防に好適である新規な、接合物および組成物の形成に関して使用され得る。

40

【0010】

Bohle B. et al. (J. Immunol. 172 (11) (2004): 6642-6648)において、S層タンパク質の部分およびBet v 1部分を包含する組み換え融合タンパク質について説明されている。この分子は、本来の高アレルギー性Bet v 1タンパク質を包含する。

【0011】

国際公開第2004/004761号パンフレットは、免疫原と融合され、かつ免疫化に使用され得るウイルス様粒子に関する。

【0012】

国際公開第2004/003143号パンフレットにおいて、ウイルス様粒子およびワクチン接種に関する免疫原として、高アレルギー性分子を包含する融合タンパク質の利用

50

が、開示されている。

【0013】

上述の欠点を克服し、かつ低下した副作用を有するアレルゲンワクチン接種を可能にする薬剤および担体を提供することが、本発明の目的である。

【0014】

従って、本発明は、アレルゲンから得られる少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子から構成される低アレルギー誘発性タンパク質であって、当該少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子が少なくとも1つの第2の非アレルギー誘発性タンパク質またはこれらの断片と融合されているかまたは接合されている、低アレルギー誘発性タンパク質に関する。

10

【0015】

分子、特に本発明に係る低アレルギー誘発性分子に対する増強された免疫応答を刺激するために、当該分子は、担体に対して（遺伝子工学によって）融合されるか、または（化学反応によって）接合される。従来のおよび恒常的に採用される担体は、例えば、KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）である。大きな海の軟体動物であるメガトゥーラクレヌラタ（*Megathura crenulata*）から単離されるKLHは、注入用の免疫原を作り出すために使用される最も有名な担体タンパク質の1つである。KLHは、その大きな分子量のせいで、そして非哺乳類タンパク質であるために、強い抗体応答を誘導する。

【0016】

本発明の低アレルギー誘発性分子と融合されるかまたは接合される第2のタンパク質（“担体”または“担体タンパク質”）は、アレルゲンに由来しない（非アレルギー誘発性である）。しかし、本発明に使用される担体タンパク質は、動物またはヒトに対して投与される場合に、T細胞反応性を示し得、および/または自身および融合されるか、または接合されている低アレルギー誘発性分子に対する免疫応答を誘導し得る。従って、担体タンパク質が病原体（例えば、ウイルス、細菌など）から得られる場合に、当該担体および病原体を対象化する（防御）抗原が製造される。

20

【0017】

本明細書において使用されるときに、“低アレルギー誘発性タンパク質”は、非アレルギー誘発性源の担体の、低アレルギー誘発性分子との融合タンパク質/ポリペプチドを意味する。さらにまた、“低アレルギー誘発性タンパク質”は、低アレルギー誘発性分子との担体の接合産物（例えば、化学結合、吸着）であることを意図される。

30

【0018】

本明細書において使用されるときに“低アレルギー誘発性”は、低下したアレルギー誘発性の潜在性を有する分子を指す。当該分子は、これらの分子が得られる野生型のタンパク質と比較して、個々においてアレルギー性反応を刺激する低減された能力を有する。

【0019】

アレルゲンから得られし、かつ第2のタンパク質と融合される/接合される少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子は、C末端および/またはN末端において好ましく切り詰められている（*truncated*）。本明細書において使用されるときに“C末端および/またはN末端の切り詰め（*truncation*）”は、野生型アレルゲンのN末端もしくはC末端のいずれか、またはN末端およびC末端の両方からアミノ酸残基が、少なくとも1、2、3、4、5、7、10、15、20、30アミノ酸残基の欠失によって除去されていることを意味する。

40

【0020】

低アレルギー誘発性分子（すなわち、ペプチド/ポリペプチド）は、好ましくは10～50アミノ酸、より好ましくは15～40アミノ酸、特に20～30アミノ酸を包含し、かつ低下したIgE反応性を示す。これらの分子は、T細胞媒介性の副作用の原因になり得るT細胞エピトープを排除するために設計される。低下したT細胞応答を示すT細胞エピトープおよび分子は、当業者によって公知の方法（例えば、Bercovici N. et al. Clin

50

Diagn Lab Immunol. (2000) 7:859-864) によって決定され得、かつ同定され得る。

【0021】

表面露出ペプチドを用いて、主要な草本花粉アレルゲン（例えば、Phl p 1）に似たアレルゲンから得られるペプチドワクチン、および主要なカンバ花粉アレルゲンである Bet v 1 に対するペプチドワクチンが設計可能であることは、見出された。得られたデータは、当該ペプチドワクチンが、一次構造が I g E エピトープマッピング、3次元構造データまたはコンピュータを用いた表面露出ドメインの予測に従って知られている、あらゆるアレルゲンに対して製造され得ることを示している。しかし、これらの方法を用いて同定されているペプチドのすべてがワクチン接種に採用され得るわけではないので、ワクチン接種用に使用され得る好適なペプチドの選択は、困難なままである。ワクチン接種の目的に対して好適に使用され得るペプチドは、低下した I g E 結合能を示すべきであり、かつ - 遅発型の副作用を低減させるか、もしくは回避するために - 低下した T 細胞反応性を示すべきである。

10

【0022】

本明細書において使用されるときに、“アレルゲンから得られる”という用語は、本発明に係る低アレルギー誘発性分子が、断片化または切り詰めによってアレルゲンから直接に取得されることを意味する。本発明の低アレルギー誘発性分子のアミノ酸配列は、当該低アレルギー誘発性分子が得られる野生型アレルゲンのアミノ配列の範囲に対して、好ましくは少なくとも 80% が同一、より好ましくは少なくとも 90% が同一、最も好ましくは少なくとも 95% が同一、特に 100% が同一である。しかし、野生型アレルゲン断片に対して 100% が同一ではない分子は、当該野生型アレルゲン断片に対象化されている 1 つの抗体または複数の抗体、好ましくは I g G 抗体に対して、少なくとも 60%、好ましくは 70%、より好ましくは 80%、最も好ましくは 90% の強度を有して結合可能であるべきである。

20

【0023】

第 1 のアミノ酸の、第 2 のアミノ酸に対する同一性の程度は、ある演算手順を用いた両方のアミノ酸配列の直接的な比較によって決定され得る。当該演算手順は、例えば、種々のコンピュータプログラム（例えば、“BLAST 2 SEQUENCES (blastp)” (Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-25; Corpet F, Nucl. Acids Res. (1988) 16:10881-10890) に組み込まれている。

30

【0024】

本発明に係る切り詰めた分子は、完全な野生型アレルゲンよりもアレルゲン特異的 T 細胞の低い活性化（好ましくは少なくとも 30%、より好ましくは 50%、最も好ましくは 70% の低下）を誘導し、I g E 結合アッセイによって評価されるような 50% 以上（好ましくは 70% 以上）が低減したアレルギー誘発性活性および I g E 媒介細胞の活性化の誘導能を示し、かつ上述のような担体に対して結合される場合に、アレルギー性患者から得られるポリクロナル I g E の完全な野生型アレルゲンに対する結合を阻害する I g G 抗体を誘導する、アレルゲンの一部として定義され得る。

【0025】

ペプチドは、ミモトープとの重複を回避するために、アレルゲンからの配列を含有すべきである。しかし、抗原断片の小ペプチド模倣物（15 アミノ酸未満）であり、かつ無作為のペプチドライブラリから得られるミモトープは、本明細書に定義されるような、本来の、アレルゲン由来分子を表さない。それらは、それらが I g G 応答を強く阻害するためには小さすぎるので、本発明に従って使用され得ない。

40

【0026】

本発明に係る低アレルギー誘発性分子は、組み換え法または化学合成によって得られ得る。また代替可能に、それは、野生型アレルゲンまたは関心のある分子を包含するペプチド/タンパク質の酵素的または化学的な切断によって、分子を取得可能であることはもちろんである。

【0027】

50

低アレルギー誘発性分子は、少なくとも1つのアレルゲンから得られる少なくとも2つの切り詰めたアレルゲン分子を好ましく包含し得、ここで、少なくとも2つの当該分子が同じアレルゲンから得られている場合に、切り詰めたアレルゲン断片の順序は、野生型アレルゲンにおける断片の順序とは異なる。

【0028】

本発明に係る低アレルゲン誘発性分子は、本明細書に定義されるような1つ以上（好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ）の低アレルギー誘発性分子を包含し得、このようにして融合タンパク質を生じる。またもちろんのことIgE結合能を欠如し、かつT細胞エピトープを欠如している、単一の低アレルギー誘発性分子は、同じ、および/または異なる起源のアレルゲンから得られ得る。分子が同じアレルゲンから得られる場合に、低アレルギー誘発性融合タンパク質における順序は、野生型アレルゲンにおける順序と同一であるべきではない（これは、IgE結合部位の再構成および形成を予防する）（例えば、国際公開第2004/065414、Linhart B and Valenta R (Int Arch Allergy Immunol. (2004) 134:324-31)を参照すればよい)。

10

【0029】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子は、上記第2のタンパク質またはこれらの断片のN末端および/またはC末端に対して融合される。

【0030】

アレルゲンまたはこれらの断片は、互いに化学的に（例えば、または組み換え法によって）接合され得る。アレルゲンまたはこれらの断片が担体に対して化学的に接合される場合に、上記アレルゲンまたはこれらの断片は、末端のシステイン残基を供給されるべきである（結果として、遊離スルフィドリル基を生じる）。上記末端（N末端またはC末端）のシステイン残基に対して、あらゆるマレイミド活性化担体が接合され得、このようにして免疫原/担体複合体を作り出す。アレルゲンまたはこれらの断片が末端にスルフィドリル基を有していない場合に、担体タンパク質に対してアミン（リジン）またはカルボン酸（グルタミン酸、アスパラギン酸または5'-リン酸塩）を結合させるために、EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩）化学的性質が採用され得る。

20

【0031】

低アレルギー誘発性分子が、担体のN末端またはC末端に対して融合される場合に、組み換え法が採用され得る。

30

【0032】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも1つの第2のタンパク質は、ウイルスタンパク質、特にRNAウイルスまたはDNAウイルスタンパク質、細菌タンパク質、真菌タンパク質または原生生物タンパク質である。

【0033】

少なくとも1つの第2のタンパク質（“担体”）は、上述の起源のあらゆるものに属し得る。しかし、そのタンパク質自身、およびこれらに対して融合されるかまたは接合される低アレルギー誘発性分子に対する免疫応答を刺激するタンパク質を使用することが、特に好ましい。また、少なくとも1つの第2のタンパク質に対象化される（防御）抗体の形成の誘導に起因して、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質はまた、上記第2のタンパク質およびその起源になる源（例えば、ウイルス、細菌、真菌）に対するワクチンとして、として採用され得る。もちろん、少なくとも1つの第2のタンパク質として、当該技術において公知の担体タンパク質（例えば、KLH）を使用することが可能である。

40

【0034】

本発明に係るウイルスタンパク質は、好ましくはカプシドタンパク質である。

【0035】

ウイルスカプシドタンパク質は、カプシドタンパク質が使用されてヒトが継続的にさらされる場合に、それらが抗ウイルス活性を誘導し、上皮細胞に対するウイルス（例えば、

50

ライノウイルス)の吸着を阻害する抗体の形成を刺激し、Th 1 応答に対する免疫調節性活性を示し、予防的なワクチン接種(ウイルスワクチン接種)に対して適しかつ証明されており、かつ安全であるので、特に適している。

【0036】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、少なくとも1つのヒト病原性ウイルス、好ましくはピコルナウイルス科から得られる。

【0037】

ピコルナウイルス科のウイルスは、好ましくはライノウイルス属、好ましくはライノウイルス種、特にヒトライノウイルス89および14に属す。カプシドタンパク質は、VP1、VP2、VP3および/またはVP4で有り得る。

10

【0038】

ウイルスカプシドタンパク質に対して融合されるアレルゲンは、主要なカンバ花粉アレルゲン、特にBet v 1およびBet v 4；主要なオオアワガエリ花粉アレルゲン、特にPhl p 1、Phl p 2、Phl p 5、Phl p 6およびPhl p 7；主要なイエダニアレルゲン、特にDer p 1およびDer p 2；主要なネコアレルゲン、特にFel d 1；主要なミツバチアレルゲン；主要なスズメバチアレルゲン；プロフィリン、特にPhl p 12；ならびに貯蔵庫ダニ、特にLep d 2からなる群から好ましく選択される。

【0039】

本発明に従って使用されるべき他の適したアレルゲンは、以下の表から得られ得る。

20

【0040】

【表 1】

種の名 称	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルゲン						
アンブrosia アルテシイフォリア (Ambrosia artemisiifolia)						
ブタクサ						
	Amb a 1	抗原 E	8	C	8, 20	10
	Amb a 2	抗原 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	
アンブrosia トウリフイダ (Ambrosia trifida)						
オオブタクサ						
	Amb t 5	Ra5G	4.4	C	9, 10, 27	
アルテシイ vulgaris (Artemisia vulgaris)						
ヨモギ						
	Art v 1		27-29	C	28	20
	Art v 2		35	P	28A	
	Art v 3	脂質転移タンパク質	12	P	53	
	Art v 4	プロフィリン	14	C	29	
ヘリアントゥス アヌヌス (Helianthus annuus)						
ヒマワリ						
	Hel a 1		34		29A	
	Hel a 2	プロフィリン	15.7	C	Y15210	
メルクリアリス アヌヌア (Mercurialis annua)						
	Mer a 1	プロフィリン	14-15	C	Y13271	30
カリオフィラレス (Caryophyllales)						
ケノポディウム アルブム (Chenopodium album)						
シロザ、アカザ						
	Che a 1		17	C	AY049012, 29B	
シロアカザ (white goosefoot)						
	Che a 2	プロフィリン	14	C	AY082337	
	Che a 3	ホルカルシン	10	C	AY082338	
サルソラ カリ (Salsola kali)						
ノハラヒジキ						
	Sal k 1		43	P	29C	40

【 0 0 4 1 】

【表 2】

種の名	アレルゲンの名	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルゲン						
ロサレス(Rosales)						
フムルス ヤボニクス(Humulus japonicus)						
かナムグ						
	Hum j 4w		C		AY335187	10
パリエタリア ユダヤ(Parietaria judaica)						
	Par j 1	脂質転移タンパク質1	15	C	イソアレルゲンの一覧を参照のこと	
	Par j 2	脂質転移タンパク質2		C	イソアレルゲンの一覧を参照のこと	
	Par j 3	プロフィリン		C	イソアレルゲンの一覧を参照のこと	
パリエタリア オフィキナリス(Parietaria officinalis)						
	Par o 1	脂質転移タンパク質	15		29D	20
B. 草本						
ポアレス(Poales)						
シドン ダクティロン(Cynodon dactylon)						
ハミューダグ						
	Cyn d 1		32	C	30, S83343	
	Cyn d 7			C	31, X91256	
	Cyn d 12	プロフィリン	14	C	31a, Y08390	
	Cyn d 15		9	C	AF517686	
	Cyn d 22w	エノラーゼ		データ未決		30
	Cyn d 23	Cyn d 14	9	C	AF517685	
	Cyn d 24	病原性関連タンパク質	21	P	未決	
ダクティリス グロメラタ(Dactylis glomerata)						
カモカヤ						
	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	
フェストウカ パラテンシス(Festuca pratensis)						
ヒロハウシノケグサ						
	Fes p 4w		60	-		40
ホルクス ラナトウス(Holcus lanatus)						
ビロードシバ(velvet grass)						
	Hol l 1			C	Z27084	
ロリウム ペレンネ(Lolium perenne)						
ドクムキ						
	Lol p 1	グループ I	27	C	35, 36	
	Lol p 2	グループ II	11	P	37, 37A, X733	
	Lol p 3	グループ III	11	P	38	

【表3】

種の名義	アレルゲンの名義	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	Lol p 5	Lol p IX, Lol p Ib	31/35	C	34, 39	
	Lol p 11 hom:	トリプシン阻害剤相同物	16		39A	
ファラリス アクアティカ(Phalaris aquatica)						
カナリヤクサヨシ						
	Pha a 1			C	40, S80654	10
フレウム プラテンセ(Phleum pratense)						
オオアワガエリ	Phl p 1		27	C	X78813	
	Phl p 2			C	X75925, 41	
	Phl p 4			P	41A	
	Phl p 5	Ag25	32	C	42	
	Phl p 6			C	Z27082, 43	
	Phl p 11	トリプシン阻害剤相同物	20	C	AF521563, 43A	
	Phl p 12	プロフィリン		C	X77583, 44	
	Phl p 13	ホリガラクツロナーゼ	55-60	C	AJ238848	
ホア プラテンシス(Poa pratensis)						
ナガハグサ						
	Poa p 1	グループ I	33	P	46	
	Poa p 5		31/34	C	34, 47	
ソルゲム ハレペンセ(Sorghum halepense)						
セイバンモロコシ						
	Sor h 1			C	48	
C. 木本						
アレカレス(Arecales)						
フィニックス ダクティリフェラ(Phoenix dactylifera)						
ナツメヤシ						
	Pho d 2	プロフィリン	14.3	C	Asturias p.c.	
ファガレス(Fagales)						
アルヌス グルティノーザ(Alnus glutinosa)						
ハンノキ						
	Aln g 1		17	C	S50892	
アルヌス ヘルコーザ(Alnus verrucosa)						
カンバ	Bet v 1		17	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	40
	Bet v 2	プロフィリン	15	C	M65179	
	Bet v 3			C	X79267	
	Bet v 4		8	C	X87153, S54819	
	Bet v 6	イソフラボン還元酵素相同物	33.5	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Bet v 7	シクロフィリン	18	P	R81531	

【表4】

種の名	アレルゲンの名	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルゲン						
カルピナス ベトウルス (Carpinus betulus)						
シテ	Car b 1		17	C	イアレルゲンの一覧を 参照のこと	10
カスターニア サティバ (Castanea sativa)						
クリ	Cas s 1		22	P	52	
	Cas s 5 キチナーゼ					
	Cas s 8 脂質転移タンパク質		9.7	P	53	
コリルス アベラーナ (Corylus avellana)						
ハシバミ	Cor a 1		17	C	イアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Cor a 2 プロフィリン		14	C		
	Cor a 8 脂質転移タンパク質		9	C		
	Cor a 9 11S グロブリン様タンパク質		40/?	C	Beyer p.c.	20
	Cor a 10 管腔結合タンパク質		70	C	AJ295617	
	Cor a 11 7S ヒシリン様タンパク質		48	C	AF441864	
クエルクス アルバ (Quercus alba)						
かし	Que a 1		17	P	54	
ラミアレス (Lamiales)						
オレアケアエ (Oleaceae)						
フラクシナス エクセルシオ (Fraxinus excelsior)						30
トリネコ	Fra e 1		20	P	58A, AF526295	
リグストルム ブルガレ (Ligustrum vulgare)						
イホタノキ	Lig v 1		20	P	58A	
オレア エウロペア (Olea europea)						
オリーブ	Ole e 1		16	C	59, 60	
	Ole e 2 プロフィリン		15-18	C	60A	
	Ole e 3		9.2		60B	
	Ole e 4		32	P	P80741	
	Ole e 5	超酸化物不均化酵素	16	P	P80740	
	Ole e 6		10	C	60C, U86342	40
	Ole e 7		?	P	60D, P81430	
	Ole e 8	Ca ²⁺ 結合タンパク質	21	C	60E, AF078679	
	Ole e 9	ペクター-1,3-グルカナーゼ	46	C	AF249675	
	Ole e 10 グリコシルヒドロラーゼ相同物		11	C	60F, AY082335	
シリンガ ブルガリス (Syringa vulgaris)						
ライラック	Syr v 1		20	P	58A	
プランタギナケアエ (Plantaginaceae)						

【表5】

種の名	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルゲン						
プランタゴ ランケオラタ(Plantago lanceolata)						
ヘラオハコ	Pla l 1		18	P	P842242	10
ピナレス(Pinales)						
クリプトメリア ヤホニカ(Cryptomeria japonica)						
スキ	Cry j 1		41-45	C	55, 56	
	Cry j 2			C	57, D29772	
クプレス アリソニカ(Cupressus arisonica)						
ヌマスギ	Cup a 1		43	C	A1243570	
クプレス センペルビレンス(Cupressus sempervirens)						
通常のトスキ	Cup s 1		43	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	20
	Cup s 3w		34	C	整理番号未決	
ユニベルス アシエイ(Juniperus ashei)						
マウンテンセダール(mountain cedar)	Jun a 1		43	P	P81294	
	Jun a 2			C	57A, AJ404653	
	Jun a 3		30	P	57B, P81295	
ユニベルス オキシケトルス(Juniperus oxycedrus)						
プリックリージュニパー(prickly juniper)	Jun o 4 hom: カルモシユリン相同物		29	C	57C, AF031471	30
ユニベルス サビノイデス(Juniperus sabinoides)						
マウンテンセダール	Jun s 1		50	P	58	
ユニベルス ビルギニアナ(Juniperus virginiana)						
イースタンレット(eastern red)	Jun v 1		43	P	P81825, 58B	
プラタナケアエ(Platanaceae)						
プラタナス アケリフォルア(Platanus acerifolia)						40
プラタナス	Pla a 1		18	P	P82817	
	Pla a 2		43	P	P82967	
	Pla a 3 脂質転移タンパク質		10	P	Iris p.c.	

【0045】

【表 6】

アレルギー

種の名	アレルギーの名	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
D. ダニ						
アカルス シロアルトウホトット(Acarus siro arthropod)						
ダニ	Aca s 13	脂肪酸結合タンパク質	14*	C	AJ006774	
ブロミア トロピカリス(Blomia tropicalis)						
ダニ	Blo t 1	システインプロテアーゼ	39	C	AF277840	10
	Blo t 3	トリプシン	24*	C	Cheong p.c.	
	Blo t 4	アルファアミラーゼ	56	C	Cheong p.c.	
	Blo t 5			C	U59102	
	Blo t 6	キモトリプシン	25	C	Cheong p.c.	
	Blo t 10	トロホミオン	33	C	61	
	Blo t 11	パラミオン	110	C	AF525465, 61A	
	Blo t 12	Bt11a		C	U27479	
	Blo t 13	Bt6、脂肪酸結合タンパク質		C	U58106	
	Blo t 19	抗菌ペプチド相同物	7.2	C	Cheong p.c.	
デルマトファゴイデス フアリナエ(Dermatophagoides farinae)						
コナヒョウダニ						
	Der f 1	システインプロテアーゼ	25	C	69	
	Der f 2		14	C	70,70A,イソアレルギーの一覧を参照のこと	
	Der f 3	トリプシン	30	C	63	
	Der f 7		24-31	C	SW:Q26456, 71	
	Der f 10	トロホミオン		C	72	
	Der f 11	パラミオン	98	C	72A	
	Der f 14	mag3、アホリホフォリン		C	D17686	
	Der f 15	98k キチナーゼ	98	C	AF178772	30
	Der f 16	ケルモリン/ヒリン	53	C	71A	
	Der f 17	Ca結合EFタンパク質	53	C	71A	
	Der f 18w	60k キチナーゼ	60	C	Weber p.c.	
デルマトファゴイデス ミクロケラス(Dermatophagoides microceras)						
イエダニ						
	Der m 1	システインプロテアーゼ	25	P	68	
デルマトファゴイデス プテロニッシヌス(Dermatophagoides pteronyssinus)						
ヤケヒョウダニ						
	Der p 1	抗原P1、システインプロテアーゼ	25	C	62,イソアレルギーの一覧を参照のこと	40
	Der p 2		14	C	62A-C,イソアレルギーの一覧を参照のこと	
	Der p 3	トリプシン	28/30	C	63	
	Der p 4	アミラーゼ	60	P	64	
	Der p 5		14	C	65	

【表 7】

種の名 称	アレルギーの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルギー						
	Der p 6	キモトリプシン	25	P	66	
	Der p 7		22/28	C	67	
	Der p 8	グルタチオントランスフェラーゼ		C	67A	
	Der p 9	コラーゲン分解性セリンタンパク質		P	67B	
	Der p 10	トロポミオシン	36	C	Y14906	10
	Der p 14	アホリホフォリン様タンパク質		C	Epton p.c.	
イウログリフス マイネイ (Euroglyphus maynei)						
タニ	Eur m 2			C	イソアレルギーの 一覧を参照のこと	
	Eur m 14	アホリホフォリン	177	C	AF149827	
グリシファガス ドメスティクス (Glycyphagus domestics)						
貯蔵庫タニ	Gly d 2			C	72B, イソアレルギーの 一覧を参照のこと	20
レピドグリフス デストウルクトール (Lepidoglyphus destructor)						
貯蔵庫タニ	Lep d 2	Lep d 1	15	C	73, 74, 74A, イソアレルギーの 一覧を参照のこと	
	Lep d 5			C	75, AJ250278	
	Lep d 7			C	75, AJ271058	
	Lep d 10	トロポミオシン		C	75A, AJ250096	
	Lep d 13			C	75, AJ250279	
ティロファガス プトレンエンティアエ (Tyrophagus putrescentias)						
貯蔵庫タニ	Tyr p 2			C	75B, Y12690	30
E. 動物						
ホストメスティクス (Bos domestics)						
ウシ	Bos d 2	Ag3、リホカリン	20	C	76, イソアレルギーの 一覧を参照のこと	
	Bos d 3	Ca結合 S100相同物	11	C	L39834	40
	Bos d 4	アルファラクトアルブミン	14.2	C	M18780	
	Bos d 5	ベータラクトアルブミン	18.3	C	X14712	
	Bos d 6	血清アルブミン	67	C	M73993	
	Bos d 7	免疫グロブリン	160		77	
	Bos d 8	カゼイン	20-30		77	
カニス ファミリアリス (Canis familiaris)						
(カニストメスティクス (Canis domesticus))						
	Can f 1		25	C	78, 79	

【表 8】

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C) または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
イヌ	Can f 2		27	C	78, 79	
	Can f 3	アルブミン		C	S72946	
	Can f 4		18	P	A59491	
イクウス カバルス(Equus caballus)						10
ウマ						
	Equ c 1	リホカリン	25	C	U70823	
	Equ c 2	リホカリン	18.5	P	79A, 79B	
	Equ c 3	Ag3-アルブミン	67	C	79C, X74045	
	Equ c 4		17	P	79D	
	Equ c 5	AgX	17	P	Goubran Botros p.c.	
フェリス ドメスティクス(Felis domesticus)						
ネコ(唾液)						
	Fel d 1	cat-1	38	C	15	
	Fel d 2	アルブミン		C	79E, X84842	20
	Fel d 3	シスタチン	11	C	79F, AF238996	
	Fel d 4	リホカリン	22	C	AY497902	
	Fel d 5w	免疫グロブリン A	400		Adedoyin p.c.	
	Fel d 6w	免疫グロブリン M				
800-						
1000						
	Adedoyin p.c.					
	Fel d 7w	免疫グロブリン G	150		Adedoyin p.c.	30
カビア プロセルス(Cavia porcellus)						
テンジクネズミ						
	Cav p 1	リホカリン相同物	20	P	SW:P83507, 80	
	Cav p 2		17	P	SW:P83508	
ムス ムスクルス(Mus musculus)						
ハツカネズミ(尿)						
	Mus m 1	MUP	19	C	81, 81A	
ラトウス ノルベギウス(Rattus norvegicus)						
クマネズミ(尿)						
	Rat n 1		17	C	82, 83	40
F. 菌類(カビ)						
1. アスコミコタ(Ascomycota)						
1. 1 ドチデアレス(Dothideales)						
アルテルナリア アルテルナタ(Alternaria alternata)						

【表9】

アレルゲン

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	Alt a 1		28	C	U82633	
	Alt a 2		25	C	83A, U62442	
	Alt a 3	熱ショックタンパク質	70	C	U87807, U87808	
	Alt a 4	ジスルフィドイソメラーゼタンパク質	57	C	X84217	10
	Alt a 6	酸性リボソームタンパク質 P2	11	C	X78222, U87806	
	Alt a 7	YCP4 タンパク質	22	C	X78225	
	Alt a 10	アルテヒトデヒトロゲナーゼ	53	C	X78227, P42041	
	Alt a 11	インナーゼ	45	C	U82437	
	Alt a 12	酸性リボソームタンパク質 P1	11	C	X84216	
	クラトスポリウム ヘルバルム (Cladosporium herbarum)					
	Cla h 1		13		83B, 83C	
	Cla h 2		23		83B, 83C	
	Cla h 3	アルテヒトデヒトロゲナーゼ	53	C	X78228	
	Cla h 4	酸性リボソームタンパク質 P2	11	C	X78223	20
	Cla h 5	YCP4 タンパク質	22	C	X78224	
	Cla h 6	インナーゼ	46	C	X78226	
	Cla h 12	酸性リボソームタンパク質 P1	11	C	X85180	
	1. 2 イウロテイアレス (Eurotiales)					
	アスペルギルス フラブス (Aspergillus flavus)					
	Asp fl 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ	34		84	
	アスペルギルス フミガトウス (Aspergillus fumigatus)					
	Asp f 1		18	C	M83781, S39330	
	Asp f 2		37	C	U56938	
	Asp f 3	ヘルオキシゾームタンパク質	19	C	U20722	30
	Asp f 4		30	C	AJ001732	
	Asp f 5	金属プロテアーゼ	40	C	Z30424	
	Asp f 6	Mn超酸化物不均化酵素	26.5	C	U53561	
	Asp f 7		12	C	AJ223315	
	Asp f 8	リボソームタンパク質 P2	11	C	AJ224333	
	Asp f 9		34	C	AJ223327	
	Asp f 10	アスパラキシン酸プロテアーゼ	34	C	X85092	
	Asp f 11	ペプチジルプロリルイソメラーゼ	24		84A	
	Asp f 12	熱ショックタンパク質 P90	90	C	85	40
	Asp f 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ	34		84B	
	Asp f 15		16	C	AJ002026	
	Asp f 16		43	C	g3643813	
	Asp f 17			C	AJ224865	
	Asp f 18	液胞セリンプロテアーゼ	34		84C	
	Asp f 22w	インナーゼ	46	C	AF284645	
	Asp f 23	L3 リボソームタンパク質	44	C	85A, AF464911	

【表 10】

アレルゲン

種の種類	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アスペルギルス ニゲル(Aspergillus niger)						
	Asp n 14	ペーターキシロシダーゼ*	105	C	AF108944	
	Asp n 18	液胞セリンプロテアーゼ*	34	C	84B	
	Asp n 25	3-フィターゼ* B	66-100	C	85B, P34754	
	Asp n ?		85	C	Z84377	10
アスペルギルス オリザエ(Aspergillus oryzae)						
	Asp o 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ*	34	C	X17561	
	Asp o 21	TAKA-アミラーゼ* A	53	C	D00434, M33218	
ペニシリウム ブレヴィコンパクトゥム(Penicillium brevicompactum)						
	Pen b 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ*	33		86A	
ペニシリウム クリソゲナム(Penicillium chrysogenum) (以前は、P. ノタゥム(notatum))						
	Pen ch 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ*	34		87	
	Pen ch 18	液胞セリンプロテアーゼ*	32		87	20
	Pen ch 20	N-アセチルグルコサミニダーゼ*	68		87A	
ペニシリウム シトリナム(Penicillium citrinum)						
	Pen c 3	ペルオキシゾーム膜タンパク質	18		86B	
	Pen c 13	アルカリ性セリンプロテアーゼ*	33		86A	
	Pen c 19	熱ショックタンパク質 P70	70	C	U64207	
	Pen c 22w	Iノラーゼ*	46	C	AF254643	
	Pen c 24	延長因子1 ペータ		C	AY363911	
ペニシリウム オキサリクム(Penicillium oxalicum)						
	Pen o 18	液胞セリンプロテアーゼ*	34		87B	30
1. 3 ヒポクレアレス(Hypocreales)						
フサリウム クルモルム(Fusarium culmorum)						
	Fus c 1	リボソームタンパク質 P2	11*	C	AY077706	
	Fus c 2	チオレドキシシン様タンパク質	13*	C	AY077707	
1. 4 オニゲナレス(Onygenales)						
トリコフイトン ルブルム(trichophyton rubrum)						
	Tri r 2			C	88	40
	Tri r 4	セリンプロテアーゼ*		C	88	
トリコフイトン トンスランス(tricophyton tonsurans)						
	Tri t 1		30	P	88A	
	Tri t 4	セリンプロテアーゼ*	83	C	88	

【 0 0 5 0 】

【表 1 1】

アレルゲン

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
1. 5 サッカロミセタレス (saccharomycetales)						
カンディダ アルビカンス (candida albicans)						
	Cand a 1		40	C	89	
	Cand a 3	ペルオキシゾームタンパク質	29	C	AY136739	10
カンディダ ボイディニイ (candida boidinii)						
	Cand b 2		20	C	J04984, J04985	
2. バンディオミコティナ (Basidiomycotina)						
ヒメノミセテス (Hymenomycetes)						
シロシベ クハンス (Psilocybe cubentes)						
	Psi c 1					
	Psi c 2	シクリフィリン	16		89A	
コプリヌス コマトゥス (Coprinus comatus)						20
シャギーキャップ (shaggy cap)						
	Cop c 1	ロイソソングリタンパク質	11	C	AJ132235	
	Cop c 2				AJ242791	
	Cop c 3				AJ242792	
	Cop c 5				AJ242793	
	Cop c 7				AJ242794	
2. 2 ウレディニオミセテス (Urediniomycetes)						
ロートトルラ ムキラキノザ (Rhodotorula mucilaginosa)						
	Rho m 1	モノラーゼ	47	C	89B	30
	Rho m 2	液胞セリンプロテアーゼ	31	C	AY547285	
2. 3 ウステイラギノミセテス (Ustilaginomycetes)						
マラセツィア フルフル (malassezia furfur)						
	Mala f 2	MF1、ペルオキシゾーム膜タンパク質	21	C	AB011804, 90	
	Mala f 3	MF2、ペルオキシゾーム膜タンパク質	20	C	AB011805, 90	
	Mala f 4	ミトコンドリアリニコ酸テヒトロゲナーゼ	35	C	AF084828, 90A	40
マラセツィア シンポディアルリス (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	

【表 1 2】

アレルゲン

種の名称	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	MaLa s 8		19*	C	AJ011958, 91A	
	MaLa s 9		37*	C	AJ011959, 91A	
	MaLa s 10	熱ショックタンパク質 70	86	C	AJ428052	
	MaLa s 11	Mn超酸化物不均化酵素	23	C	AJ548421	10
3. デウテロミコチナ(Deuteromycotina)						
3. 1 ツベルクラリアレス(Tuberculariales)						
エピコクム プルプラシエンス(Epicoccum purpurascens)						
(以前は、E. ニグラム(nigrum))						
	Epi p 1	セリンプロテアーゼ	30	P	SW:P83340, 91B	
G. 昆虫						
アエデス アエキプティイ(Aedes aegyptii)						
カ						
	Aed a 1	アピラーゼ	68	C	L12389	20
	Aed a 2		37	C	M33157	
アピス メリフェラ(Apis mellifera)						
ミツバチ						
	Api m 1	ホスホリパーゼ A2	16	C	92	
	Api m 2	ヒアルロニダーゼ	44	C	93	
	Api m 4	メリチン	3	C	94	
	Api m 6		7-8	P	Kettner p.c.	
	Api m 7	CUB セリンプロテアーゼ	39	C	AY127579	
ボンブス ペンシルバニクス(Bombus pennsylvanicus)						
マルハナバチ						
	Bom p 1	ホスホリパーゼ	16	P	95	
	Bom p 4	プロテアーゼ		P	95	
ブラッテラ ケルマニカ(Blattella germanica)						
チャハネゴキブリ						
	Bla g 1	Bd90k		C		
	Bla g 2	アスパラキシン酸プロテアーゼ	36	C	96	
	Bla g 4	カリシン	21	C	97	
	Bla g 5	グルタチオントランスフェラーゼ	22	C	98	
	Bla g 6	トロホニン C	27	C	98	40
ペリプラネタ アメリカーナ(Periplaneta americana)						
ワモンゴキブリ						
	Per a 1	Cr-PII		C		
	Per a 3	Cr-PI	72-78	C	98A	
	Per a 7	トロホミオン	37	C	Y14854	
キロムス キエンシス(Chironomus kiiensis)						

【表 1 3】

アレルギー

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号
ミジ キロノムス トウミ トウミ (Chironomus thummi thummi)	Chi k 10	トロホミオシン	32.5*	C	AJ012184
ミジ	Chi t 1-9	ヘモグロビン	16	C	99
	Chi t 1.01	コンポネン ト III	16	C	P02229
	Chi t 1.02	コンポネン ト IV	16	C	P02230
	Chi t 2.0101	コンポネン ト I	16	C	P02221
	Chi t 2.0102	コンポネン ト IA	16	C	P02221
	Chi t 3	コンポネン ト II-ヘー タ	16	C	P02222
	Chi t 4	コンポネン ト IIIA	16	C	P02231
	Chi t 5	コンポネン ト VI	16	C	P02224
	Chi t 6.01	コンポネン ト VIIA	16	C	P02226
	Chi t 6.02	コンポネン ト IX	16	C	P02223
	Chi t 7	コンポネン ト VIIIB	16	C	P02225
	Chi t 8	コンポネン ト VIII	16	C	P02227
	Chi t 9	コンポネン ト X	16	C	P02228
クテノセファリデス フェリス フェリス (Ctenocephalides felis felis) ネコミ	Cte f 1				
	Cte f 2	M1b	27	C	AF231352
	Cte f 3		25	C	
タウメトポエア ピティコカンパ (Thaumetopoea pityocampa) ハインプロセシヨナリーモス (pine processionary moth)	Tha p 1		15	P	PIR:A59396, 99A
レプシマ サツカリナ (Lpsima saccharina) シミ	Lep s 1	トロホミオシン	36	C	AJ309202
ドリコヘスプラ マクラタ (Dolichovespula maculata) クマンハチ	Dol m 1	ホスホリパーゼ A1	35	C	100
	Dol m 2	ヒアルロニターゼ	44	C	101
	Dol m 5	抗原 5	23	C	102, 103
ドリコヘスプラ アレナリア (Dolichovespula arenaria) キロススマハチ	Dol a 5	抗原 5	23	C	104
ポリステス アンヌラリエス (Polistes annularies) ススマハチ (wasp)	Pol a 1	ホスホリパーゼ A1	35	P	105
	Pol a 2	ヒアルロニターゼ	44	P	105
	Pol a 5	抗原 5	23	C	104
ポリステス ドミヌルス (Polistes dominurus) 地中海ススマハチ					

【表 1 4】

種の名 称	アレルゲ ンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	Pol d 1				Hoffman p.c.	
	Pol d 4	セリンプロテアーゼ	32-34	C	Hoffman p.c.	
	Pol d 5				P81656	
ホリステス エクスクラマンズ (Polistes exclamans)						10
スズメバチ (wasp)	Pol e 1	ホスホリパーゼ A1	34	P	107	
	Pol e 5	抗原 5	23	C	104	
ホリステス フスカトウス (Polistes fuscatus)						
スズメバチ (wasp)	Pol f 5	抗原 5	23	C	106	
ホリステス ガリクス (Polistes gallicus)						
スズメバチ (wasp)	Pol g 5	抗原 5	24	C	P83377	
ホリステス メトリクス (Polistes metricus)						
スズメバチ (wasp)	Pol m 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスバ クラボ (Vespa crabo)						
コカダスズメバチ						20
	Vesp c 1	ホスホリパーゼ	34	P	107	
	Vesp c 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスバ マンダリナ (Vespa mandarina)						
オオスズメバチ						
	Vesp m 1				Hoffman p.c.	
	Vesp m 5				P81657	
ヘスプラ フラホピローザ (Vespula fulvopilosa)						
スズメバチ (yellow jacket)	Ves f 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスプラ ゲルマニカ (Vespula germanica)						
スズメバチ (yellow jacket)	Ves g 5	抗原 5	23	C	106	30
ヘスプラ マクリフロンス (Vespula maculifrons)						
スズメバチ (yellow jacket)						
	Ves m 1	ホスホリパーゼ A1	33.5	C	108	
	Ves m 2	ヒアルロニダーゼ	44	P	109	
	Ves m 5	抗原 5	23	C	104	
ヘスプラ ペンシルバニカ (Vespula pennsylvanica)						
スズメバチ (yellow jacket)						
	Ves p 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスプラ スクアモサ (Vespula squamosa)						
ナカスズメバチ (yellow jacket)						40
	Ves s 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスプラ ビドゥア (Vespa vidua)						
スズメバチ (wasp)	Ves vi 5	抗原 5	23	C	106	
ヘスプラ ヴルガリス (Vespula vulgaris)						
スズメバチ (yellow jacket)						
	Ves v 1	ホスホリパーゼ A1	35	C	105A	

【 0 0 5 4 】

【表 15】

アレルゲン

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧 称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	Ves v 2	ヒアルロニターゼ*	44	P	105A	
	Ves v 5	抗原 5	23	C	104	
ミルメキア ピロストラ(myrmecia pilosula)						
オーストラリアジャンパーアント(Australian jumper ant)						
	Myr p 1			C	X70256	10
	Myr p 2			C	S81785	
ソレノプシス ゲミナータ(Splenopsis geminata)						
ネッタヒアリ						
	Sol g 2				Hoffman p.c.	
	Sol g 4				Hoffman p.c.	
ソレノプシス インビクタ(Solenopsis invicta)						
ヒアリ	Sol i 2		13	C	110, 111	
	Sol i 3			24	C	110
	Sol i 4			13	C	110
ソレノプシス サエビジマ(Solenopsis saevissima)						
ブラジルヒアリ						
	Sol s 2				Hoffman p.c.	20
トリアトマ プロトラクタ(Triatoma protracta)						
カリフォルニアオオトビサシガネ						
	Tria p 1	プロカリン	20	C	AF179004, 111A.	
H. 食物						
ガドウス カリアス(Gadus callarias)						
タラ	Gad c 1	抗原 M	12	C	112, 113	30
サルモ サラル(Salmo salar)						
太平洋サケ						
	Sal s 1	ハルブアルブミン	12	C	X97824	
ボストメスティクス(Bos domesticus)						
ウン						
	Bos d 4	アルファラクトアルブミン	14.2	C	M18780	
(牛乳)	Bos d 5	ベータラクトグロブリン	18.3	C	X14712	
動物もまた参照のこと						
	Bos d 6	血清アルブミン	67	C	M73993	40
	Bos d 7	免疫グロブリン	160		77	
	Bos d 8	カゼイン	20-30		77	
シプリヌス カプリオ(Syprinus caprio)						
(通常のコイ)						
	Cyp c 1	ハルブアルブミン	12	C	129	
ガルスドメスティクス(Gallus domesticus)						
ニワトリ						
	Gal d 1	オボムコイト*	28	C	114, 115	

【表 16】

アレルゲン

種の名称	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
	Gal d 2	オブアルブミン	44	C	114, 115	
	Gal d 3	Ag22、混アルブミン	78	C	114, 115	
	Gal d 4	リゾチーム	14	C	114, 115	
	Gal d 5	血清アルブミン	69	C	X60688	10
メタペナエウス インシス (Metapenaeus ensis)						
エビ	Met e 1	トロホミオシン		C	U08008	
ペナエウス アステクス (penaeus aztecus)						
エビ	Pen a 1	トロホミオシン	36	P	116	
ペナエウス インディクス (Penaeus indicus)						
エビ	Pen i 1	トロホミオシン	34	C	116A	
ペナエウス モドン (Penaeus monodon)						
ブラックタイガーエビ						
	Pen m 1	トロホミオシン	38	C		
	Pen m 2	アルキニンキナーゼ	40	C	AF479772, 117	20
トドロデス パチフィクス (Todarodes pacificus)						
イカ	Tod p 1	トロホミオシン	38	P	117A	
ヘリクス アスペルザ (Helix aspersa)						
ブラウンガーデンズナイル (brown garden snail)						
	Hel as 1	トロホミオシン	36	C	Y14855, 117B	
ハリオティス ミダエ (Haliotis midae)						
アワビ	Hal m 1		49		117C	
ラナ エスクレンタ (Rana esculenta)						
食用ガエル						
	Ran e 1	パルプアルブミン アルファ	11.9*	C	AJ315959	
	Ran e 2	パルプアルブミン ベータ	11.7*	C	AJ414730	
ブラッシカ ユンカエ (Brassica juncae)						
カラシナ						
	Bra j 1	2S アルブミン	14	C	118	
ブラッシカ ナプス (Brassica napus)						
アブラナ						
	Bra n 1	2S アルブミン	15	P	118A, P80208	
ブラッシカ ラパ (Brassica rapa)						
かぶ	Bra r 2	フロヘベイン相同物	25		P81729	40
ホルデウム ヴルガレ (Hordeum vulgare)						
オオムギ	Hor v 15	BMAI-1	15	C	119	
	Hor v 16	アルファ-アミラーゼ				
	Hor v 17	ベータ-アミラーゼ				
	Hor v 21	ガンマー-3 ホルテイン	34	C	119A,	

【表 17】

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
SW:P80198						
セカレ セレアレ(Secale cereale)						
ライムキ	Sec c 20	セカリン			イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
トウリテイクム アエステイブム(triticum aestivum)						
コムキ	Tri a 18	アグルチニン				10
	Tri a 19	オメガ-5 グリアジン	65	P	PIR:A59156	
ゼア マイス(Zea mays)						
トウモロコシ、トウキビ						
	Zea m 14	脂質転移タンパク質	9	P	P19656	
オリザ サティバ(Oryza sativa)						
コメ	Ory s 1			C	119B, U31771	
アピウム グラベオレンス(Apium graveolens)						
セロリ	Api g 1	Bet v 1相同物	16*	C	Z48967	
	Api g 4	プロフィリン			AF129423	
	Api g 5		55/58	P	P81943	20
ダウクス カクタ(Daucus carota)						
ニンジン	Dau c 1	Bet v 1相同物	16	C	117D、イソアレルゲンの 一覧を参照のこと	
	Dau c 4	プロフィリン		C	AF456482	
コリルス アベラーナ(Corylus avellana)						
ハシバミ						
	Cor a 1.04	Bet v 1相同物	17	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Cor a 2	プロフィリン	14	C	AF327622	
	Cor a 8	脂質転移タンパク質	9	C	AF329829	30
マルス ドメスティカ(Malus domestica)						
リンゴ	Mal d 1	Bet v 1相同物		C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Mal d 2	タウマチン相同物		C	AJ243427	
	Mal d 3	脂質転移タンパク質	9	C	Pastorello p.c.	
	Mal d 4	プロフィリン	14.4*	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
ピルス コムニス(Pyrus communis)						
セイヨウナシ	Pyr c 1	Bet v 1相同物	18	C	AF05730	
	Pyr c 4	プロフィリン	14	C	AF129424	40
	Pyr c 5	イソフラボン還元酵素相同物	33.5	C	AF071477	
ペルセア アメリカーナ(Persea americana)						
アボカド	Pers a 1	イントキチナーゼ	32	C	Z78202	
プルナス アルメニアカ(Prunus americana)						
アンズ						
	Pru ar 1	Bet v 1相同物		C	U93165	
	Pru ar 3	脂質転移タンパク質	9	P		

【表 18】

アレルゲン

種の名称	アレルゲンの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
プルナス アビウム(Prunus avium)						
セイヨウミザクラ						
	Pru av 1	Bet v 1相同物		C	U66076	
	Pru av 2	タウマチン相同物		C	U32440	
	Pru av 3	脂質転移タンパク質	10	C	AF221501	10
	Pru av 4	プロフィリン	15	C	AF129425	
プルナス ドメステイカ(Prunus domestica)						
ヨーロッパスモモ						
	Pru d 3	脂質転移タンパク質	9	P	119C	
プルナス ペルシカ(Prunus persica)						
モモ	Pru p 3	脂質転移タンパク質	10	P	P81402	
	Pru p 4	プロフィリン	14	C	イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
アスパラガス オフィキナリス(Asparagus officinalis)						
アスパラカス						
	Aspa o 1	脂質転移タンパク質	9	P	119D	20
クロコス サティバス(Crocus sativus)						
サフラン		Cro s 1	21		Varasteh A-R p.c.	
ラクトゥカ サティバ(Lactuca sativa)						
レタス						
	Lac s 1	脂質転移タンパク質	9		Vieths p.c.	
ビティス ビニフェラ(Vitis vinifera)						
ブドウ	Vit v 1	脂質転移タンパク質	9	P	P80274	
ムサ x パラディシアカ(Musa x paradisiaca)						
バナナ	Mus xp 1	プロフィリン	15	C	AF377948	30
アナナス コモス(Ananas comosus)						
パイナップル						
	Ana c 1	プロフィリン	15	C	AF377949	
	Ana c 2	プロメライン	22.8*	C	119E-G, D14059	
シトウルス リモン(Citrus limon)						
レモン	Cit l 3	脂質転移タンパク質	9	P	Torrejon p.c.	
シトウルス シネンシス(Citrus sinensis)						
スウィートオレンジ						
	Cit s 1	ゲルミン様タンパク質	23	P	Torrejon p.c.	
	Cit s 2	プロフィリン	14	P	Torrejon p.c.	40
	Cit s 3	脂質転移タンパク質	9	P	Torrejon p.c.	
リトウチ チネンシス(Lituchi chinensis)						
ライチ	Lit c 1	プロフィリン	15	C	AY049013	
シナピス アルバ(Sinapis alba)						
ヨウガラシ						
	Sin a 1	2S アルブミン	14	C	120	

【 0 0 5 8 】

【表 19】

アレルゲン

種の名 称	アレルゲンの名 称	生化学ID または旧称	分子 量		cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
グリシネ マクス (Glycine max)							
ダイズ	Gly m 1	HPS	7	P	120A		
	Gly m 2			8	P	A57106	
	Gly m 3	プロフィリン	14	C		イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	10
	Gly m 4	(SAM22) PR-10 タンパク質	17	C		X60043, 120B	
ビグナ ラディアタ (vigna radiata)							
リョクトウ							
	Vig r 1	PR-10 タンパク質	15	C		AY792956	
アラチス ヒポガエア (Alachis hypogaea)							
ピーナッツ	Ara h 1	ヒシリン	63.5	C		L34402	
	Ara h 2	コングルチン	17	C		L77197	
	Ara h 3	グリシニン	60	C		AF093541	
	Ara h 4	グリシニン	37	C		AF086821	
	Ara h 5	プロフィリン	15	C		AF059616	20
	Ara h 6	コングルチン相同物	15	C		AF092846	
	Ara h 7	コングルチン相同物	15	C		AF091737	
	Ara h 8	PR-10 タンパク質	17	C		AY328088	
レンス クリナリス (Lens culinalis)							
レンズマメ	Len c 1	ヒシリン	47	C		イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Len c 2	種子ビオチン化タンパク質	66	P		120C	
ピスム サビトゥム (Pisum sativum)							
エンドウ	Pis s 1	ヒシリン	44	C		イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	30
	Pis s 2	コンヒシリン	63	C		未決	
アクチニディア チネンシス (Actinidia chinensis)							
キーウイ	Act c 1	システインプロテアーゼ	30	P		P00785	
	Act c 2	タウマチン様タンパク質	24	P		SW:P81370, 121	
カプシカム アンヌウム (Capsicum annum)							
シトウガラシ							
	Cap a 1w	オスモチン様タンパク質	23	C		AJ297410	
	Cap a 2	プロフィリン	14	C		AJ417552	
リコペルシコン エスクレントウム (Lycopersicon esulentum)							
トマト	Lyc e 1	プロフィリン	14	C		AJ417553	40
	Lyc e 2	b-フルクトフラニターゼ	50	C		イソアレルゲンの一覧を 参照のこと	
	Lyc e 3	脂質転移タンパク質	6	C		U81996	
ソラヌム トゥベロスム (Solanum tuberosum)							
ジャガイモ	Sola t 1	パラチン	43	P		P15476	
	Sola t 2	カテプシンD阻害剤	21	P		P16348	
	Sola t 3	システインプロテアーゼ阻害剤	21	P		P20347	
	Sola t 4	アスパラキニン酸プロテアーゼ阻害剤	16+4	P		P30941	
ベルトレティア エクスセルサ (Betholletia excelsa)							

【表 20】

アレルギー

種の名前	アレルギーの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
ブラジルナット						
	Ber e 1	2S アルブミン	9	C	P04403, M17146	
	Ber e 2	11S グロブリン種子貯蔵タンパク質	29	C	AY221641	
ユグランス ニグラ (Juglans nigra)						
クワガミの実						
	Jug n 1	2S アルブミン	19*	C	AY102930	10
	Jug n 2	ヒシリン様タンパク質	56*	C	AY102931	
ユグランス レジア (Juglans regia)						
ブラックウォールナット (black walnut)						
	Jug r 1	2S アルブミン		C	U66866	
	Jug r 2	ヒシリン	44	C	AF066055	
	Jug r 3	脂質転移タンパク質	9	P	Pastorello	
アナカルディウム オキデンタレ (Anacardium occidentale)						
カシュー						
	Ana o 1	ヒシリン様タンパク質	50	C	イソアレルギーの一覧を 参照のこと	20
	Ana o 2	レグミン様タンパク質	55	C	AF453947	
	Ana o 3	2S アルブミン	14	C	AY081853	
リキヌス コムニス (Libcinus communis)						
トウゴマ						
	Ric c 1	2S アルブミン		C	P01089	
セサムム インディウム (Sesamumu indicum)						
ゴマ						
	Ses i 1	2S アルブミン	9	C	121A, AF240005	
	Ses i 2	2S アルブミン	7	C	AF091841	
	Ses i 3	7S ヒシリン様グロブリン	45	C	AF240006	
	Ses i 4	オレオン	17	C	AAG23840	30
	Ses i 5	オレオン	15	C	AAD42942	
クミス メロ (Cucumis melo)						
マスクメロン						
	Cuc m 1	セリンプロテアーゼ	66	C	D32206	
	Cuc m 2	プロフィリン	14	C	AY271295	
	Cuc m 3	病原性関連タンパク質 PR-1	16*	P	P83834	
I. その他						
アニサキス シンプレクス (Anisakis simplex)						
線虫						
	Ani s 1		24	P	121B, A59069	
	Ani s 2	パラミオン	97	C	AF173004	
	Ani s 3	トロホミオン	41	C	121C, Y19221	
	Ani s 4		9	P	P83885	
アルガス レフレクス (Algas reflexus)						

【表 2 1】

種の名 称	アレルギーの名称	生化学ID または旧称	分子量	cDNA(C)または タンパク質(P)	整理番号 または受託番号	
アレルギー						
ハトダイニ	Arg r 1		17	C	AJ697694	
アスカリス スウム(Ascaris suum)	Asc s 1		10	P	122	10
カリカ ハパヤ(Carica papaya)	Car p 3w	ハパイン	23.4*	C	122A, M15203	
デントロネフティア ニッポニカ(dendronephutya nipponica)	Den n 1		53	P	122B	
ソフトコーラル(soft coral)						
ヘベア ブラジリエンシス(Hevea brasiliensis)	Hev b 1	延長因子	58	P	123, 124	
ゴム(天然ゴム)	Hev b 2	1,3-グルクナーゼ	34/36	C	125	
	Hev b 3		24	P	126, 127	20
	Hev b 4	マイクロせん複合体の成分	100- 115	P	128	
	Hev b 5		16	C	U42640	
	Hev b 6.01	ヘイン前駆体	20	C	M36986, p02877	
	Hev b 6.02	ヘイン	5	C	M36986, p02877	
	Hev b 6.03	C-末端断片	14	C	M36986, p02877	
	Hev b 7.01	B-血清由来パラチン相同物	42	C	U80598	
	Hev b 7.02	C-血清由来パラチン相同物	44	C	AJ223038	
	Hev b 8	プロフィリン	14	C	イソアレルギーの一覧を 参照のこと	30
	Hev b 9	I/ラーゼ	51	C	AJ132580	
	Hev b 10	Mn超酸化物不均化酵素	26	C	イソアレルギーの一覧を 参照のこと	
	Hev b 11	クラスI キチナーゼ		C	イソアレルギーの一覧を 参照のこと	
	Hev b 12	脂質転移タンパク質	9.3	C	AY057860	
	Hev b 13	エステラーゼ	42	P	F83269	
ホモ サピエンス(Homo sapiens)						
ヒト自己アレルギー						
	Hom s 1		73*	C	Y14314	40
	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	
トリプロキトン スクレオキシロン(triprochiton scleroxylon)						
オベキ(obeche)	Trip s 1	クラスI キチナーゼ	38.5	P	Kespohl p.c.	

【 0 0 6 1 】

〔 参考文献 〕

1 Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an allergen database. IUIS, B 50

altimore, MD, Edition 1.0.

- 2 Marsh, D. G. et al. 1986. Allergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.
- 3 King, T.P. et al. 1964. Biochemistry 3:458-468.
- 4 Lowenstein, H. 1980. Allergy 35:188-191.
- 5 Aukrust, L. 1980. Allergy 35:206-207.
- 6 Demerec, M. et al. 1966. Genetics 54:61-75.
- 7 Bodmer, J. G. et al. 1991. Immunogenetics 33:301-309.
- 8 Griffith, I.J. et al. 1991. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
- 9 Roebber, M. et al. 1985. J. Immunol. 134:3062-3069.
- 10 Metzler, W. J. et al. 1992. Biochemistry 31:5117-5127. 10
- 11 Metzler, W. J. et al. 1992. Biochemistry 31:8697-8705.
- 12 Goodfriend, L. et al. 1979. Fed. Proc. 38:1415.
- 13 Ekramoddoullah, A. K. M. et al. 1982. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
- 14 Ansari, A. A. et al. 1987. J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
- 15 Morgenstern, J.P. et al. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9690-9694.
- 16 Griffith, I.J. et al. 1992. Gene 113:263-268.
- 17 Weber, A. et al. 1986. Biochem. Physiol. 83B:321-324.
- 18 Weber, A. et al. 1987. Allergy 42:464-470.
- 19 Stanworth, D. R. et al. 1990. Bulletin WHO 68:109-111.
- 20 Rafnar, T. et al. 1991. J. Biol. Chem. 266: 1229-1236. 20
- 21 Rogers, B.L. et al. 1991. J. Immunol. 147:2547-2552.
- 22 Klapper, D.G. et al. 1980. Biochemistry 19:5729-5734.
- 23 Ghosh, B. et al. 1993. J. Immunol. 150:5391-5399.
- 24 Roebber, M. et al. 1983. J. Immunol. 131:706-711.
- 25 Lubahn, B., and D.G. Klapper. 1993. J. Allergy Clin. Immunol. 91:338.
- 26 Roebber, M., and D.G. Marsh. 1991. J. Allergy Clin. Immunol. 87:324.
- 27 Goodfriend L. et al. Mol Immunol 22: 899-906, 1985.
- 28 Himly M. et al. FASEB J 17: 106-108, 2003.
- 28 A Nilsen, B. M. et al. 1991. J. Biol. Chem. 266:2660-2668.
- 29 Wopfner N. et al. Biol Chem 383: 1779-1789, 2002. 30
- 29 A Jimenez A. et al. 1994. Int Arch Allergy Immunol 105:297-307.
- 29 B Barderas R. et al. Int Arch Allergy Immunol 127: 47-54, 2002.
- 29 C Carnes J. et al. Allergy 56, Supplement 68: 274, 2001.
- 29 D Giuliani A. et al. Allergy 42: 434-440, 1987.
- 30 Smith, P.M. et al. 1996. J. Allergy Clin. Immunol. 98:331-343.
- 31 Suphioglu, C. et al. 1997. FEBS Lett. 402:167-172.
- 31 a Asturias J.A. et al. 1997. Clin Exp Allergy 27:1307-1313.
- 32 Mecheri, S. et al. 1985. Allergy Appl. Immunol. 78:283-289.
- 33 Roberts, A.M. et al. 1993. Allergy 48:615-623.
- 33 a Guerin-Marchand, C. et al. 1996. Mol. Immunol. 33:797-806. 40
- 34 Klysner, S. et al. 1992. Clin. Exp. Allergy 22: 491-497.
- 35 Perez, M. et al. 1990. J. Biol. Chem. 265:16210-16215.
- 36 Griffith, I. J. et al. 1991. FEBS Letters 279:210-215.
- 37 Ansari, A. A. et al. 1989. J. Biol. Chem. 264:11181-11185.
- 37 a Sidoli, A. et al. 1993. J. Biol. Chem. 268:21819-21825.
- 38 Ansari, A. A. et al. 1989. Biochemistry 28:8665-8670.
- 39 Singh, M. B. et al. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:1384-1388.
- 39 a van Ree R. et al. 1995. J Allergy Clin Immunol 95:970-978.
- 40 Suphioglu, C. and Singh, M.B. 1995. Clin. Exp. Allergy 25:853-865.
- 41 Dolecek, C. et al. 1993. FEBS Lett. 335:299-304. 40

- 4 1 A Fischer S. et al. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 98:189-198.
- 4 2 Matthiesen, F., and H. Lowenstein. 1991. *Clin. Exp. Allergy* 21:297-307.
- 4 3 Petersen, A. et al. 1995. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55-59.
- 4 3 A Marknell DeWitt A. et al. *Clin Exp Allergy* 32: 1329-1340, 2002.
- 4 4 Valenta, R. et al. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:106-118.
- 4 6 Esch, R. E., and D. G. Klapper. 1989. *Mol. Immunol.* 26:557-561.
- 4 7 Olsen, E. et al. 1991. *J. Immunol.* 147:205-211.
- 4 8 Avjioglu, A. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:340.
- 5 2 Kos T. et al. 1993. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1086-92.
- 5 3 Diaz-Perales A. et al. 2000. *Clin Exp Allergy* 30:1403-1410. 10
- 5 4 Ipsen, H., and O.C. Hansen. 1991. *Mol. Immunol.* 28: 1279-1288.
- 5 5 Taniai, M. et al. 1988. *FEBS Lett.* 239:329-332.
- 5 6 Griffith, I.J. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
- 5 7 Sakaguchi, M. et al. *Allergy* 45: 309-312, 1990.
- 5 7 A Yokoyama M. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 195-202, 2000.
- 5 7 B Midoro-Horiuti T. et al. *J Immunol* 164: 2188-2192, 2000.
- 5 7 C Tinghino R. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 772-777, 1998.
- 5 8 Gross GN et al. *Scand J Immunol* 8: 437-441, 1978.
- 5 8 A Obispo TM et al. *Clin Exp Allergy* 23: 311-316, 1993.
- 5 8 B Midoro-Horiuti T. et al. *Clin Exp Allergy* 31: 771-778, 2001. 20
- 5 9 Lombardero M. et al. *Clin. Exp. Allergy* 24: 765-770, 1994.
- 6 0 Villaalba, M. et al. *Eur. J. Biochem.* 216: 863-869, 1993.
- 6 0 A Asturias JA et al. *J Allergy Clin Immunol* 100: 365-372, 1997.
- 6 0 B Batanero E. et al. *Eur J Biochem* 241: 772-778, 1996.
- 6 0 C Batanero E. et al. *FEBS Lett.* 410: 293-296, 1997.
- 6 0 D Tejera ML et al. *J Allergy Clin Immunol* 104: 797-802, 1999.
- 6 0 E Ledesma A. et al. *FEBS Lett* 466: 192-196, 2000.
- 6 0 F Barral P. et al. *J Immunol* 172: 3644-3651, 2004.
- 6 1 Yi FC et al. *Clin Exp Allergy* 32: 1203-1210, 2002.
- 6 1 A Ramos JD et al. *Int Arch Allergy Immunol* 126: 286-293, 2001. 30
- 6 2 Chua, K. Y. et al. *J. Exp. Med.* 167: 175-182, 1988.
- 6 2 A Chua, K. Y. et al. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91: 118-123, 1990.
- 6 2 B Smith AM et al. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 61-63, 2001.
- 6 2 C Smith AM et al. *J Allergy Clin Immunol* 107: 977-984, 2001.
- 6 3 Smith WA, Thomas WR. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 133-140, 1996.
- 6 4 Lake, F.R. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 1035-1042, 1991.
- 6 5 Tovey, E. R. et al. *J. Exp. Med.* 170: 1457-1462, 1989.
- 6 6 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
- 6 7 Shen, H.-D. et al. *Clin. Exp. Allergy* 23: 934-940, 1993.
- 6 7 A O'Neil GM et al. *Biochim Biophys Acta*, 1219: 521-528, 1994.
- 6 7 B King C. et al. *J Allergy Clin Immunol* 98: 739-747, 1996.
- 6 8 Lind P. et al. *J. Immunol.* 140: 4256-4262, 1988.
- 6 9 Dilworth, R. J. et al. *Clin. Exp. Allergy* 21: 25-32, 1991.
- 7 0 Nishiyama, C. et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 159-166, 1993.
- 7 0 A Trudinger, M. et al. *Clin. Exp. Allergy* 21: 33-38, 1991.
- 7 1 Shen HD et al. *Clin Exp Allergy* 25: 1000-1006, 1995.
- 7 1 A Tategaki A. et al. *ACI International suppl.* 1: 74-76, 2000. 50

- 7 2 Aki T. et al. *J Allergy Clin Immunol* 96: 74-83, 1995.
- 7 2 A Tsai L. et al. *Clin Exp Allergy* 29: 1606-1613, 1999.
- 7 2 B Gafvelin G. et al. *J Allergy Clin Immunol* 107: 511-518, 2001.
- 7 3 van Hage-Hamsten. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:353, 1993.
- 7 4 Varela J. et al. *Eur J Biochem* 225: 93-98, 1994.
- 7 4 A Schmidt M. et al. *FEBS Lett* 370: 11-14, 1995.
- 7 5 Eriksson TLJ et al. *Eur. J. Biochem.* 268: 287-294, 2001.
- 7 5 A Saarne T. et al. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 258-265, 2003.
- 7 5 B Eriksson TL et al. *Eur. J. Biochem.* 251 (1-2), 443-447, 1998.
- 7 6 Rautiainen J, Rytönen M, Pelkonen J, Pentikainen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantylarvi R. BDA20, a major bovine dander allergen characterised at the sequence level is Bos d 2. Submitted. 10
- 7 7 Gjesing B, Lowenstein H. *Ann Allergy* 53:602, 1984.
- 7 8 de Groot, H. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1056-1065, 1991.
- 7 9 Konieczny, A. Personal communication; Immunologic Pharmaceutical Corp.
- 7 9 A Bulone, V. *Eur J Biochem* 253: 202-211, 1998.
- 7 9 B Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
- 7 9 C Dandeu J. P. et al. (1993). *J. Chromatogr.* 621:23-31.
- 7 9 D Goubran Botros H. et al. 1998. *J. Chromatogr. B* 710:57-65.
- 7 9 E Hilger C. et al. *Allergy* 52: 179-187; and Hilger C. et al. *Gene* 169:295 -296, 1996. 20
- 7 9 F Ichikawa K. et al. *Clin Exp Allergy*, In Press 2001.
- 8 0 Fahlbusch B. et al. *Allergy* 57: 417-422, 2002.
- 8 1 McDonald, B. et al. 1988. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:251.
- 8 1 A Clarke, A. J. et al. 1984. *EMBO J* 3:1045-1052.
- 8 2 Longbottom, J. L. 1983. Characterisation of allergens from the urines of experimental animals. McMillan Press, London, pp. 525-529.
- 8 3 Laperche, Y. et al. 1983. *Cell* 32:453-460.
- 8 3 A Bush RK et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 104:665-671.
- 8 3 B Aukrust L, Borch SM. 1979. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60:68-79. 30
- 8 3 C Sward-Nordmo M. et al. 1988. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:288-294.
- 8 4 Shen, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:S157, 1999.
- 8 4 A Cramer R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. *Contrib. Microbiol. Vol. 2*, Karger, Basel (in press).
- 8 4 B Shen, et al. (manuscript submitted), 1999
- 8 4 C Shen HD et al. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.
- 8 5 Kumar A. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:1024-1030.
- 8 5 A Saxena S. et al. 2003. *Clin Exp Immunol* 134:86-91. 40
- 8 5 B Baur X. et al. *Allergy* 57: 943-945, 2002.
- 8 6 A Shen HD et al. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:444-451.
- 8 6 B Shen, et al. Abstract; The XVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.
- 8 7 Shen HD et al. *Clin Exp Allergy* 29: 642-651, 1999.
- 8 7 A Shen HD et al. *Clin Exp Allergy* 25: 350-356, 1995.
- 8 7 B Shen HD et al. *J Lab Clin Med* 137: 115-124, 2001.
- 8 8 Woodfolk JA et al. 1998. *J Biol Chem* 273:29489-96.
- 8 8 A Deuell, B. et al. 1991. *J. Immunol.* 147:96-101.
- 8 9 Shen, H.D. et al. 1991. *Clin. Exp. Allergy* 21:675-681. 50

- 8 9 A Horner WE et al. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 107:298-300.
- 8 9 B Chang CY et al. *J Biomed Sci* 9: 645-655, 2002.
- 9 0 Yasueda H. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 240-244, 1998. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CB S1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 9 0 A Onishi Y. et al. *Eur J Biochem* 261: 148-154, 1999. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 9 1 Schmidt M. et al. *Eur J Biochem* 246:181-185, 1997. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection). 10
- 9 1 A Rasool O. et al. *Eur J Biochem* 267: 4355-4361, 2000. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 9 1 B NB: ; strain 4625 (Indian Agricultural Research Institute, PUSA; New Delhi, India).
- 9 2 Kuchler, K. et al. 1989. *Eur. J. Biochem.* 184:249-254.
- 9 3 Gmachl, M., and G. Kreil. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3569-3573.
- 9 3 A Hoffman DR. 1977. *J Allergy Clin. Immunol.* 59:364-366.
- 9 4 Habermann, E. 1972. *Science* 177:314-322.
- 9 5 Hoffman DR, Jacobson RS. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:812-821.
- 9 5 A 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. 20
- 9 5 B Helm R. et al. 1996. *J Allerg Clin Immunol* 98:172-180.
- 9 5 C Pomes A. et al. 1998. *J Biol Chem* 273:30801-30807.
- 9 6 Arruda LK et al. *J Biol Chem* 270:19563-19568, 1995.
- 9 7 Arruda LK et al. *J Biol Chem* 270:31196-31201, 1995.
- 9 8 Arruda LK et al. *Int Arch Allergy Immunol* 107:295-297, 1995.
- 9 8 A Wu CH et al. 1998. *J Allergy Clin Immunol* 101:832-840.
- 9 8 B Melen E. et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 103:859-64.
- 9 8 C Wu CH et al. *J Biol Chem* 271:17937-17943, 1996. 30
- 9 8 D Wu CH et al. *Molecular Immunol* 34:1-8, 1997.
- 9 8 E Santos ABR et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 104:329-337.
- 9 8 F Asturias JA et al. 1999. *J Immunol* 162:4342-4348.
- 9 9 Mazur, G. et al. 1990. *Monog. Allergy* 28:121-137.
- 9 9 A Moneo I. et al. *Allergy* 58: 34-37, 2003.
- 1 0 0 Soldatova, L. et al. 1993. *FEBS Letters* 320:145-149.
- 1 0 1 Lu, G. et al. 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.
- 1 0 2 Fang, K. S. F. et al. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.
- 1 0 3 King, T. P. et al. 1990. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266.
- 1 0 4 Lu, G. et al. 1993. *J. Immunol.* 150: 2823-2830. 40
- 1 0 5 King, T. P. and Lu, G. 1997. Unpublished data.
- 1 0 5 A King TP et al. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600.
- 1 0 6 Hoffman, D.R. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.
- 1 0 7 Hoffman DR. 1992. Unpublished data.
- 1 0 8 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187, 1993.
- 1 0 9 Jacobson RS et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292, 1992.
- 1 1 0 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol* 91: 71-78, 1993.
- 1 1 1 Schmidt M. et al. *FEBS Letters* 319: 138-140, 1993.
- 1 1 1 A Paddock CD et al. *J Immunol* 167: 2694-2699, 2001.
- 1 1 2 Elsayed S, Bennich H. *Scand J Immunol* 3: 683-686, 1974. 50

- 1 1 3 Elsayed S. et al. *Immunochemistry* 9: 647-661, 1972.
- 1 1 4 Hoffman, D. R. 1983. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 481-486.
- 1 1 5 Langeland, T. 1983. *Allergy* 38:493-500.
- 1 1 6 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.
- 1 1 6 A Shanti KN et al. *J. Immunol.* 151: 5354-5363, 1993.
- 1 1 7 Yu CJ et al. *J Immunol* 170: 445-453, 2003.
- 1 1 7 A Miyazawa M et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 948-953, 1996. 10
- 1 1 7 B Asturias JA et al. *Int Arch Allergy Immunol* 128: 90-96, 2002.
- 1 1 7 C Lopata AL et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 642-648, 1997.
- 1 1 7 D Hoffmann-Sommergruber K. et al. *Clin. Exp. Allergy* 29: 840-847, 1999.
- 1 1 8 Monsalve RI et al. *Biochem. J.* 293: 625-632 1993.
- 1 1 8 A . Monsalve RI et al. 1997. *Clin Exp Allergy* 27:833-841.
- 1 1 9 Mena, M. et al. *Plant Molec. Biol.* 20: 451-458, 1992.
- 1 1 9 A Palosuo K. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 634-638, 2001.
- 1 1 9 B Xu H. et al. *Gene* 164: 255-259, 1995.
- 1 1 9 C Pastorello EA et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 699-707, 1994.
- 1 1 9 D Diaz-Perales A. et al. *J Allergy Clin Immunol* 110: 790-796, 2002. 20
- 1 1 9 E Galleguillos F, Rodriguez JC. *Clin Allergy* 8: 21-24, 1978.
- 1 1 9 F Baur X. *Clin Allergy* 9: 451-457, 1979.
- 1 1 9 G Gailhofer G. et al. *Clin Allergy* 18: 445-450, 1988.
- 1 2 0 Menendez-Arias, L. et al. 1988. *Eur. J. Biochem.* 177:159-166.
- 1 2 0 A Gonzalez R. et al. *Lancet* 346:48-49, 1995.
- 1 2 0 B Kleine-Tebbe J. et al. *J Allergy Clin Immunol* 110: 797-804, 2002.
- 1 2 0 C Sanchez-Monge R. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 955-961, 2000.
- 1 2 1 Gavrovic-Jankulovic M. et al. *J Allergy Clin Immunol* 110: 805-810, 2002.
- 1 2 1 A Pastorello EA et al. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 756: 85-93, 30
2001.
- 1 2 1 B Moneo I. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 177-182, 2000.
- 1 2 1 C Asturias JA et al. 2000. *Allergy* 55:898-890.
- 1 2 2 Christie, J. F. et al. 1990. *Immunology* 69:596-602.
- 1 2 2 A Baur X. et al. *Clin Allergy* 12: 9-17, 1982.
- 1 2 2 B Onisuka R. et al. *Int Arch Allergy Immunol* 125: 135-143, 2001.
- 1 2 3 Czuppon AB et al. *J Allergy Clin Immunol* 92:690-697, 1993.
- 1 2 4 Attanayaka DPSTG et al. 1991. *Plant Mol Biol* 16:1079-1081.
- 1 2 5 Chye ML, Cheung KY. 1995. *Plant Mol Biol* 26:397-402.
- 1 2 6 Alenius H. et al. 1993. *Int Arch Allergy Immunol* 102:61-66. 40
- 1 2 7 Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ. 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognised by IgE from *Spina Bifida* patients with Latex allergy. *J Allerg Clin Immunol* in press.
- 1 2 8 Sunderasan E. et al. 1995. *J nat Rubb Res* 10:82-99.
- 1 2 9 Swoboda I. et al. 2002. *J Immunol.* 168:4576-84.

【 0 0 6 2 】

本発明の好ましい実施形態によれば、低アレルギー誘発性分子は、低下した I g E 結合能を示す。

【 0 0 6 3 】

本発明の好ましい他の実施形態によれば、低アレルギー誘発性分子は、低下したT細胞反応性を示す。

【0064】

しかし、少なくとも1つのT細胞エピトープを包含するアレルゲン断片はまた、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質に使用され得る。

【0065】

本発明において使用されるときに“低下したIgE結合能を示すこと”は、本発明に係る分子が、有意に低下したIgE結合能もしくはIgE結合活性(野生型アレルゲンと比較して、少なくとも50%だけ少ない、好ましくは少なくとも70%だけ少ない、より好ましくは少なくとも80%だけ少ない、さらに好ましくは少なくとも90%だけ少ない、最も好ましくは少なくとも95%だけ少ない結合能)、またはこれらのすべての欠如さえも示すことを意味する。

10

【0066】

ペプチドおよびタンパク質のような分子のIgE結合活性/能は、野生型アレルゲンにあらかじめさらされている、例えば対象(例えば、アレルギー体質の対象)から得られる血清を用いた、例えば酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によって、決定され得る。簡単に言うと、試験されるペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル上に対してまぶされる。洗浄およびブロッキングの後に、試験されるペプチドまたは当該ペプチドが由来するタンパク質にさらされているアレルギー体質の対象の血漿からなる抗体溶液が、ウェルにおいてインキュベーションされる。標識2次抗体が、ウェルに加えられ、かつインキュベーションされる。それから、IgE結合の量が、定量され、かつ精製した野生型アレルゲンによって結合されるIgEの量と比較される。

20

【0067】

代替可能に、ペプチドの結合活性は、ウエスタンブロッティング分析によって測定され得る。例えば、試験されるペプチドは、SDS-PAGEを用いてポリアクリルアミドゲル上を流される。それから、ペプチドは、ニトロセルロースに転写され、かつ続いてアレルギー体質の対象からの血清を用いてインキュベーションされる。標識2次抗体を用いたインキュベーションの後に、IgE結合の量が測定され、かつ定量化される。

【0068】

ペプチドのIgE結合活性を測定するために使用され得る他のアッセイは、競合ELISAアッセイである。簡単に言うと、IgE抗体プールは、直接ELISAによってIgE反応性であることを示されているアレルギー体質の対象からの血漿を、野生型アレルゲンと混ぜあわせることによって、生成される。このプールは、ELISA競合アッセイに使用されて、野生型アレルゲンに対するIgE結合を試験されるペプチドと比較する。野生型アレルゲンおよび試験されるペプチドに関するIgE結合が、測定され、かつ定量化される。

30

【0069】

“T細胞エピトープ”は、T細胞が抗原特異的結合部位を有し、上記部位に対する結合の結果がT細胞を活性化するタンパク質(例えば、アレルゲン)またはこれら断片を意味する。本明細書において使用されるときに、“低下したT細胞反応性を示すこと”という用語は、低アレルギー誘導性分子が、当該技術における公知の標準的なアッセイにおいて等モル量を用いて得られる野生型アレルゲンによって誘導される刺激と比較して、有意に低減されているT細胞反応性を示す分子を指す(低下したT細胞反応性は、等モル量における野生型アレルゲンと比較して、低アレルギー誘発性分子の刺激が少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも90%少ないことを意味する)。本発明の特に好ましい実施形態において、分子は、T細胞エピトープを“欠如”し得、かつこのようにして分子が処置される個体(すなわち、エピトープ提示価数プラットフォーム分子(epitope-presenting valency platform molecule)を受け取るべき)において低下したT細胞反応性を示し得る。例えば、アレルゲン由来分子が、個体または個体の集団に

40

50

関してT細胞エピトープを欠如し得る一方において、他の個体に関してT細胞エピトープを保有することは、あり得る。T細胞エピトープの存在を検出する方法は、当該技術において公知であり、かつT細胞増殖（例えば、チミジンの取り込み）を検出する方法を包含する。チミジン取り込みの定量的な量は、試験される免疫原に依存して変化し得るが、バックグラウンドを超えて統計的に有意な（すなわち、一般的に、標準的な統計学的方法を用いて0.05以下のp）取り込みを誘導できない免疫原は、T細胞エピトープを欠如すると考えられる（例えば、Zhen L. et al. (Infect Immun. (2003) 71:3920-3926)を参照すればよい）。一般的に、約2 - 3に足りない、より好ましくは1未満の刺激指標は、T細胞反応性およびエピトープの欠如を示す。また、T細胞エピトープの存在は、標準的な方法に従ってT細胞由来のリンホカインの分泌を測定することによって決定され得る。刺激指標（SI）は、刺激細胞の増殖率（チミジンの取り込み）を、培地単独における非刺激細胞の増殖率によって割ることによって算出され得る。SI = 1は、非刺激細胞を意味し、SI < 1は、毒性影響を示し、かつSI > 1は細胞の刺激を示す。T細胞の位置および含有量は、存在するならば、経験的に決定され得る。

10

【0070】

サイトカイン分泌は、T細胞刺激に加えて測定され得る。例えば、IFN - ガンマは、有害なサイトカインとして認識されている。他の例は、TFN - アルファ、IL - 5、IL - 4、IL - 8などであり得る。

【0071】

アレルゲン断片は、Phl p 1の151 ~ 177、87 ~ 117、1 ~ 30、43 ~ 70もしくは212 ~ 241番目のアミノ酸、Phl p 5の93 ~ 128、98 ~ 128、26 ~ 53、26 ~ 58、132 ~ 162、217 ~ 246、252 ~ 283もしくは176 ~ 212番目のアミノ酸、Fel d 1の鎖1の1 ~ 34もしくは35 ~ 70番目のアミノ酸、Fel d 1の鎖2の1 ~ 34、35 ~ 63もしくは64 ~ 92番目のアミノ酸、Bet v 1の30 ~ 59、50 ~ 79もしくは75 ~ 104番目のアミノ酸、Der p 2の1 ~ 33、21 ~ 51、42 ~ 73、62 ~ 103もしくは98 ~ 129番目のアミノ酸、Der p 7の1 ~ 30、20 ~ 50、50 ~ 80、90 ~ 125、125 ~ 155もしくは165 ~ 198番目のアミノ酸、Der p 10の1 ~ 35、36 ~ 70、71 ~ 110、111 ~ 145、140 ~ 170、175 ~ 205、210 ~ 250もしくは250 ~ 284番目のアミノ酸、Der r 21の1 ~ 35、35 ~ 72、070 ~ 100もしくは90 ~ 122番目のアミノ酸、クローン30の1 ~ 32、15 ~ 48もしくは32 ~ 70番目のアミノ酸、Alt a 1の19 ~ 58、59 ~ 95、91 ~ 120もしくは121 ~ 157番目のアミノ酸、Par j 2の31 ~ 60、45 ~ 80、60 ~ 96もしくは97 ~ 133番目のアミノ酸、Ole e 1の1 ~ 40、36 ~ 66、63 ~ 99、86 ~ 120もしくは107 ~ 145番目のアミノ酸、Fel d 2の25 ~ 58、99 ~ 133、154 ~ 183、277 ~ 307、334 ~ 363、373 ~ 402、544 ~ 573、579 ~ 608、58 ~ 99、125 ~ 165、183 ~ 224、224 ~ 261、252 ~ 289、303 ~ 340、416 ~ 457、460 ~ 500もしくは501 ~ 542番目のアミノ酸、Can f 2の19 ~ 58、52 ~ 91、82 ~ 119、106 ~ 144もしくは139 ~ 180番目のアミノ酸、Can f 1の19 ~ 56、51 ~ 90、78 ~ 118、106 ~ 145もしくは135 ~ 174番目のアミノ酸、Art v 1の27 ~ 70、70 ~ 100もしくは92 ~ 132番目のアミノ酸、Amb a 1の31 ~ 70、80 ~ 120、125 ~ 155、160 ~ 200、225 ~ 263、264 ~ 300 305 ~ 350もしくは356 ~ 396番目のアミノ酸、Alt a 6の1 ~ 34、35 ~ 74、74 ~ 115、125 ~ 165、174 ~ 213、241 ~ 280、294 ~ 333、361 ~ 400もしくは401 ~ 438番目のアミノ酸、Alt a 2の1 ~ 40、41 ~ 80、81 ~ 120、121 ~ 160番目のアミノ酸またはこれらの断片または配列変異から好ましく構成される。

20

30

40

【0072】

50

上記において特定されたアレルゲン由来分子の特定のアミノ酸配列は、以下の表の通りである。

【 0 0 7 3 】

【表 2 2】

ペプチド	位置	配列	配列番号
Pep Alt a 1.1	19-58	APLESRQDTASCPVTTEGDYVWKISEFYGRKPEGTYNSL	23
Pep Alt a 1.2	59-95	GFNIKATNGGTLDFTCSAQADKLEDHKWYSCGENSFM	24
Pep Alt a 1.3	91-120	ENSFMDFSFSDRSGLLLKQKVSDDITYVA	25
Pep Alt a 1.4	121-157	TATLPNYCRAGGNGPKDFVCQGVADAYITLVTLPKSS	26
Pep Alt a 2.1	1-40	MHSSNNFFKDNIFRSLSKEDPDYSRNIHQVIRLHWDWAQ	27
Pep Alt a 2.2	41-80	LLMLSAKRMKVAFKLDIEKDQRVWDRCTADDLKGRNGFKR	28
Pep Alt a 2.3	81-120	CLQFTLYRPRDLLSLLNEAFFSAFRENRETIINTDLEYAA	29
Pep Alt a 2.4	121-160	KSISMARLEDLWKEYQKIFPSIQVITSAFRSIEPELTVYT	30
Pep Alt a 2.5	161-190	CLKKIEASFELIEENGDPKITSEIQLLKAS	31
Pep Alt a 6.1	1-34	MTITKIHARSVYDSRGNPTVEVDIVTETGLHRAI	32
Pep Alt a 6.2	35-74	VTETGLHRAIVPSGASTGSHEACELRDGDKSKWGGKGVTK	33
Pep Alt a 6.3	74-115	APALIKEKLDVKDQSAVDAFLNKLDTTNTNLGANAILGVS	34
Pep Alt a 6.4	125-165	EKGVPLYAHISDLAGT KKPYPVLPVPF QNVLNGGSHAGGRLA	35
Pep Alt a 6.5	174-213	CEAPTFSEAMRQGAQEVYQKLKALAKKTYGQSAGNVGDEGG	36
Pep Alt a 6.6	241-280	IKIAMDVASSEFYKADEKKYDLDFKNPDSKSKWLTYEQL	37
Pep Alt a 6.7	294-333	VSIEDPFAEDDWEAWSYFFKTYDQIVGDDLTVTNPEFIK	38
Pep Alt a 6.8	361-400	AKDAFGAGWGMVSHRSGETEDVTIADIVVGLRSGQIKTG	39
Pep Alt a 6.9	401-438	APARSERLAKLNQILRIEELGDNAVYAGNNFRTAVNL	40
Pep Amb a 1.1	31-70	EILPVNETRRLTTSAYNIIDGCWRGKADWAENRKALADC	41
Pep Amb a 1.2	80-120	GKDGDIYTVTSELDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWIIFE	42
Pep Amb a 1.3	125-155	IRLDKEMVVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTL	43
Pep Amb a 1.4	160-200	NVIIHNINMHDVKVNPGLIKSNDGPAAPRAGSDGDAISIS	44
Pep Amb a 1.5	225-263	GTTRLTVSNLFTQHQFVLLFGAGDENIEDRGMLATVAF	45

10

20

30

40

【表 2 3】

ペプチド	位置	配列	配列番号
Pep Amb a 1.6	264-300	NTFTDNVDQRMPCRHRGFFQVVNNNYDKWGSYAIGGS	46
Pep Amb a 1.7	305-350	ILSQGNRFCAPDERSKKNVLGRHGEEAAESMKWNWRTNKDVLE NGA	47
Pep Amb a 1.8	356-396	GVDPVLTPEQSAGMIPAEPGESALSLSAGVLSQPGAPC	48
Pep Art v 1.1	27-70	SKLCEKTSKTYSGKCDNKKCDKKEIWEKAQHGACHKREAGKE S	49
Pep Art v 1.2	70-100	SCFCYFDCSKSPPGATPAPPGAAPPPAAGGS	50
Pep Art v 1.3	92-132	APPPAAGGSPSPPADGGSPPPADGGSPVDGGSPPPSTH	51
Can f 1 Pep 1	19-56	QDTPALGKDTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDVTPM	52
Can f 1 Pep 2	51-90	DSVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNGQCQNI TVVLHKTSE	53
Can f 1 Pep 3	78-118	CQNI TVVLHKTSEPGKYTAYEGQRVVF IQPSPVRDHYILYC	54
Can f 1 Pep 4	106-145	QPSPVRDHYILYCEGELHGRQIRMAKLLGRDPEQSQEALE	55
Can f 1 Pep 5	135-174	RDPEQSQEALDFREFSRAKGLNQEILELAQSETCSPGGQ	56
Can f 2 Pep 1	19-58	QEGNHEEPQGGLEELSGRWHSVALASNKSDLIKPWGHRV	57
Can f 2 Pep 2	52-91	PWGHRVFIHMSAKDGNLHGDILIPQDGQCEKVSLTAFK	58
Can f 2 Pep 3	82-119	CEKVSLTAFKTATSNKFDLEYWGHNDLYLAEVDPKSYL	59
Can f 2 Pep 4	106-144	NDLYLAEVDPKSYLILYMINQYNDTSLVAHLMVRDLR	60
Can f 2 Pep 5	139-180	VRDLRQQDFLPAFESVCEDIGLHKDQIVVLSDDDRCCGSRD	61
Fel d 2 Pep 1	25-58	EAHQSEIAHRFNDLGEHFRLVLFVAFSQYLQOC	62
Fel d 2 Pep 2	99-133	CTVASLRDKYEMADCCEKKEPERNECFLOHKDDN	63
Fel d 2 Pep 3	154-183	NEQRFLGKYLYEIARRHPYFYAPELLYYAE	64
Fel d 2 Pep 4	277-307	CADDRADLAKYICENQDSISTKLKECCGKPV	65
Fel d 2 Pep 5	334-363	VEDKEVCKNYQEAKDVFLGTFLYEYSRRHP	66
Fel d 2 Pep 6	373-402	LAKEYEATLEKCCATDDPPACYAHVFDEFK	67
Fel d 2 Pep 7	544-573	EKQIKKQSALVELLKHKPKATEEQKLTVMG	68

10

20

30

40

【表 2 4】

ペプチド	位置	配列	配列番号
Fel d 2 Pep 8	579-608	VDKCCAAEDKEACFAEEGPKLVAAAQAALA	69
Fel d 2 Pep 9	58-99	CPFEDHVKLVNEVTEFAKGCVADQSAANCEKSLHELLGDKLC	70
Fel d 2 Pep 10	125-165	CFLQHKDDNPGFGQLVTPEADAMCTAFHENEQRFLGKYLIE	71
Fel d 2 Pep 11	183-224	EEYKGVFTECCAAADKAACLTPKVDALREKVLASSAKERLKC	72
Fel d 2 Pep 12	224-261	CASLQKFGERAFAKAWSVARLSQKFPKAEFAEISKLVTD	73
Fel d 2 Pep 13	252-289	FAEISKLVTDLAKIHKECCHGDLLECADDRADLAKYIC	74
Fel d 2 Pep 14	303-340	CGKPVLEKSHCISEVERDELPA DL PPLAVDFVEDKEVC	75
Fel d 2 Pep 15	416-457	CELFEKLGEGYGFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRSLGKV	76
Fel d 2 Pep 16	460-500	CTHPEAERLSCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKVTKC	77
Fel d 2 Pep 17	501-542	CTESLVNRRPCFSALQVDETYVPKEFSAETFTFHADLCTLPE	78
Pep Ole e 1.1	1-40	EDIPQPPVSQFHIQGQVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLR	79
Pep Ole e 1.2	36-66	GASLRLQCKDKENGDVTFTEVGYTRAEGLYS	80
Pep Ole e 1.3	63-99	GLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTGWA	81
Pep Ole e 1.4	86-120	GRKDCNEIPTGWA K PSLKFKLNTVNGTTRTVNPL	82
Pep Ole e 1.5	107-145	LNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM	83
Pep Par j 2.1	31-60	GEEACGKVVDIMPLHFVKGEEKEPSKEC	84
Pep Par j 2.2	45-80	CLHFVKGEEKEPSKECCSGTKKLSEEVKTTEQKREA	85
Pep Par j 2.3	60-96	CCSGTKKLSEEVKTTEQKREACKCIVRATKGISGIKN	86
Pep Par j 2.4	97-133	ELVAEVPKKCDIKTTLPPITADFDCSKIQSTIFRGYY	87
Der p 1 Pep 1	1-30	TNAC SINGNAPAEIDL R QMRVTPIRMQGG	88
Der p 1 Pep 2	52-84	NQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQ	89
Der p 1 Pep 3	85-115	HNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISN	90
Der p 1 Pep 4	99-135	REQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTH	91

10

20

30

40

【表 25】

ペプチド	位置	配列	配列番号
Der p 1 Pep 5	145-175	KDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQPNYHAVNIV	92
Der p 1 Pep 6	155-187	GRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVYWI	93
Der p 1 Pep 7	175-208	VGYSNAQGVYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI	94
Der p 1 Pep 8	188-222	VRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL	95
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	97
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWIVPKIAPKSEN	99
		KIAPKSEN	
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGLACAIATHAKIRD	100
Der p 5 Pep 1	1-35	MEDKKHDYQNEFDLLMERIHEQIKKGELALFYLQ	101
Der p 5 Pep 2	25-60	KKGELALFYLQEQINHFEKPTKEMKDKIVAEMDTI	102
Der p 5 Pep 3	65-95	DGVRGVLDRMLQQRKLDLIFEQYNLEMAKKS	103
Der p 5 Pep 4	78-114	DLDI FEQYNLEMAKKS GDILERDLKKEEARVKKIEV	104
Der p 7 Pep 1	1-30	DPIHYDKITTEEINKAVDEAVAAIEKSETFD	105
Der p 7 Pep 2	20-50	VAAIEKSETFDPMKVPDHSDFERHIGIIDL	106
Der p 7 Pep 3	50-80	LKGELDMRNIQVRGLKQMKRVGDANVKSE	107
Der p 7 Pep 4	90-125	VHDDVVSMEYDLAYKLGDLHPNTHVISDIQDFVVEL	108
Der p 7 Pep 5	125-155	LSLEVSEEGNMTLTSFEVRQFANVVNHIGGL	109
Der p 7 Pep 6	165-198	LSDVLTAFQD TVRAEMTKVLAPAFKKELEARNQ	110
Der p 10 Pep 1	1-35	MEAIKKKMQAMKLEKDNAIDRAEIAEQKARDANLR	111
Der p 10 Pep 2	36-70	AEKSEEEVRALQKKIQQIENELDQVQEQLSAANTK	112
Der p 10 Pep 3	71-110	LEEKEKALQTAEGDVAALNRRIQLIEEDLERSEERLKIAT	113
Der p 10 Pep 4	111-145	AKLEEASQSADESERMRKMLEHRSTDEERMEGLE	114
Der p 10 Pep 5	140-170	RMEGLENQLKEARMAEDADRKYDEVARKLA	115
Der p 10 Pep 6	175-205	DLERAEEERAETGESKIVELEEEELRVVGNL	116
Der p 10 Pep 7	210-250	SEEKAQQREEAHEQQIRIMTTKLKEAEARAEFAERSVQKLQ	117
Der p 10 Pep 8	250-284	QKEVDRLEDELVHEKEKYKSISDELDTFAELTGY	118

10

20

30

40

【表 2 6】

ペプチド	位置	配列	配列番号
Der p 21 Pep 1	1-35	MFIVGDKKEDWRMAFDRLMMEELETKIDQVEKGL	119
Der p 21 Pep 2	35-72	LHLSEQYKELEKTKSKELKEQILRELTIGENFMK GAL	120
Der p 21 Pep 3	70-100	GALKFFEMEAKRTDLNMFERYNYEFALESIK	121
Der p 21 Pep 4	90-122	YNYEFALESIKLLIKKLDLAKKVKAVNPDEYY	122
Clone 30 Pep 1	1-32	MANDNDDPTTTVHPTTTEQPDDKFECPSRFG	123
Clone 30 Pep 2	15-48	PTTTEQPDDKFECPSRFGYFADPKDPHKFYICSN	124
Clone 30 Pep 3	32-70	GYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEE TCT	125
Bet v 1 Pep 1	30-59	LFPKVAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISF	126
Bet v 1 Pep 2	50-79	GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTN	127
Bet v 1 Pep 3	75-104	VDHTNFKYNSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	128
Fel d 1 chain 1 Pep 1	1-34	EICPAVKRDVDFLTGTPDEYVEQVAQYKALPVVC	129
Fel d 1 chain 1 Pep 2	35-70	LENARILKNCVDAKMTEEDKENALSLLDKIYTSPLC	130
Fel d 1 chain 2 Pep 1	1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANGNELLLDLSLTKVNAC	131
Fel d 1 chain 2 Pep 2	35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVL DGLVC	132
Fel d 1 chain 2 Pep 3	64-92	CMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKLNTLGR	133
Phl p 5 Pep 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGA AESSSKAALTSK	134
Phl p 5 Pep 2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	135
Phl p 5 Pep 3	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIC	136
Phl p 5 Pep 4	217-246	CEAAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVK	137
Phl p 5 Pep 5	252-283	TVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAK	138
Phl p 5 Pep 6	176-212	CAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDK	139
Phl p 5 Pep 1a	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGA AESSSKAALTSK	141
Phl p 5 Pep 2b	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	142

10

20

30

40

“これらの断片”および“配列変異”という用語は、本明細書に開示されているアレルゲン由来分子から推論され、かつ上記アレルゲン由来分子と類似するか、または同一である生化学的性質（例えば、これらの分子が得られるアレルゲンに対するIgE結合を妨げる能力）を示すペプチドを指す。本発明の断片は、アレルゲン由来分子、少なくとも5つ、好ましくは少なくとも7つ、より好ましくは少なくとも10の連続するアミノ酸残基および/または最大で95%、好ましくは最大で90%、より好ましくは最大で80%のアミノ酸残基を包含する。“配列変異”という用語は、断片化（上記を参照すればよい）、（例えば、非天然もしくは天然のアミノ酸またはアミノ酸誘導体を用いた）アミノ酸置換、欠失または付加といった、ペプチドの修飾を含む。また、“配列変異”は、上記表の上記アレルゲン由来分子を指し、ここで少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、さらにより好ましくは少なくとも4つ（5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、15、20）のアミノ酸残基が、C末端および/またはN末端に加えらる。

10

【0079】

クローン30アレルゲンは、イエダニであるデルマトファゴイデス プテロニッシヌスから得られるアレルゲンであり、かつ以下の配列：M A N D N D D D P T T T V H P T T T E Q P D D K F E C P S R F G Y F A D P K D P H K F Y I C S N W E A V H K D C P G N T R W N E D E E T C T（配列番号140；またA T A 733/2006明細書を参照すればよい）からなることが言及される。

20

【0080】

また、本発明によれば、上記において開示されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%が同一である、好ましくは90%が同一である、ペプチドが包含される。

【0081】

本発明の他の局面は、本発明に係る融合された低アレルギー誘発性タンパク質をコードする核酸分子に関する。

【0082】

本発明の他の局面は、本発明に係る核酸分子を包含するベクターに関する。

【0083】

上記ベクターは、発現ベクターであることが好ましい。

【0084】

本発明の核酸分子を内部に含むベクターは、クローニング用または発現ベクターの製作に使用され得る。上記ベクターは、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは遺伝子工学において通常に使用されるあらゆる他のベクターであり得、かつ本発明の核酸分子、発現制御用の真核生物または原核生物のエLEMENT（例えば、転写および/または翻訳の開始および終結に関する制御配列、エンハンサ、プロモータ、ならびにシグナル配列など）を含むことができる。

30

【0085】

本発明の好ましい実施形態によれば、ベクターは、細菌ベクター、真菌ベクター、昆虫ベクター、ウイルスベクターまたは哺乳類ベクターである。

【0086】

本発明のベクターは、種々の宿主におけるクローニング目的または発現目的に対して採用され得る。従って、上記ベクターは、本発明に係る低アレルギー誘発性分子または融合タンパク質のほかに、宿主特異的な制御配列を包含する。

40

【0087】

本発明の他の局面は、本発明に係る核酸分子またはベクターを包含する宿主に関する。

【0088】

本発明に係る核酸分子またはベクターは、好適な宿主に導入され得る。上記分子は、宿主のゲノムに組み込まれ得る。ベクターは、細胞質において染色体外的に存在し得るか、または宿主の染色体に組み込まれ得る。

【0089】

50

本発明のさらに他の局面は、本発明に係る低アレルギー誘発性分子、低アレルギー誘発性融合タンパク質または融合タンパク質に対して対象化された抗体に関する。

【0090】

本発明の好ましい実施形態によれば、抗体は、モノクロナル抗体またはポリクロナル抗体である。

【0091】

本発明に係る抗体としては、限定されないが、ポリクロナル抗体、モノクロナル抗体、多重特異性抗体、ヒト化した抗体もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片ならびに上述のこれらのエピトープ結合断片が挙げられる。さらに、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリンの免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）と考えられる。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリンのタイプ IgG、IgM、IgD、IgAおよびIgY、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスに好ましく属する。

10

【0092】

ポリクロナル抗体は、本発明のポリペプチドを、好ましくは補佐剤を用いて、非ヒトの哺乳類に投与し、かつ結果物である抗血清を回収することによって調整され得る。期間の初めから終わりまで繰り返して注入することによって、向上した力価が得られ得る。抗体を導くために使用され得る哺乳類の種に対して特に制限はなく；ウサギまたはテンジクネズミを使用することが好まれるが、ウマ、ネコ、イヌ、ヤギ、ブタ、ラット、ウシ、ヒツジ、ラクダなども使用され得る。抗体の産生において、一定量の本発明の免疫原は、例えば、生理的食塩水を用いて好適な濃度にまで希釈され、かつ結果の希釈溶液は、例えば、懸濁液を調製するために完全フロインド補助液と混合されるか、または水酸化アルミニウムといったミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールといった界面活性物質、ならびにBCG（ウシ型弱毒結核菌ワクチン）およびコリネバクテリウム パルブムといった潜在的に有用なヒト補佐剤と混合される。懸濁物および混合物は、投与ごとに約50μgから約2500μgの本発明のポリペプチドを用いて、動物に対して、例えばウサギに対して、例えば腹腔内に、投与される。懸濁物は、免疫化をもたらすために、約2-3ヶ月、好ましくは約1ヶ月までの期間に渡って約2週間ごとに好ましく投与される。抗体は、最後の投与後から1から2週間が経過した後に免疫化動物から血液が回収され、血液を遠心分離し、かつ血液から血清を単離することによって、回収される。

20

30

【0093】

モノクロナル抗体は、例えば、ヒトまたはマウス由来であり得る。マウスのモノクロナル抗体は、Kohler and Milsteinの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256 (1975) 495）によって（例えば、適切なマウス骨髄腫細胞株を用いて免疫したマウスの脾臓細胞の融合によって）調製され得る。

【0094】

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種から得られている分子（例えば、マウスモノクロナル抗体から得られる可変領域およびヒト免疫グロブリンの定常部を有する抗体）である。キメラ抗体を生成する方法は、当該技術において公知である。例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985) ; Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986) ; Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202 ; 米国特許第5,807,715号明細書 ; 米国特許第4,816,567号明細書および米国特許第4,816,397号明細書を参照すればよい。

40

【0095】

ヒト化した抗体は、非ヒト種に由来する1つ以上の相補性決定領域（CDRs）およびヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有し、所望の抗原と結合する非ヒト種の抗体に由来する抗体分子である。多くの場合に、ヒトフレームワーク領域にお

50

るフレームワーク残基は、CDRドナー抗体に由来する対応する残基を用いて置換して、抗原結合を変える、好ましくは向上する。これらのフレームワーク置換は、当該技術において公知の方法によって（例えば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基およびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定の位置における異常な残基を特定するための抗原結合配列比較によって）特定される（例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号明細書；Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照すればよい）。抗体は、当該技術において種々の公知の技術（例えば、CDRグラフトイング（欧州特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；米国特許第5,225,539号明細書；米国特許第5,530,101；および米国特許第5,585,089号明細書）、ベニアリング（veneer ing）もしくは表面形成（欧州特許第592,106号明細書；欧州特許第519,596号明細書；Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)；Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)；Roguska. et al., PNAS 91:969-13 (1994)）、およびチェインシャッフリング（米国特許第5,565,332号明細書）が挙げられる）を用いてヒト化され得る。

10

【0096】

本発明に係る抗体は、アレルギー、特にイエダニアレルギーにかかっている個体の脱感作に対して有利に使用され得る。受動免疫に対して、抗体は、IgGまたはこれらの誘導体（例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体）であることが好ましい。さらにまた、この抗体は、個体の脱感作に使用され得る。

20

【0097】

本発明の他の局面は、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質または抗体を包含するワクチン調合物に関する。

【0098】

本発明に係るワクチン調合物は、当該技術において公知のように調合され得、かつ上記ワクチン調合物の投与経路に対して必然的に適応させられ得る。

【0099】

（本発明の）ワクチン調合物の好ましい投与経路は、一般的におよびアレルギー免疫療法特定の、説明され、かつ示唆されるすべての標準的な投与管理体制（経口的、経皮的、静脈内的、鼻腔内的、経粘膜的、直腸的など）を包含する。しかし、本発明に係る分子を皮下的にか、または筋肉内に投与することが特に好ましい。

30

【0100】

本発明に係るワクチン調合物は、ライノウイルス属の一員のウイルスカプシドタンパク質またはこれらの断片のみを包含し得る。

【0101】

上記調合物は、少なくとも1つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または防腐剤をさらに、好ましく包含する。

【0102】

本発明に係る低アレルギー誘発性分子の免疫原性を増強するために、例えば、補佐剤は、本発明に係る薬剤に使用され得る。本発明に係る補佐剤は、抗原とともにか、または抗原と平行して投与される場合に、その免疫原性を増強する、および/または免疫応答の性質に影響を与える、補助剤である。従って、補佐剤は、液性免疫応答または細胞性免疫応答の程度に相当に影響することができる。慣例の補佐剤は、例えば、アルミニウム化合物、脂質含有化合物または不活化マイコバクテリアである。

40

【0103】

一般的に、補佐剤は、それらがヒトに対する投与に好適であることを規定されている、異なる形態であり得る。当該補佐剤のさらなる例は、ミネラル由来または植物由来の油乳濁液、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはリン酸カルシウムといった無機化合物、P40（コリネバクテリウム グラヌロスムの細胞壁から得られる）、モノホスホリル脂質 A（MPL、LPSの派生物）およびムラミルペプチド誘導体といった細菌性

50

の産物および派生物およびこれらの接合物（マイコバクテリウム成分に由来する派生物）ミョウバン、不完全フロインド補助液、リポシン、サポニン、スクアレンなど（例えば、Gupta R. K. et al. (Vaccine 11:293-306 (1993)) and Johnson A. G. (Clin. Microbio l. Rev. 7:277-289を参照すればよい)。

【0104】

本発明の他の実施形態によれば、上記調合物は、10 ng ~ 1 g、好ましくは10 ng ~ 10 mg、特に0.5 μg ~ 200 μgの上記低アレルギー誘発性分子または抗体を包含する。

【0105】

本発明の他の局面は、ヒトまたは動物におけるウイルス感染および/またはアレルギーを処置するかまたは予防する薬剤の製造に対する、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質または抗体の利用に関する。

10

【0106】

上記薬剤は、少なくとも1つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または防腐剤を好ましく、さらに包含する。

【0107】

本発明に係る薬剤は、能動免疫（本発明の低アレルギー誘発性タンパク質および/または分子の投与）および受動免疫（本発明の低アレルギー誘発性タンパク質および/または分子に対して対象化された抗体）に使用され得る。

【0108】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記薬剤は、10 ng ~ 1 g、好ましくは100 ng ~ 10 mg、特に0.5 μg ~ 200 μgの上記低アレルギー誘発性分子、核酸分子、ベクター、宿主または抗体を包含する。

20

【0109】

薬剤は、0.01 kg / kg体重 ~ 5 mg / kg体重、好ましくは0.1 mg / kg体重 ~ 2 mg / kg体重の量において個体に好ましく投与される。

【0110】

特定の投与計画（すなわち、投与量、時間的調節および頻度）は、特定の個体、および個体の病歴に依存する。経験的な考慮すべき事項（例えば、半減期）は、投与量の決定に対して一般的に貢献する。投与の頻度は、治療の過程を通して、決定され得、かつ調整され得る。

30

【0111】

本発明に係る薬剤が投与される個体は、アレルギーになる危険性がある個体または動物であることが好ましい。

【0112】

アレルギー性の状態、障害もしくは疾患を有する対象または有する危険がある対象としては、既存のアレルギー性の状態、またはアレルギー性の状態と関連するかもしくはアレルギー性の状態によって引き起こされる症状の発現に向かう、公知のもしくは疑わしい傾向を有する対象が挙げられる。従って、対象は、活発な慢性アレルギー性の状態、障害または疾患、急性アレルギー性の症状の発見、潜在性のアレルギーの状態、障害または疾患を有する可能性がある。あるアレルギー性の状態は、季節的または地理的な環境因子と関連する。従って、危険な状態にある対象としては、これまでの個人的な履歴もしくは家族歴、ならびに季節もしくは自然界の位置に基づく状態に苦しんでいるという観点から危険な状態にある対象が挙げられるが、上記状態と関連する状態または症状は、患者において現在において顕著になっていなくてもよい。

40

【0113】

本明細書に記載されているような少なくとも1つの低アレルギー誘発性分子を包含する本発明に係る薬剤の対象に対する投与は、上記個体の感作を予防し得るか、またはアレルギーに対する好適な免疫応答を誘導し得る。本発明の薬剤が感作の予防に使用される場合には、当該薬剤は、上記アレルギーとの最初の接触の前に個体に投与されるべきである。

50

従って、新生児および子供に対して本発明に係る薬剤を投与することが好ましい。妊娠中の個体に対する本発明の薬剤の投与は、胎児の子供におけるアレルゲンに対して対象化される抗体の形成を誘導する。T細胞エピトープの欠如に起因して、アレルゲン免疫療法の経過において生じる副作用が、有意に低減され得るか、または完全な回避でさえなされるので、本発明に係る低アレルギー誘発性分子を当該治療に対して使用することは、特に受益者 (b e n e f i c i a r y) である。

【 0 1 1 4 】

本発明のさらに他の局面は、個体におけるアレルギーおよび/またはウイルス感染の診断に対する、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質または抗体の利用に関する。

【 0 1 1 5 】

本発明の他の局面は、薬剤もしくはワクチンにおける担体として、またはウイルス感染、特に風邪の診断用に、ピコルナウイルス科に属するウイルスに由来するウイルスカプシドタンパク質を利用することに関する。

【 0 1 1 6 】

広範に普及するK L H担体タンパク質に対する有益な選択肢として、ピコルナウイルス科に属するウイルスのウイルスカプシドタンパク質が使用され得る。担体は、ペプチド、タンパク質およびポリペプチドか、または他の抗原に対して、化学的に接合され得るか、または組み換え技術を用いて融合され得る。さらにウイルスカプシドタンパク質は、例えば、個体の血清において上記カプシドタンパク質に対して対象化された抗体を検出することに使用され得る。

【 0 1 1 7 】

当該担体の利点1つは、それらに対して融合されるか、または接合される抗原が、免疫系にさらされ得るだけでなく、ライノウイルスのカプシドタンパク質に対する免疫応答もまた誘導され得ることである。従って、当該ワクチン接種は、ライノウイルスに起因する疾患の予防および/または処置に通じる。ウイルスは、ヒトライノウイルス種、特にヒトライノウイルス89および14に属することが好ましい。

【 0 1 1 8 】

本発明の他の局面は、C末端および/またはN末端に切り詰めを有し、かつ実質的にI g E結合能を欠如している、P h l p 5 (G e n e b a n k 番号X7435) から得られるアレルギー誘発性分子に関する。

【 0 1 1 9 】

草本花粉は、花粉症およびアレルギー性喘息の原因である風媒介アレルゲンの最も可能性のある野外における、季節的な供給源の1つである。

【 0 1 2 0 】

アレルギー体質の個体の40%以上が、11群以上に分けられる草本花粉アレルゲンとのI g G反応性を示す。草本花粉アレルギー患者の80%以上は、群5のアレルゲンに反応する。

【 0 1 2 1 】

群5のアレルゲンは、25 - 33 k D aの範囲の分子量を有する、非グリコシル化の高い相同性のあるタンパク質である。種々の群5のアレルゲンは、クローン化されており、および/または性質決定されている。

【 0 1 2 2 】

点変異、列におけるいくつかのアミノ酸の変異、または欠失を導入することによるアレルギー誘発性活性を低下させるための試みは、影響を示さなかった (Schramm G, et al. J Immunol 1999; 162: 2406-1435)。P h l p 5のI g E結合領域 (Flicker S, et al. J Immunol 2000; 165: 3849-3859) は、すでに説明されており、かつ3次元構造が解明されている (Maglio O, et al. 2002. Protein Eng. 15:635-642)。

【 0 1 2 3 】

C末端および/またはN末端において切り詰められ、かつI g E結合能を欠如している、本発明に係るP h l p 5ペプチドは、個体の積極的なワクチン接種に採用され得る

10

20

30

40

50

。

【0124】

本発明の好ましい実施形態によれば、切り詰めた分子は、T細胞エピトープを欠如している。

【0125】

低アレルギー誘発性分子が実質的にT細胞エピトープを欠如している場合に、上記においてすでに要点がまとめられているように、遅発性のアレルゲン免疫療法の副作用は、有意に低減されるか、または回避でさえなされ得る。

【0126】

T細胞エピトープを欠如する切り詰めたPhl p 5分子は、Phl p 5の93～128、98～128、26～53、26～58もしくは252～283番目のアミノ酸、またはこれらの配列変異から構成される。

10

【0127】

特に、これらの切り詰めた分子は、T細胞エピトープを実質的に示さず、かつそれでもなお、野生型アレルゲンに対して対象化された適切な免疫応答を誘発することができる。

【0128】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、低アレルギー誘発性の切り詰めたPhl p 5は、Phl p 5の132～162、217～246もしくは176～212番目のアミノ酸、またはこれらの配列変異から構成される。

【0129】

これらの低アレルギー誘発性分子は、1つ以上のT細胞エピトープを包含するが、IgE結合能を欠如する。

20

【0130】

本発明の他の局面は、C末端および/またはN末端に切り詰めを有し、かつIgE結合能を欠如する、Fel d 1 (Genbank 番号 X62477) から得られる低アレルギー誘発性分子に関する。

【0131】

動物に対するアレルギーは、アレルギー性患者の40%にまで影響を及ぼす。家庭環境において、最も人気のあるペットであるネコおよびイヌに対するアレルギーは、特に流行しており、かつ年中続く症状と結び付けられる。動物アレルゲンは、鱗屑、上皮、唾液、血清または尿に存在する。アレルゲンに対するばくろは、アレルゲンを運ぶ粒子の、直接的な皮膚接触によってか、または吸入によって生じ得る。主要なネコおよびイヌアレルゲンは、広範に存在することを示され、かつペットを所有していない家庭および公共の場(例えば、学校)においてさえ検出され得た。これは、先進国においてペットを飼う家庭の高くかつ増加する数、ならびに運び去られ、かつばらまかれるアレルゲンの高い安定性に助長され得る。

30

【0132】

Fel d 1は、ネコアレルギー体質の患者の90%以上によって認識される、主要なネコアレルゲンとして同定された。Fel d 1は、生物学的機能が分かっていない38kDaの酸性糖タンパク質を表す。Fel d 1は、非共有結合型の等しい2つの異種2量体(さらに、3つのジスルフィド結合によって逆平行に結合された2つのポリペプチド鎖から構成される)からなる。鎖1および鎖2は、3つのエキソンからそれぞれなっている、異なる遺伝子にコードされている。鎖1に対する鎖2の融合タンパク質として発現される、組み換えFel (rFel d 1)は、E. coliにおいて生成されている。この組み換えFel d 1は、野生型アレルゲンの免疫学的性質を完全に模倣することができる。

40

【0133】

主要なネコアレルゲンFel d 1から得られ、かつIgE結合能を欠如するペプチドは、例えば、免疫療法および予防的なアレルギーワクチン接種に好適である。これらのペプチドは、大きなポリペプチドに包含され得るか、またはキーホールリンペットヘモシ

50

アニン（KLH）といった好適な担体タンパク質と結合され得る。本明細書に開示されている Phl p 5 およびアレルゲン由来ペプチドのような、Fel d 1 由来合成ペプチドは、IgG 応答（すなわち、いわゆる“遮断抗体”または“防御抗体”の産生）を誘導することができる。これらの抗体は、アレルゲンである Fel d 1 に対する IgE 結合を妨げる。このようにして、アレルギー性の症状に関する有意な低減が、達成され得る。

【0134】

本発明の好ましい実施形態によれば、切り詰めた分子は、低下した T 細胞反応性を示す。

【0135】

遅発型の副作用を回避するか、または有意に低下させるために、Fel d 1 由来低アレルギー誘発性分子は、本発明において定義されるように低下した T 細胞反応性を示す。

【0136】

切り詰めた Fel d 1 は、Fel d 1 の鎖 1 の 1 ~ 34 もしくは 35 ~ 70 番目のアミノ酸、Fel d 1 の鎖 2 の 1 ~ 34、35 ~ 63 もしくは 64 ~ 92 番目のアミノ酸、またはこれらの配列変異から、好ましく構成される。

【0137】

本発明の他の局面は、以下のものから構成されるか、または当該以下のものを包含する低アレルギー誘発性分子に関する：Der p 2 の 1 ~ 33、21 ~ 51、42 ~ 73、62 ~ 103 もしくは 98 ~ 129 番目のアミノ酸、Der p 7 の 1 ~ 30、20 ~ 50、50 ~ 80、90 ~ 125、125 ~ 155 もしくは 165 ~ 198 番目のアミノ酸、Der p 21 の 1 ~ 35、35 ~ 72、70 ~ 100 もしくは 90 ~ 122 番目のアミノ酸、クローン 30 の 1 ~ 32、15 ~ 48 もしくは 32 ~ 70 番目のアミノ酸、Alt a 1 の 19 ~ 58、59 ~ 95、91 ~ 120 もしくは 121 ~ 157 番目のアミノ酸、Par j 2 の 31 ~ 60、45 ~ 80、60 ~ 96 もしくは 97 ~ 133 番目のアミノ酸、Ole e 1 の 1 ~ 40、36 ~ 66、63 ~ 99、86 ~ 120 もしくは 107 ~ 145 番目のアミノ酸、Fel d 2 の 25 ~ 58、99 ~ 133、154 ~ 183、277 ~ 307、334 ~ 363、373 ~ 402、544 ~ 573、579 ~ 608、58 ~ 99、125 ~ 165、183 ~ 224、224 ~ 261、252 ~ 289、303 ~ 340、416 ~ 457、460 ~ 500 もしくは 501 ~ 542 番目のアミノ酸、Can f 2 の 19 ~ 58、52 ~ 91、82 ~ 119、106 ~ 144 もしくは 139 ~ 180 番目のアミノ酸、Can f 1 の 19 ~ 56、51 ~ 90、78 ~ 118、106 ~ 145 もしくは 135 ~ 174 番目のアミノ酸、Art v 1 の 27 ~ 70、70 ~ 100 もしくは 92 ~ 132 番目のアミノ酸、Amb a 1 の 31 ~ 70、80 ~ 120、125 ~ 155、160 ~ 200、225 ~ 263、264 ~ 300、305 ~ 350 もしくは 356 ~ 396 番目のアミノ酸、Alt a 6 の 1 ~ 34、35 ~ 74、74 ~ 115、125 ~ 165、174 ~ 213、241 ~ 280、294 ~ 333、361 ~ 400 もしくは 401 ~ 438 番目のアミノ酸、Alt a 2 の 1 ~ 40、41 ~ 80、81 ~ 120、121 ~ 160 番目のアミノ酸、またはこれらの断片または配列変異。

【0138】

本発明の他の局面は、低下した IgE 結合能を示し、かつ低下した T 細胞反応性を任意に示す本発明に係る少なくとも 2 つの低アレルギー誘発性分子を包含する、融合タンパク質に関する。

【0139】

アレルゲンから得られ、かつ IgE 結合能を欠如する本発明の低アレルギー誘発性分子は、互いに組み換え的に融合され得るか、または化学的に接合され得る。また、融合タンパク質/ポリペプチドの単一の成分（アレルゲン断片）としての、上記融合タンパク質/ポリペプチドは、IgE 結合能を欠如する。

10

20

30

40

50

【0140】

本発明に係る融合タンパク質は、少なくとも2つの、好ましくは少なくとも3つの、より好ましくは少なくとも4つの、さらに好ましくは少なくとも5つの本発明に係る低アレルギー誘発性分子を包含し得る。また、アレルゲンから得られない他のペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質に対して低アレルギー誘発性分子を融合することは、もちろん可能である。また、これらのペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、個体に投与される場合に、免疫反応を誘導し得るか、または担体としての役割を果たし得るか、または酵素活性を示し得る。本発明に係る融合タンパク質における低アレルギー誘発性分子は、互いに直接に連結され得るか、またはアミノ酸残基から好ましく構成されるリンカーを介して連結され得る。

10

【0141】

融合タンパク質の生成方法は、当該技術において公知であり、かつ Sambrook et al (Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) および Ausubel et al. (Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed; Wiley and Sons, 1995) といった標準的な分子生物学の参考文献に見られ得る。一般的に、融合タンパク質は、好適な宿主T細胞に形質移入するために次に使用される好適な発現ベクターに挿入される融合遺伝子を、まず構築することによって生成される。一般的に、組み換え融合構築物は、プラスミドに組み込まれている所望の配列を結果として生じる、一連の制限酵素消化およびライゲーション反応によって生成される。好適な制限酵素部位が利用できない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは、当業者によって公知のように使用され得、かつ上記に引用した参考文献に記載されている。アレルゲンおよび本来のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、好適なベクターに挿入される前に構築され得るか、またはアレルゲンをコードする配列は、ベクター内にすでに存在する本来のタンパク質をコードする配列に隣接して挿入され得る。ベクター内への配列の挿入は、配列がタンパク質に翻訳されるように、インフレームに挿入されるべきである。適確な制限酵素、リンカーおよび/またはアダプターならびに適確な反応条件が、使用される配列およびクローニングベクターによって変わることは、当業者にとって明白である。しかし、DNA構築物の構築は、当該技術において日常的な操作であり、かつ当業者によって容易に達成され得る。

20

【0142】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも2つの分子が同じアレルゲンから得られる場合に、分子は、野生型アレルゲンにおける断片の順序とは異なる順序において互いに、融合される。

30

【0143】

本発明に係る融合タンパク質は、同じ野生型アレルゲンから得られる少なくとも2つの低アレルギー誘発性分子を包含し得る。当該場合において、単一の分子(アレルゲン断片)は、野生型アレルゲンにおける順序とは異なる順序において互いに融合される。当該方法は、低アレルギー誘発性融合タンパク質における潜在的なIgE結合部位/エпитープの再形成を防ぐ。

【0144】

本発明の他の局面は、本発明に係る低アレルギー誘発性分子および融合タンパク質をコードする核酸分子に関する。

40

【0145】

本発明の核酸分子は、例えば上記分子を組み替えるために、採用され得る。

【0146】

上記核酸分子は、-本発明の他の局面に係る-ベクターに包含され得る。

【0147】

このベクターは、発現ベクターであることが好ましい。

【0148】

本発明の他の局面は、本発明に係る低アレルギー誘発性タンパク質、融合タンパク質ま

50

たは抗体を包含するワクチン調合物に関する。

【0149】

調合物は、少なくとも1つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または防腐剤を、さらに包含することが好ましい。

【0150】

また、K L H (キーホールリンペットヘモシアニン) といった特定の担体の利用は、免疫応答を増強するための、現在における最新の方法の1つである。また、本発明の低アレルギー誘発性分子は、担体としての役割をも果たすウイルスカプシドタンパク質に対して融合され得るか、または接合され得る(上記を参照すればよい)。

【0151】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記調合物は、10 ng ~ 1 g、好ましくは100 ng ~ 10 mg、特に0.5 μg ~ 200 μgの上記低アレルギー誘発性分子または抗体を包含する。

【0152】

ワクチン調合物は、本発明の薬剤として実質的に構成され得る(上記を参照すればよい)。

【0153】

本発明の他の局面は、個体におけるアレルギーを処置するかまたは予防する薬剤の製造に対する、本発明に係る低アレルギー誘発性分子、融合タンパク質または抗体の利用に関する。

【0154】

本発明に係る低アレルギー誘発性分子、融合タンパク質および抗体は、個体のワクチン接種に使用され得る。このワクチン接種は、野生型アレルゲンによって引き起こされるアレルギー性応答を低下させ得るか、または予防し得る。

【0155】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記薬剤は、少なくとも1つの補佐剤、薬学的に受容可能な賦形剤および/または防腐剤を、さらに包含する。

【0156】

本発明に係る薬剤は、10 ng ~ 1 g、好ましくは100 ng ~ 10 mg、特に0.5 μg ~ 200 μgの上記免疫原性分子、核酸分子、ベクター、宿主または抗体を好ましく包含する。

【0157】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、薬剤は、0.01 mg/kg体重 ~ 5 mg/kg体重、好ましくは0.1 mg/kg体重 ~ 2 mg/kg体重の量において個体に投与される。

【0158】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記個体は、アレルギーにかかる危険がある。

【0159】

本発明の他の局面は、個体におけるアレルギーを診断するかまたはアレルギー療法の経過を監視用する、低アレルギー誘発性分子、融合タンパク質または抗体に関する。

【0160】

本発明に係る低アレルギー誘発性分子、融合タンパク質または抗体は、薬剤において使用され得るだけでなく、種々の診断目的に対して好適に採用され得る。例えば、これらの分子および融合タンパク質は、例えば、ヒスタミン放出細胞を包含する個体の試料を上記ポリペプチドにさらすことによって、アレルギーの診断に使用され得る(例えば、Purohit et al., Clin.Exp.Allergy 35 (2005): 186-192を参照すればよい)。さらに、これらの分子、融合タンパク質および抗体は、ポリペプチドアレイ/チップを形成するために、表面上に固定化される。当該アレイは、例えば、多くの個体から取った多くの試料におけるアレルギーを診断するために、高速処理スクリーニングに使用され得る。

【0161】

10

20

30

40

50

本発明は、以下の図面および実施例によってさらに例証されるが、しかしこれらに限定されない。

【0162】

図1Aは、ベクター p89VP1の模式的な概要を示す。

【0163】

図1Bは、pET-17bベクターのマルチクローニング部位および89VP1コード遺伝子のDNA配列を示す。

【0164】

図1Cは、核酸融合を作り出すための3つの可能性の模式的な説明を示す。

【0165】

図2は、精製した89VP1ヒスタグ付きタンパク質を含む、クーマシーブルー染色した12%のSDS-PAGEゲルを示す(レーン1:5μgの分子マーカー;レーン2-5:10μgの89VP1溶出試料)。

【0166】

図3は、14VP1のIgG認識:14VP1および対照の免疫プロットングを示す。ドットは、オートラジオグラフィによって可視化されている(レーン1-6:1:500-1:16000に希釈したウサギ抗14VP1抗血清を用いたインキュベーション;レーン7-12:1:500-1:16000に希釈した免疫前の血清を用いたインキュベーション)。

【0167】

図4は、マウスにおける89VP1特異的なIgG1応答を示す。マウスの群は、箱のそれぞれの上部に示されるように、異なる抗原を用いて免疫化された。89VP1特異的IgG1の力価が、ELISAによって測定され、かつy軸にOD値として表された。結果は、ボックスプロット(box plot)として示され、ここで、数値の50%が箱の中にあり、かつバーの間にある外れ値ではない。箱の中の線は、中央値を示している。

【0168】

図5は、マウスにおけるPhl p 1特異的IgG1応答を示す。マウスの群は、箱のそれぞれの上部に示されるように、異なる抗原を用いて免疫化された。rPhl p 1特異的IgG1の力価は、ELISAによって測定され、かつy軸に光学値(OD 405nm)として表された。光学値は、マウス血清におけるIgG1抗対のレベルと一致している。ボックスプロットとして示される結果は、数値の50%が箱の中にあり、かつバーの間にある外れ値ではなかった。箱の中の線は、中央値を示している。

【0169】

図6は、免疫化マウスにおけるオオアワガエリ花粉抽出物特異的IgG1応答を示す。マウスの群は、箱のそれぞれの上部に示されているように異なる抗原を用いて免疫化された。オオアワガエリ花粉抽出物特異的IgG1の力価は、ELISAによって測定され、かつy軸における光学値(OD 405nm)として表される。光学値は、マウス血清におけるIgG1抗体のレベルと一致する。結果は、ボックスプロットとして示され、ここで、数値の50%が箱の中にあり、かつバーの間にある外れ値ではない。箱の中の線は、中央値を示している。

【0170】

図7は、19人の患者のすべてのrPhl p 1、r98P5およびKLHP5に対する抗血清を用いた前インキュベーションによる、患者のrPhl p 1に対するIgE結合の阻害%の平均を示している。阻害%は、y軸に示されている。結果は、バーとして示されている。

【0171】

図8は、免疫化マウスの脾臓細胞の増殖を示す。箱のそれぞれの上部に示されているように異なる抗原を用いて免疫化されたマウスのT細胞は、ペプチド5、89VP1(89)およびKLHによって刺激された。培地は、基準として使用された。結果は、バーで示される。

10

20

30

40

50

【0172】

図9は、ヒトの血清においてELISA測定によって検出された、14VP1、89VP1およびrPhl p 1に対するIgG1、IgG2、IgG4およびIgA応答を示している。10人の患者の血清が、箱のそれぞれの上部に示されているように、89VP1、14VP1およびrPhl p 1に対して特異的な4つの抗体に関して試験された。秋および冬に取られた血清は、“バーの対”のそれぞれの左側および右側にそれぞれ示されている。力価は、ELISAによって測定され、かつy軸における光学値(OD 405nm)として表される。光学値は、ヒトの血清における抗体のレベルと一致する。結果はボックスプロットとして示され、ここで、数値の50%が箱の中にあり、かつバーの間にある外れ値ではない。箱の中の線は、中央値を示している。

10

【0173】

図10は、アレルギー性患者の血清における抗89Vp1抗体および抗rPhl p 1抗体の検出を示している。Phl p 1アレルギー性患者の5つの血清が、89VP1(各対の左のバー)およびrPhl p 1(各対の右のバー)に対して特異的な7つの抗体に関して試験された。力価はELISAによって測定され、かつy軸において光学値(OD 405nm)として表されている。光学値は、ヒトの血清における抗体のレベルと一致する。結果はボックスプロットとして示され、ここで、数値の50%が箱の中にあり、かつバーの間にある外れ値ではない。箱の中の線は、中央値を示している。

【0174】

図11は、HRV14タンパク質抽出物および精製14VP1に対する抗14VP1IgG結合を示す(レーン1および4:5μgのマーカ;レーン2および5:ウイルス抽出物;レーン3および6:5μgの14VP1)。プロットAおよびBは、抗14VP1免疫血清および免疫前の血清のそれぞれを用いてインキュベーションされた。結合したIgGは、ウエスタンブロッティングによって検出され、かつオートラジオグラフィによって可視化された。

20

【0175】

図12は、HRV14の中和化を示している(レーンA(細胞対照):抗1VP1免疫血清の1:10²-1:10⁸の希釈液を用いたHRV14の前インキュベーション後の細胞(列A1-A6);レーンB:免疫前の血清の1:10²-1:10⁸の希釈液を用いたHRV14の前インキュベーション後の細胞(列B1-B6);レーンC:10のTCID₅₀-10⁶のTCID₅₀のHRV14を用いたインキュベーション後の細胞(列C1-C6);D5:免疫前の血清を用いたインキュベーション後の細胞;D6:免疫血清を用いたインキュベーション後の細胞)。細胞は、すべてのウェルにおいて培養され、かつ3日後にクリスタルバイオレットを用いて着色された。

30

【0176】

図13は、完全なPhl p 5に対する抗ペプチド血清のIgG反応性を示す。Phl p 5に対するIgG反応性(OD値)は、KLH接合ペプチドの1つを用いてそれぞれが免疫化されている6匹のウサギから得られた3つの血清試料(採血1:免疫前の血清;採血2-3:1ヶ月の間隔を置いて回収された血清試料)に関して示されている。

【0177】

図14は、CD203c発現によって検出されるとき、rPhl p 5およびペプチド混合物のアレルギー誘発性活性を示す。Phl p 5に対するアレルギー性の3人の患者に由来するヘパリン添加血液は、組み換えアレルゲン、Phl p 5由来ペプチドの等モル濃度混合物、抗IgEまたは対照緩衝液(co、x軸)の10⁻⁴から10μg/mLまでの希釈系列とともにインキュベーションされた。細胞は、それからCD203c mAbを用いて染色され、かつFACSscanにおいてCD203c発現に関して分析された。刺激指標(SI)は、y軸に表示されている。

40

【0178】

図15は、低いリンパ球増殖応答を誘導するPhl p 5由来ペプチドの同定を示す。オオアワガエリ花粉アレルギー性患者からのPBMCは、異なる濃度のペプチド、およ

50

び対照を目的としたインターロイキン - 2 (x 軸) を用いて刺激された。刺激指標 (S I) は、 y 軸において示されている。

【 0 1 7 9 】

図 1 6 は、ウサギにおける F e l d 1 特異的 I g G 免疫応答を誘導する F e l d 1 由来合成ペプチドを示す。6匹のウサギが、K L H 接合 F e l d 1 由来合成ペプチドまたは非接合 r F e l d 1 を用いて免疫化され、かつ 3 - 4 回の出血が、1ヶ月の間隔をおいて引き出された。免疫前の血清および抗血清の E L I S A プレート結合 r F e l d 1 に対する I g G 反応性が、光学濃度 (O . D . 値、 y 軸) として示されている。

【 0 1 8 0 】

図 1 7 は、アレルギー性患者の抗塩基球上における C D 6 3 および C D 2 0 3 c によって決定されるとき、F e l d 1 由来合成ペプチドの低いアレルギー誘発性活性を示す。5人のネコアレルギー性患者のからの P B M C は、F e l d 1 (閉じた箱) または F e l d 1 由来合成ペプチドの混合物 (開いた箱) の希釈系列を用いてインキュベーションされた (x 軸) 。また、患者 R R に関して、P B M C は、単一の成分として、F e l d 1 由来合成ペプチドの希釈系列を用いて検証された。表面マーカーである C D 2 0 3 c および C D 6 3 の発現の誘導は、蛍光強度の平均値として測定され、かつ y 軸に示される刺激指標を算出した。

【 0 1 8 1 】

図 1 8 は、K L H 連結 B e t v 1 由来ペプチドを用いた処理が、感作したマウスにおいて r B e t v 1 に対してリンパ球増殖応答を誘導することを示す。T 細胞増殖は、組み換えカンバ花粉アレルギー B e t v 1 (白バー) 、 K L H (黒バー) 、またはペプチド混合物 (灰色バー) を用いたインビトロ刺激の後に、脾臓細胞において測定された。バーは、マウスの異なる群に関する刺激指標の平均値 (S I ± S D) を表している。

【 0 1 8 2 】

図 1 9 は、感作後において r B e t v 1 に対するリンパ球増殖応答を低下させる K L H 連結 B e t v 1 由来ペプチドを用いた天然のマウスの予防的ワクチン接種を示している。

【 0 1 8 3 】

図 2 0 は、B e t v 1 特異的 I g G 応答を誘導し、かつ完全なアレルギーによるアレルギー特異的 I g G 応答の誘導を開始する K L H 連結 B e t v 1 由来ペプチドを用いた天然のマウスの予防的ワクチン接種を示す。B e t v 1 に対する I g G 応答 (O D 値 : y 軸) は、異なる時点 (x 軸) において、4つの処置群において測定された。

【 0 1 8 4 】

図 2 1 は、I g E 反応性の比較を示す : P h l p 5 由来ペプチド (1、2) および異形 (1 a、2 b) の I g E 結合能が、7人の草本花粉アレルギー患者からの血清 (p 1 - p 7) および非アトピー性の個体からの血清 (N H S) を用いた、0 . 2 g / ドットを適用するドットプロットアッセイにおいて決定された。r P h l p 5 は、陽性対照として使用され、H S A は、陰性対照として使用された。結合した I g E は、1 2 5 I - 標識抗ヒト I g E を用いて検出された。

【 0 1 8 5 】

図 2 2 は、P h l p 5 由来ペプチド (1、2) および異形 (1 a、2 b) のリンパ球増殖応答を示す。草本花粉アレルギー性患者からの P B M C は、異なる濃度のペプチド、および対照を目的とした等モル濃度の r P h l p 5 を用いて刺激された。刺激指標 (S I) は、y 軸において示されている。

【 0 1 8 6 】

図 2 3 は、抗 V P 1 抗体の交差防御を示している。

【 0 1 8 7 】

〔実施例〕

(実施例 1 : ベクター p 8 9 V P 1 の構築)

10

20

30

40

50

ウイルスストック試料は、Q I A a m p ウイルスRNAキット (Q u i a g e n、ドイツ) による細胞培養上清からのRNA抽出の後に、最終濃度が0.01 U / μ l になるまで1 μ l のR N a s e 阻害剤 (B o e h r i n g e r 株式会社 G m b h) を添加することによって、R T - P C R 用に調製された。

【0188】

プラスミド p 8 9 V P 1 (図 1 A) は、p E T - 1 7 b のマルチクローニング部位のN d e I / E c o R I 断片を、ヒトライノウイルス89株のVP1タンパク質 (8 9 P V 1) コードするc D N A 配列と置き換えることによって構築された。(p E T - 1 7 b における) N d e I およびE c o R I の制限酵素認識部位は、5' 末端においてA T G、3' 末端において6 ヒスチジンに続いてストップコドンT G A を有するA s e I / E c o R I 連結89VP1の挿入に使用された(図 1 B)。

10

【0189】

p E T - 1 7 b における89VP1の挿入は、ヌクレオチド配列決定によって確認された。

【0190】

N d e I 部位の代えてN d e I / A s e I 融合した後に、C A T A A T は、作り出され、かつあらゆる利用可能な酵素を用いて切断できなくなった。このため、上記部位は、A f l I I の制限酵素認識部位であるC T T A A G に変異された。さらなるアレルゲン断片を挿入するために、3' 末端におけるA C C G T T 配列が、A g e I の制限酵素認識部位であるA C C G G T に変異された。アミノ酸配列は、89VP1のヌクレオチド配列以下

20

【0191】

上記A f l I I 制限酵素認識部位およびA g e I 制限酵素認識部位は、Q u i c k c h a n g e 部位変異生成キット (S t r a t a g e n e) を用いて作り出された。

【0192】

このようにして、遺伝子断片に対するc D N A は、図 1 C に示されるように、5' 末端において (A f l I I を用いて) か、または3' 末端において (A g e I を用いて) 残っている制限酵素認識部位にか、または両方の部位に簡易精製用に挿入され得る。組み換えアレルゲン断片は、89VP1のN末端および/またはC末端において発現される。

【0193】

30

【表 27】

表I:クローニングおよび変異生成プライマー(5'から3'に向けて)

89vp1 クローニング		配列番号
89VP1forward	CGGAATTCATTAATATGAACCCAGTTGAAAATTATATAG ATAGTGTATTA	1
89VP1 reverse	CGATTAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGACGTTTGTA ACGGTAA	2
変異生成		
Afl II forward	CTTTAAGAAGGAGATATACTTAAGATGAACCCAGTTG	3
Afl II reverse	CAACTGGGTTTCATCTTAAGTATATCTCCTTCTTAAAG	4
AgeI forward	CCTGATGTTTTTACCGGTACAAACGTCCACCAC	5
AgeI reverse	GTGGTGGACGTTTGTACCGGTAAAAACATCAGG	6

10

20

【0194】

(実施例2:89VP1-アレルゲン断片融合タンパク質を発現する構築物のクローニング)

上述した方法は、C末端のPhl p 1アレルゲン断片、すなわちペプチド 5 (CVR Y T T E G G T K T E A E D V I P E G W K A D T A Y E S K ; M. Focke et al. FA SEB J (2001) 15:2042-4) に対して例証された。ペプチド 5のDNA配列は、鋳型としてPhl p 1のcDNA (GenBank: X78813) を用いたPCR (プライマー1 Phl p 1 forward 5' - CGCGCTTAAGATGGTCCGCTACACCACCGAGGGC - 3' (配列番号7) : Phl p 1 reverse 5' - CGCGCTTAAGCTTGGACTCGTAGGCGGTGTCGGC - 3' (配列番号8)) によって増幅された。PCR産物は、p89VP1ベクターのAfl II制限酵素認識部位に挿入され、かつ結果構築物は、ベクターp89P5および遺伝子産物r89P5と呼ばれる。

30

【0195】

(実施例3:89VP1ペプチド 5-融合タンパク質および()VP1の発現および精製)

89VP1またはr89P5(組み換え89VP1-ペプチド 5融合タンパク質)の発現を達成するために、プラスミドは、E. coli BL21(DE3)に形質転換された。形質転換したE. coli細胞は、100mg/lのアンプシリンを含有する250mlのLB培地において、37において、0.4の光学濃度(600nm)になるまで培養され、かつタンパク質発現が、イソプロピル-ベータ-D-チオガラクトシダーゼ(IPTG)を1mMの最終濃度になるまで加えることによって、誘導された。E. coli細胞は、4時間後に、3500rpmにおいて、4における10分間の遠心分離によって回収された。精製は、Qiagen Ni-NTAおよびカラムを用いて、Qiagenの手順を用いて実施された。細胞ペレットは、5mlの6Mのグアジニン塩酸塩

40

50

において1時間の変性条件下において再懸濁された。遠心分離(20分間、10000×g)の後に、上清は、1mlのNi-NTAを用いて追加の時間においてインキュベーションされた。それから、懸濁液は、カラムに装填され、5mlの洗浄緩衝液(8Mの尿素、pH6.3)を用いて2回洗浄され、かつそれから4mlの溶出緩衝液(8Mの尿素、pH3.5)を用いて溶出された。復元は、尿素のモル濃度を減少させることを伴う透析の後に、達成された。

【0196】

精製タンパク質の精製度および大きさは、図2に示されるように、SDS-PAGEによって分析された。タンパク質のバンドは、予測されたタンパク質サイズである33.6kDと関連した。また、タンパク質の完全性は、抗ヒスチジン抗体を用いたウエスタンブロッティングによって確認された。

10

【0197】

(実施例4:免疫プロットによる14VP1特異的ウサギ抗体の検出)

5μgの14VP1(ヒトライノウイルス14株のVP1タンパク質)および対照(Betv1、Phlp5、BSA)は、ニトロセルロース膜条辺の上にドット化された。これらの条辺は、ウサギ抗14VP1抗血清(レーン1-6)および免疫前の血清(レーン8-12)の希釈物にさらされた。結合したウサギIgG抗体は、1:1000の125I標識ロバ抗ウサギIgGを用いて検出され、かつオートラジオグラフィーによって可視化された(図3)。

【0198】

ウサギ抗14VP1血清のドットプロット分析は、14VP1が強い免疫原性を有することを示す。IgG抗体は、免疫前の血清およびBetv1、Phlp5およびBSAの対照とは対照的に、血清の1:16000の希釈物を用いてもまだ検出された。

20

【0199】

(実施例5:ELISAによって決定される、免疫マウスにおける89VP1特異的な抗体反応)

89VP1の免疫原性、およびペプチド5に対する担体として働く能力を決定するために、6週齢のメスのblab/cマウス(Charles River)の群は、以下の抗原:KLH、KLHマレイミド結合ペプチド5(KLHP5)およびKLHEDC結合ペプチド5(KLHP5edc)を用いて免疫された。化学結合は、イムジェクト(Imject)マレイミドmcKLHキットおよびイムジェクト免疫原EDCキット(Pierce)を用いて作製された。マレイミド基は、SH基と反応し、かつEDCは、カルボキシル基およびアミノ基と反応して、安定な結合を形成する。4匹のマウスの群は、89VP1、r89P5および89P5edcを用いて免疫され、かつ2匹のマウスは、ペプチド5のみを用いて免疫された(それぞれ5μg、および水酸化アルミニウムを用いて1:2に混合された)。マウスは、3週間の間隔を置いて皮下に免疫され、かつ尾の血管から採血された。89VP1特異的IgG1抗体レベルは、ELISAによって決定された。

30

【0200】

ELISAプレート(Nunc)は、5μg/mlの89VP1を用いて表面を被われた。マウスの抗89VP1、抗r89P5およびペプチド5血清は、1:500に希釈された。結合したIgG1は、1:1000のラットの抗マウスIgG1(BD Pharmingen)を用いて検出され、かつそれからPOX結合したヤギ抗ラットIgG(Amersham Bioscience)を用いて検出された。光学濃度(OD504nm)は、y軸に表示されており、かつマウス血清においてIgG1抗体のレベルと関連している(図4)。

40

【0201】

KLHP5、KLHP5edc、KLHおよびペプチド5は、対照として使用された。IgG1抗体は、89VP1(89VP1、89P5edcおよびr89P5)を注入したマウスの免疫化の間において、増加する力価とともに検出された。89VP1、r8

50

9 P 5 および K L H P 5 を用いて免疫したウサギは、同じ結果を示す。

【0202】

(実施例6：ELISAによって決定される、免疫マウスにおける r P h l p 1 特異的な抗体応答)

r 8 9 P 5 を用いた免疫化が、完全な P h l p 1 と反応する I g G 抗体を誘導するか否かを評価するために、同じ方法および同じマウス血清が実施例5に記載されるように使用された。ELISAプレートは、5 μ g / m l の r P h l p 1 を用いて被われ、かつ I g G 1 抗体の力価が決定された(図5)。

【0203】

K L H または 8 9 V P 1 のいずれかと結合された P h l p 1 由来抗体のすべては、免疫化の間において増加する応答を伴って P h l p 1 特異的 I g G 1 抗体を誘導した。r 8 9 P 5 および K L H P 5 を用いて免疫したウサギは、同じ結果を示す。

【0204】

(実施例7：オオアワガエリ抽出物特異的な I g G 1 抗体の ELISA 検出)

マウスの免疫化および ELISA 分析は、項5に記載されているように実施された。完全なオオアワガエリ花粉抽出物は、ELISAプレート上にまぶされ、かつ I g G 1 抗体の力価が決定された(図6)。

【0205】

3回の免疫化の後に、抽出物特異的 I g G 1 抗体が、ペプチド 5 を用いて免疫したマウスにおいて検出された。

【0206】

(実施例8：ウサギ抗 r 8 9 P 5 が r P h l p 1 に対する患者の I g E 結合を阻害する)

アレルギー性患者の I g E 抗体の r P h l p 1 に対する結合を阻害するペプチド由来ウサギ I g の能力を決定するために、ELISAプレートは、1 μ g / m l の r P h l p 1 を用いて被われ、洗浄され、かつブロッキングされた。プレートは、1 : 1 0 0 に希釈したウサギ抗ペプチド(8 9 P 5、K L H P 5)、ウサギ抗 r P h l p 1 とともに、かつ対照を目的として対応する免疫前の血清とともに、前インキュベーションされた。洗浄の後に、プレートは、P h l p 1 アレルギー性患者からのヒト血清(1 : 3 に希釈)とともにインキュベーションされ、かつ結合した I g E は、マウス抗ヒト I g E (P h a r m i n g e n、1 : 1 0 0 0) を用いて、かつそれから P O X 結合ヒツジ抗マウス I g G (A m a e r s h a m B i o s c i e n c e) を用いて検出された。抗ペプチド血清をとまなう前インキュベーションによって達成された I g E 結合の阻害%は、以下のように(1 0 0 O D_i / O D_p × 1 0 0) 算出された。

【0207】

O D_i および O D_p は、ウサギ免疫血清およびウサギ免疫前の血清のそれぞれを用いた前インキュベーション後における吸光度を表している。表2は、19人のアレルギー性患者の I g E の完全な P h l p 1 に対する結合を阻害する、抗 P h l p 1 ペプチド抗体の能力を示している。図7は、抗 r P h l p 1 免疫血清、抗 r 8 9 P 5 免疫血清および抗 K L H P 5 免疫血清のすべての、阻害平均値(%をもって)を表示している。抗ペプチド血清は、r P h l p 1 よりも遥かに良好に I g E 結合を遮断した。阻害に関する能力は、8 9 P 5 および K L H P 5 とほとんど一緒である。表2は、19人の患者の阻害(%をもって)を示す。

【0208】

10

20

30

40

【表 2 8】

表2:ウサギ抗rPhl p 1、r89P5および抗KLHP5抗血清とのインキュベーションの後における、19人の患者のrPhl p 1に対するIgE結合の阻害%

患者	阻害%		
	rPhl p 1	r89P5	KLHP5
1	32.343	68.291	68.213
2	29.373	64.915	61.509
3	10.367	59.469	66.270
4	28.087	73.906	71.330
5	13.808	49.358	45.372
6	22.597	66.259	67.331
7	5.375	26.667	18.902
8	22.478	42.612	47.979
9	5.019	39.822	56.837
10	13.756	53.878	63.047
11	26.444	58.430	57.944
12	25.795	67.243	62.458
13	41.330	75.694	79.517
14	35.543	85.714	87.012
15	45.796	84.255	75.185
16	32.641	76.508	77.412
17	26.483	63.171	47.735
18	19.229	85.750	86.642
19	31.142	62.428	71.086

10

20

30

40

50

【0209】

(実施例9:抗原刺激後におけるマウス脾臓細胞のT細胞増殖)

3匹のマウスの群は、KLH、KLHP5およびKLHPedcを用いて免疫された。4匹のマウスの群は、89VP1、r89P5および89P5edcを用いて4回免疫され、かつ2匹のマウスは、ペプチド5のみを用いて免疫された(それぞれ5 μ g)。脾臓細胞は、最後の免疫の後における10日目に採られ、かつ単一の培養細胞は、ペプチド5(P5)、89VP1、KLH、Con Aならびに陽性対照および陰性対照として培地をそれぞれ用いて、96ウェルプレートにおいて3つ1組にして、刺激された。4日後に、0.5 μ Ciの放射性の[³H]チミジンが、各ウェルに加えられた。それから、細胞は、15時間後に単一フィルタプレート上において、パッカードセルハーベスター(Packard Cell Harvester)を用いて回収された。細胞関連放射性

は、ベータ計測器を用いて測定された。刺激は、予想された場合において誘導され、かつ y 軸に示されている。刺激に使用された抗原は、x 軸に示されている。各箱は、マウスの免疫に使用された抗原のデータを表している (図 8)。2 以上のすべての値は、陽性として数える。K L H および K L H P 5 の免疫マウスは、K L H を用いて刺激された場合のみ陽性であり、かつペプチド 5 マウスは、完全に陰性である。また、K L H P 5 d e c 群は、E L I S A の結果と対応して陰性である。r 8 9 P 5、8 9 P 5 d e c および 8 9 V P 1 の免疫マウスから得られる細胞は、8 9 V P 1 を用いた刺激の後にのみ増殖した。未処置の対照マウスは、すべての場合において増殖を示さない。これらの結果は、T 細胞エピトープが、担体 8 9 V P 1 によって提供され、かつペプチド 5 によって提供されないことを示している。

10

【0210】

(実施例 10 : 秋および冬に得られたヒト血清における、14VP1 -、89VP1 - および r P h l p 1 - 特異的抗体の E L I S A による検出)

無作為に選ばれた個人の 5 つのヒト血清は、秋に採られ、かつ 5 つは、冬に採られた。14VP1、89VP1 および r P h l p 1 に対する I g G 1、I g G 2、I g G 4 および I g A の抗体レベルは、実施例 5 に記載されたように E L I S A によって決定された。ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 4 および I g A 4 は、1 : 2000 の P O X 結合ヒツジ抗マウス I g G (A m e r s h a m B i o s c i e n c e) を用いて、(B D P h a r m i n g e n) 1 : 1000 を検出された。秋および冬に採られた血清の抗 14VP1 および 89VP1 の I g G 1 の高い力価を検出することができた (図 9)。抗 r P h l p 1 の I g G 1 抗体の力価は、非常に低かった。I g G 2、I g G 4 および I g A 抗体を、すべての場合において、非常に低いレベルにおいて検出することができた。異なる H R V 株の V P 1 タンパク質は、近縁関係にあり、かつその交差反応性が他の研究において示されている。

20

【0211】

(実施例 11 : P h l p 1 アレルギー性患者の抗 89VP1 抗体および抗 r P h l p 1 抗体)

5 人の P h l p 1 アレルギー性患者の血清が採られ、かつ E L I S A 実験が、実施例 5 に記載のように実施された。E L I S A プレートは、r P h l p 1 および 89VP1 を用いて被われ、かつ特異的な I g M、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A および I g E 抗体の力価が、決定された (図 10)。抗 r P h l p 1 の I g G 1 抗体よりも抗 89VP1 I g G 1 の方が、検出され得た。

30

【0212】

(実施例 12 : 完全なウイルスと結合する抗 14VP1 抗体のウエスタンブロッティングによる検出)

14VP1 を注入したウサギの血清の、完全なウイルスに対する抗体結合は、完全な H R V 14 ウイルス (レーン 2 および 5) および対照として 5 μ g の精製 14VP1 (レーン 3 および 6) を用いて確認された。ウイルス抽出物は、12% の S D S - P A G E によって分離され、かつニトロセルロース膜上にプロットされた。1 : 500 のウサギ抗 14VP1 抗血清 (レーン 1 - 3) および 1 : 500 の免疫前の血清 (レーン 4 - 6) が H R V 14 および 14VP1 に対する結合に関して試験された。結合した I g G は、125I 標識された口バ抗ウサギ抗体を用いて検出され、かつオートラジオグラフィーによって可視化された (図 11)。

40

【0213】

14VP1 抗血清の結合は、14VP1 と同じサイズ (33.6 kD) において検出され得た。

【0214】

(実施例 13 : 原型を保ったヒトライノウイルス 14 の抗 14VP1 抗体による中和)

H R V 14 の組織培養投与量 50 (T D C 50) が決定された。従って、1% F S C および 40 mM の M g C l ₂ の M E M - E a g l e における、1 : 10² - 1 : 10⁸ のウ

50

ウイルス希釈が実施され、かつHeLa Ohio細胞とともに、24ウェルプレート、34、加湿した5%CO₂雰囲気において、3日間培養された。また、ウイルスなしの対照が播かれた。

【0215】

ウイルスの細胞毒性効果が、3日後にクリスタルバイオレットを用いて可視化され、かつTCID₅₀(50%の細胞が死ぬ場合の希釈率)が、算出された。

【0216】

列AおよびBにおける血清希釈物およびウイルス(100のTCID₅₀)が、34においてインキュベーションされた。2時間後に、細胞は、すべてのウェルに播かれた。D5およびD6は血清対照である。実験概要は、図12に示されている。抗体の中和化効果は、クリスタルバイオレットを用いて3日後に検出された(図12)。

10

【0217】

(実施例14:Phl p 5由来合成ペプチドの特性)

ペプチドは、アプライドバイオシステム(Applied Biosystem)ペプチド合成機モデル433Aにおいて、HBTU活性化(0.1mmolの小規模サイクル)を伴うFmocストラテジーを用いて、Focke et al. Faseb J (2001) 15:2042に記載のように合成された。Phl p 1アレルゲンの詳細な分析の後に、溶媒にさらされるアミノ酸が豊富な、長さが31アミノ酸(P1:3026ダルトン)から38アミノ酸(P5:3853ダルトン)の範囲にある6つのPhl p 5由来ペプチドが、調製された(表3)。

20

【0218】

これらのペプチドは、4.32から8.98の間の等電点を有しており、かつこれらのうちの3つ(ペプチド3、4および6)は、ヒトT細胞エピトープを含んでいる。

【0219】

表3.非アレルギー誘発性のPhl p 5由来合成ペプチドの特性。位置(Phl p 5分子に対する)、配列、長さ、分子量(MW)、等電点およびPhl p 5由来ペプチドのT細胞エピトープの存在が表示されている。結合を容易にするために加えられたシステイン残基は、太字および下線をもって印を付けられている。

【0220】

【表 2 9】

表3

	アミノ酸入位置	配列	アミノ酸長	MW	pI	T細胞 エヒトープ
ペプチド 1 (配列番号9)	98-128	<u>C</u> GAASNKAF <u>A</u> EGLSGEPKGA AESSKAALTSK	32	3026	8,16	-
ペプチド 2 (配列番号10)	26-58	ADLGYPATPAAPAAGYTPA TPAAPAEAAPAG <u>K</u> C	34	3068	4,37	-
ペプチド 3 (配列番号11)	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKYDA YVATLSEAL <u>R</u> C	32	3482	6,29	+
ペプチド 4 (配列番号12)	217-246	<u>C</u> EAAFNDAIKASTGGAYESY KFIPALEAAVK	31	3236	4,87	+
ペプチド 5 (配列番号13)	252-283	TVATAPEVKYTVFETALKKA ITAMSEAQKA <u>K</u> C	33	3501	8,98	-
ペプチド 6 (配列番号14)	176-212	<u>C</u> AEEVKVIPAGELQVIEKVD AAFKVAATAANAAPANDK	38	3853	4,66	+

10

20

【0221】

(実施例15: Phl p 5由来ペプチドは、I g E反応性およびアレルギー誘発性活性に乏しい)

30

15.1. I g E反応性の欠如

6つのPhl p 5由来ペプチドのI g E反応性を分析するために、単離したPhl p 5由来ペプチドおよびKLH結合Phl p 5由来ペプチドは、29人の草本花粉アレルギー性患者からの血清を用いたELISAによって、I g E結合能に関して完全なrPhl p 5と比較された(表4)。

【0222】

表4: 29人の草本花粉アレルギー性患者および非アレルギー誘発性の対照の血清学的特性。性別、年齢、総血清I g Eレベル(kU/L)、オオアワガエリ抽出物特異的I g E(kUA/L)、rPhl p 5に対して特異的なI g E抗体ならびに6つの単離したペプチド(P1-P6)および6つのKLH結合ペプチド(KLH-P1-KLH-P6)がELISAによって測定され、かつODs(光学濃度)が示されている。ダッシュ記号は、単離したペプチドおよびおよびKLH結合ペプチドに対するI g E反応性の欠如を示している。

40

【0223】

【表 3 0】

表4

患者	性別	年齢	総IgE (kU/L)	IgEオオアワガエリ (kUA/L)	rPhl p 5	IgE (OD)						
						P1	P2	P3	P4	P5	P6	
1	m	29	140.0	25.90	1.437	-	-	-	-	-	-	
2	m	39	76.2	10.50	0.456	-	-	-	-	-	-	
3	f	29	100.0	33.50	0.699	-	-	-	-	-	-	10
4	f	31	261.0	28.10	0.930	-	-	-	-	-	-	
5	m	33	380.0	32.00	0.545	-	-	-	-	-	-	
6	f	31	278.0	37.00	1.720	-	-	-	-	-	-	
7	m	43	128.0	20.70	1.118	-	-	-	-	-	-	
8	f	29	200.0	18.40	0.489	-	-	-	-	-	-	
9	f	34	76.6	18.70	0.571	-	-	-	-	-	-	
10	m	35	144.0	39.30	0.157	-	-	-	-	-	-	
11	f	33	79.2	29.60	0.574	-	-	-	-	-	-	
12	f	30	30.3	10.70	0.350	-	-	-	-	-	-	20
13	f	34	106.0	20.80	0.395	-	-	-	-	-	-	
14	f	52	448.0	43.00	1.320	-	-	-	-	-	-	
15	f	25	294.0	95.50	1.638	-	-	-	-	-	-	
16	m	30	471.0	82.60	0.752	-	-	-	-	-	-	
17	m	44	2000.0	100.00	2.500	-	-	-	-	-	-	
18	f	30	168.0	66.60	0.806	-	-	-	-	-	-	
19	m	42	512.0	50.30	1.175	-	-	-	-	-	-	
20	f	28	253.0	54.00	1.954	-	-	-	-	-	-	
21	m	30	315.0	100.00	1.054	-	-	-	-	-	-	30
22	f	42	401.0	89.50	2.297	-	-	-	-	-	-	
23	f	28	100.0	82.10	1.802	-	-	-	-	-	-	
24	m	42	52.5	3.52	0.885	-	-	-	-	-	-	
25	m	34	136.0	6.11	2.036	-	-	-	-	-	-	
26	m	30	31.2	9.17	1.909	-	-	-	-	-	-	
27	m	36	24.9	4.34	0.233	-	-	-	-	-	-	
28	f	41	41.5	2.19	0.281	-	-	-	-	-	-	
29	f	51	370.0	90.10	1.296	-	-	-	-	-	-	
NHS	m	39	0.0	0.00	0.065	-	-	-	-	-	-	40

【 0 2 2 4】

ELISAプレート(Nunc Maxisorp、デンマーク)は、Phl p 5由来ペプチド(5 µg/ml)または対照(5 µg/ml)を用いて被われ、洗浄され、かつブロッキングされた。続いて、プレートは、29人の草本花粉アレルギー性患者からの、および非アトピー性の個人からの、1:3に希釈した血清を用いて、4において夜通しインキュベーションされた。アレルギー性の鼻結膜炎および/または喘息にかかっている草本花粉アレルギー性患者は、季節的な草本花粉症に関して表示している既往歴に従って選択され、かつオオアワガエリ抽出物を用いた皮膚プリックテスト、および血清学的

なCAP-FEIA (Pharmacia Diagnostics、ウプサラ、スウェーデン) 試験によって性質決定された。血清における総IgEレベルは、CAP測定 (Pharmacia) によって決定された。rPhl p 5に対して特異的なIgE抗体は、ELISAによって決定された。29人の草本アレルギー性患者および非アトピー性の個人からの血清が、IgE競合研究に使用された。草本花粉アレルギー性患者の群は、平均年齢35歳(25-51歳の範囲にある)の13人の男性および16人の女性から構成された(表4)。

【0225】

結合したIgE抗体は、1:1000に希釈したアルカリ性ホスファターゼ結合マウスモノクロナル抗ヒトIgE抗体 (Pharmingén、CA) を用いて検出された。

10

【0226】

総IgEレベルおよび草本花粉抽出物特異的IgEは、それぞれ24.9-2000kU/L(平均値:262.7)および2.2-100kUA/L(平均値:41.5)の範囲であった。すべての患者は、0.157-2.530ODユニット(平均値:1.082ODユニット)の範囲において、rPhl p 5特異的IgE抗体を有していたが、29人の患者は、あらゆるペプチドまたはペプチドの等モル濃度の混合物に対して、IgE反応性を示さなかった。この結果は、血清が、6つのPhl p 5由来ペプチドのあらゆるものに対する特異性を有する検出可能なIgE抗体を含んでいなかったことを証明している。

【0227】

15.2. 好塩基球におけるCD203c発現によって検出されるようなペプチドの低下したアレルギー誘発性活性:好塩基球活性化およびフローサイトメトリー:

CD203cの上方制御は、アレルギー誘導好塩基球の活性および脱顆粒に対する代用マーカーとして説明されている(Hauswirth et al., J Allergy Clin Immunol 2002; 110:102)。従って、草本花粉アレルギー性患者の好塩基球に対するCD203cを測定することによる、完全なrPhl p 5アレルギーおよびペプチドの等モル濃度の混合物のアレルギー誘発性活性は、比較された。

20

【0228】

末梢血細胞は、インフォームドコンセントを得た後に、3人のアレルギー性のドナーから得られた。ヘパリンを添加した血液の部分標本(100μl)は、組み換えアレルギーの希釈系列(10-4から10μg/ml)、抗IgE抗体(1μg/ml)、または対照緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水:PBS)とともに37°Cにおいて15分間に渡ってインキュベーションされた。インキュベーションの後に、細胞は、20mMのEDTAを含有するPBSにおいて洗浄された。それから、細胞は、10μlのPE接合CD203c mAb 97A6とともに、室温(RT)において15分間に渡ってインキュベーションされた。その後、赤血球が、2mlのFACS(商標)Lysing Solutionを用いて溶解された。それから、細胞は、洗浄され、PBSに再懸濁され、かつPaint-a-Gate Softwareを用いたFACSscan(Becton Dickinson)における2色フローサイトメトリーによって分析された。CD203cのアレルギー誘導上方制御は、刺激した細胞(MFISstim)および未刺激の細胞(MFIcontrol)を用いて得られた蛍光強度(MFIS)の平均値から算出され、かつ刺激指標(MFISstim:MFIControl)として表された。2.0のSI(2倍以上の上方制御)は、特異的応答と見做された。

30

40

【0229】

図14に示されるように、完全なrPhl p 5が、感作された個人における末梢血においてCD203cの発現の、用量依存的な(10-4から10μg/ml)増加を示す一方において、ペプチドの等モル濃度の混合物は、効果を示さないことが見出された。草本花粉アレルギー性患者からの好塩基球におけるCD203cの決定は、アレルギー誘発活性がPhl p 5由来ペプチドを用いて観察され得ないことを示している。

【0230】

50

(実施例 16 : P h l p 5 由来ペプチドを用いた免疫化は、異なる草本種からの r P h l p 5 および天然アレルゲンと反応性の I g G 抗体を誘導する)

16.1. 組み換えアレルゲンおよびアレルゲン抽出物

精製組み換え P h l p 5 は、Vrtala et al. J of Immunol (1993) 151:4773-4781 に記載のように、E . c o l i において発現された。

【0231】

フレウム プラテンセ、ロリウム ペレンネ、ポア プラテンシス、ダクティリス グロメラタ、セカーレ ケレアーレ、トゥリティウム アエスティブム、アベナ サティバ、ホルデウム ブルガレ、アントクサントウム オドラトゥムからの草本花粉は、A l l e r g o n P h a r m a c i a (スウェーデン) から取得され、かつ水性花粉抽出物は、Vrtala et al., Int Arch Allergy Immunol (1993) 102:160-9. に記載のように調製された。

10

【0232】

16.2. ウサギの免疫化

H P L C 精製ペプチドは、製造者の助言に従って K L H に対して結合され、かつコンジュゲーションキット (C o n j u c a t i o n K i t) (S i g m a 、アメリカ) を用いて精製された。

【0233】

ウサギは、フロインド完全補助液およびフロインド不完全補助液を用いて、K L H 接合ペプチド (2 0 0 μ g / 注入) のそれぞれ、ならびに対照の目的として完全な r P h l p 5 を用いて免疫された。血清試料は、4 週間の間隔を置いて得られた。

20

【0234】

16.3. 異なる草本種からの完全な r P h l p 5 および天然アレルゲンとのウサギ抗体の反応性

K L H 結合ペプチドを用いて免疫化した後に誘導される抗体が、r P h l p 5 、天然の P h l p 5 および他の草本花粉種からの P h l p 5 関連草本花粉アレルゲンを認識したか否かを調べるために、E L I S A 試験が実施された。E L I S A 検出に関して、プレート (N u n c M a x i s o r p 、デンマーク) は、花粉アレルゲン抽出物 (1 0 0 μ g / m l : フレウム プラテンセ、ロリウム ペレンネ、ポア プラテンシス、ダクティリス グロメラタ、セカーレ ケレアーレ、トゥリティウム アエスティブム、アベナ サティバ、ホルデウム ブルガレ、アントクサントウム オドラトゥム) または精製組み換えアレルゲン (5 μ g / m l : r P h l p 5) を用いて被われた。E L I S A プレートは、洗浄され、かつブロッキングされ、続いて 1 : 2 5 0 0 に希釈したウサギ抗血清および免疫前の血清とともにインキュベーションされた。結合したウサギ I g G は、H R P 結合ヤギ抗ウサギ I g 抗血清 (J a c k s o n I m m u n r e s e a r c h 、ペンシルバニア) を用いて検出された。結果は、< 5 % の誤差を有する、2 つ 1 組の決定の平均値を表している (図 1 3 、表 5) 。

30

【0235】

表 5 : r P h l p 5 、およびフレウム プラテンセ、ロリウム ペレンネ、ポア プラテンシス、ダクティリス グロメラタ、セカーレ ケレアーレ、トゥリティウム アエスティブム、アベナ サティバ、ホルデウム ブルガレ、アントクサントウム オドラトゥムからの天然群の 5 つのアレルゲンに対する抗 P h l p 5 ペプチドの交差反応性。P h l p 5 および草本花粉からの花粉抽出物に対するペプチド抗血清 (抗 - P 1 から抗 - P 6 まで) の I g G 反応性 (O D 値) は、K L H 接合 P h l p 5 由来ペプチド (P 1 - P 6) を用いて免疫された 6 匹のウサギに関して表示されている。

40

【0236】

【表 3 1】

表5:rPhl p 5および草本花粉抽出物に対する抗ペプチド高血清の交差反応性

	抗-P1	抗-P2	抗-P3	抗-P4	抗-P5	抗-P6
rPhl p 5a	1.115	2.418	1.336	1.600	1.540	2.142
フレウム プラテンシ	0.227	1.155	0.955	0.703	1.138	1.000
ロリウム ペレンネ	0.056	1.320	0.834	0.238	0.163	2.500
ポア プラテンシス	0.070	1.491	1.045	1.880	2.200	2.500
ダクティリス グロメラタ	0.060	0.390	0.728	0.689	0.154	0.657
セカレ セレアレ	0.090	0.292	0.777	0.676	0.162	0.843
トゥリティウム アエステイブム	0.116	1.076	0.734	0.404	0.570	0.703
アベナ サティバ	0.150	0.790	1.029	0.551	0.224	1.494
アントキサントウム	0.114	1.209	1.531	0.827	1.114	1.115
ホルデウム ブルガレ	0.080	1.972	1.150	1.184	0.602	1.513

10

【0237】

16.4. Phl p 5由来ペプチドを用いた免疫化は、交差反応性のIgG抗体を誘導する

20

ペプチドのそれぞれを用いた免疫化は、最初の免疫から4週間目において検出可能になり、かつ2回目の免疫の後に増強される、強いPhl p 5特異的IgG応答を誘導した。ペプチド2を用いた免疫化は、最も高いPhl p 5特異的IgG応答を誘導し、ペプチド6、4、5および最も低い応答を誘導した1と続く。ロリウム ペレンネ、ポア プラテンシス、ダクティリス グロメラタ、セカレ セレアレおよびホルデウム ブルガレにおけるアレルゲンの群5に対する反応性を欠如した抗ペプチド1抗体を除いて、他のペプチド抗血清が、試験された草本花粉抽出物のそれぞれと交差反応した。

【0238】

(実施例17: Phl p 5由来ペプチドを用いた免疫化は、草本花粉アレルギー性患者のIgEのPhl p 5に対する結合を阻害するIgG抗体を誘導する)

30

17.1. ペプチド特異的IgGによる、rPhl p 5aに対するアレルギー性患者のIgE結合の阻害

遮断抗体が免疫療法において重要な役割を果たすことを示されているので、ペプチドの遮断抗体を誘導する能力に関する情報は、重要である。

【0239】

ペプチド誘導ウサギIgが完全なrPhl p 5に対するアレルギー性患者のIgEの結合を阻害する能力を調べるために、ELISA競合実験が29人のアレルギー性患者からの血清を用いて実施された。

【0240】

40

ELISAプレートは、rPhl p 5(1μg/ml)を用いて被われ、かつ抗ペプチド抗血清(抗-P1-抗-P6)のそれぞれの1:250の希釈物、抗ペプチド抗血清、抗rPhl p 5抗血清、または対照を目的とした対応する免疫前の血清もしくは免疫前の血清の混合物のいずれかとともに前インキュベーションされた。洗浄の後に、プレートは、29人のアレルギー性患者からの、1:3に希釈した血清とともにインキュベーションされ、かつ結合したIgE抗体が、アルカリ性ホスファターゼ結合マウスモノクロナル抗ヒトIgE抗体(Pharmingén)を用いて検出された。抗ペプチド抗血清との前インキュベーションによって達成されるIgE結合の阻害%は、以下のように(IgE結合の阻害%=100-OD_I/OD_P×100)算出された。OD_IおよびOD_Pは、ウサギの免疫血清および免疫前の血清のそれぞれを用いた前インキュベーションの後

50

における吸光度を表している。ペプチド誘導ウサギ I g G との P h l p 5 の前インキュベーションは、種々の程度にアレルギー性患者の I g E 反応性を阻害した。I g E 結合の阻害の平均的な程度は、抗ペプチド 6 I g G に関して 19.3% から抗ペプチド 1 I g G に対する 28.5% の範囲にあった。完全な P h l p 5 に対して産生されたウサギ抗体は、43.6% の I g E 結合の阻害平均値を誘導した。

【0241】

表6：ウサギ抗 P h l p 5 ペプチド抗血清は、P h l p 5 に対するオオアワガエリ花粉アレルギー性患者の血清 I g E 結合を阻害する。P h l p 5 に対する I g E 結合の阻害%は、抗ペプチド抗血清（抗 P 1 - 抗 P 6 ）、6つの抗ペプチド抗血清（抗 P 1 - P 6 ）または抗 r P h l p 5 との、P h l p 5 の前インキュベーションの後における患者のそれぞれに対して表示されている。阻害%の平均値は、下端の列に表示されている。N . d . : 実施せず。

【0242】

【表 3 2】

表6

以下のものに特異的な抗血清を用いたPhl p 5に対するIgE結合の阻害%

患者	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1-P6	Phl p 5	
1	0	5	4	0	0	0	0	nd	
2	1	10	4	0	0	0	0	nd	10
3	28	35	28	39	37	38	46	50	
4	33	40	33	42	35	45	54	20	
5	0	0	3	8	8	0	9	nd	
6	46	34	39	47	47	34	21	56	
7	41	48	46	49	50	45	49	60	
8	41	8	34	18	39	0	0	8	
9	6	0	0	0	0	0	0	nd	
10	34	46	30	35	39	42	48	38	
11	28	0	32	0	28	9	0	nd	
12	33	0	27	4	33	0	0	nd	20
13	30	31	29	0	29	11	15	0	
14	46	14	49	17	47	2	8	15	
15	48	44	55	22	46	25	23	72	
16	41	0	44	24	41	19	8	28	
17	52	71	50	57	49	59	73	82	
18	43	17	42	0	32	0	10	0	
19	5	17	19	16	7	0	4	nd	
20	42	54	43	38	38	41	48	65	
21	39	51	46	43	43	43	40	39	30
22	44	49	44	46	44	40	50	70	
23	38	54	40	42	48	40	50	66	
24	23	0	15	0	0	0	0	nd	
25	0	35	0	8	4	28	43	nd	
26	51	26	31	21	24	0	19	nd	
27	14	15	3	0	9	11	25	nd	
28	9	0	17	0	9	0	0	nd	
29	10	44	11	31	21	28	24	73	
平均値	28.5	25.8	28.2	20.9	27.8	19.3	23.0	43.6	40

【 0 2 4 3】

(実施例 1 8 : P h l p 5 由来ペプチドは、特異的リンパ球増殖の低い応答を誘導する)

1 8 . 1 . リンパ球増殖アッセイ

最も低いと見込まれる T 細胞反応性を有するペプチドを同定して、治療関連副作用を最小化するために、T 細胞反応性が、リンパ球増殖アッセイによって試験された。末梢血単核細胞 (P B M C) は、2 人の草本花粉アレルギー性患者から、F i c o l l 1 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 、イギリス) 密度勾配遠心分離によって単離された。P B M C (2×10^5) は、9 6 ウェルプレート (N u n c l o n e ; N a

lge Nunc International、デンマーク)の中、2 mMのL-グルタミン(SIGMA、アメリカ)、50 μ Mのベータメルカプトエタノール(SIGMA)および1 mlごとに0.1 mgのゲンタマイシン(SIGMA)を補った200 μ lの無血清のUltra Culture培地(BioWhittaker、ロックランド、ME)において、加湿した雰囲気において37 °Cおよび5%のCO₂において、3つ1組にして培養された。細胞は、異なる濃度の合成ペプチド(ウェル毎に1.25、0.6および0.3 μ g)および比較を目的として、ウェル毎に4 Uのインターロイキン-2(Boehringer Mannheim、ドイツ)および培地単独を用いて刺激された。培養から6日後に、ウェル毎に0.5 μ Ciの[³H]チミジンが加えられ、その16時間後において、取り込まれた放射性がマイクロベータシンチレーションカウンター(Wallac ADL、ドイツ)を用いて液体シンチレーションカウントによって測定された。cpmの平均値は、3つ1組から算出され、かつ刺激指標(SI)は、抗原刺激またはインターロイキン-2刺激および未刺激対照によって得られたcpmの商として算出された。

10

【0244】

オオアワガエリ花粉アレルギー性患者からのPBMCは、異なる濃度の合成ペプチドを用いて刺激された。ペプチドに対する刺激指標は、IL2よりも有意に低かった。Philip 5由来ペプチドは、低い特異的なリンパ球増殖応答を誘導した。最も低い応答は、ペプチド 5に続いてペプチド 4に対して見られた。

20

【0245】

(実施例19: Feld 1由来合成ペプチドの特性)

ネコアレルギーのワクチン接種に好適なペプチドを得るために、長さ30から36アミノ酸であり、かつ分子の全体の範囲に渡る5つのペプチドが、Feld 1の公知のアミノ酸配列に従って設計された。

【0246】

ペプチドは、アブライドバイオシステムペプチド合成機モデル433A(アメリカ)において、HBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)活性化(0.1 mmolの小規模サイクル)を伴ってFmoc(9-フルオレニルメトキシ-カルボニル)ストラテジーを用いて、合成された。前充填されたPEG-PS(ポリスチレングリコールポリスチレン)樹脂(0.15-0.2 mmol/gを充填)(PerSeptive Biosystems、イギリス)が、ペプチドを構築するための固定相として使用された。アミノ酸の結合は、フィードバック制御システムにおいて導電性を監視することによって確認された。1つのシステイン残基が、ペプチド1、3、4および5に加えられて、単体に対する結合を容易にした(表7)。ペプチドは、250 μ lの蒸留水、250 μ lのトリイソプロピルシラン(Fluka、スイス)、9.5 mlのTFAの混合物を用いて、2時間に渡って樹脂から切断され、かつtert-ブチルメチルエーテル(Fluka、スイス)(Focke 2001)において沈降された。ペプチドの同定は、質量分析によって確認され、かつペプチドは、調整用のHPLC(PiChem、オーストリア)によって>90%まで精製された。

30

40

【0247】

表7: Feld 1由来合成ペプチドの分子特性。Feld 1由来合成ペプチドの、本来のFeld 1分子内の位置、アミノ酸配列、アミノ酸の数、算出された分子量(MW)および等電点の理論値(pI)が示されている。すべてのペプチドgは、水に可溶である。

【0248】

【表 3 3】

表7

	位置	アミノ酸配列	アミノ酸長	MW	pI
ペプチド 1 (配列番号15)	鎖1, 1-34アミノ酸	EICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQ YKALPVVC	35	3911	4.30
ペプチド 2 (配列番号16)	鎖1, 35-70アミノ酸	LENARILKNCVDAKMTEEDKENALSL DKIYTSPLC	36	4083	4.72
ペプチド 3 (配列番号17)	鎖2, 1-34アミノ酸	VKMAITCPIFYDVFFAVANGNELLLDL SLTKVNAC	35	3835	4.56
ペプチド 4 (配列番号18)	鎖2, 35-63アミノ酸	TEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVL DGLVC	30	3382	4.93
ペプチド 5 (配列番号19)	鎖2, 64-92アミノ酸	CMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKL NTLGR	30	3246	4.78

10

20

【0249】

5つの F e l d 1 由来合成ペプチドは、3246 から 4083 ダルトンの範囲における分子量を有し、かつ 4.30 から 4.93 の算出された等電点を有する。5つのペプチドのすべては、水溶性であり、かつペプチド 1、2 および 3 は、ヒト T 細胞エピトープを含み得る (表 7)。

30

【0250】

【表 3 4】

表8. rFel dと比較してFel d1由来の合成ペプチドの低下したIgE

患者	性別	年齢	総IgE (kU/l)	この 鱗屑に 特異的な IgE (kUA/l)	rFel d1 (O.D.)	ペプチド1 (O.D.)	ペプチド2 (O.D.)	ペプチド3 (O.D.)	ペプチド4 (O.D.)	ペプチド5 (O.D.)	
1	f	36	>2000	48.2	2.314	0.112	-	-	-	0.056	10
2	m	27	798	62.2	2.255	0.069	0.123	-	-	0.140	
3	m	33	153	9.48	1.394	-	-	-	-	-	
4	m	25	122	13.2	1.194	1.998	0.113	0.186	-	0.073	
5	f	42	267	42.1	1.793	0.074	-	-	-	0.677	20
6	f	35	494	37.0	2.007	-	-	-	-	0.204	
7	m	27	129	31.3	2.259	-	-	-	-	0.149	
8	m	36	1150	13.5	1.384	-	-	-	-	0.130	
9	f	32	580	17.3	0.569	-	-	-	-	-	
10	f	22	189	4.65	0.553	0.051	-	-	-	0.057	30
11	f	53	>2000	>100	2.838	0.504	-	-	-	0.644	
12	f	75	4567	47.3	2.519	-	0.060	-	-	0.161	
13	m	34	>2000	40.0	1.244	-	-	-	-	-	
14	m	n.d.	n.d.	1.99	0.178	-	-	-	-	-	40
NHS	f	27	<2	<0.35	-	-	-	-	-	-	

【0251】

(実施例20: Fel d 1由来合成ペプチドは、rFel d 1と比較して低いIgE反応性を有し、かつFel d 1由来ペプチドは、アレルギー誘発性活性に乏しい)

ワクチン接種に好適化された低アレルギー誘導性ペプチドを同定するために、Fel d 1由来合成ペプチドに対する血清IgE反応性が調べられた。

【0252】

IgE 媒介ネコアレルゲンの診断は、既往歴、皮膚プリック試験 (Allergopharma、ラインベック、ドイツ) ならびに総血清 IgE およびネコの鱗屑特異的な血清 IgE (CAP-FEIA、Pharmacia Diagnostics、スウェーデン) の測定の基づかれた。非アレルギー性の個人は、対照の目的として含まれた。

【0253】

20.1. ELISA アッセイにおいて測定した IgE 結合能

5つの Fel d 1由来合成ペプチドの IgE 結合能は、14人のネコアレルギー性患者からの血清を用いて、完全な rFel d 1アレルゲンの IgE 結合能と比較された。ELISAプレート (Nunc Maxisorb、デンマーク) は、Fel d 1由来合成ペプチドまたは対照としての rFel d 1を用いて被われ (0.5 μg / ウェル)、洗浄され、かつブロッキングされた。それから、プレートは、ネコアレルギー性患者および非アトピー性の個人からの、1:5希釈した血清を用いて、4において夜通しインキュベーションされた。結合した IgE 抗体は、1:2500に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識した抗ヒト IgE 抗体 (KPL、アメリカ) を用いて検出された。

10

【0254】

22歳から75歳までの、7人の女性および7人の男性のアレルギー性患者からの血清は、CAP-FEIA測定にかけられた。測定された総IgEレベルは、122から>4000 kU / lの範囲であり、かつネコ鱗屑特異的IgEレベルは、1.99から>100 kUA / lの範囲であった (表7)。ELISAアッセイにおいて、主要なネコアレルギー性患者 Fel d 1に対する14の試験した血清のすべてのIgE反応性が、確かめられた。結果は、光学濃度 (OD) として得られ、かつ0.178から2.838 ODユニットの範囲であった。Fel d 1由来合成ペプチドに対する14の血清のIgE反応性が、同じELISAアッセイにおいて測定された。IgE結合が、ペプチド1、2、3、および5に対して保持されていることが見出された。IgE結合は、ペプチド1に対しては6 / 14の血清について、ペプチド2に対しては3 / 14の血清について、ペプチド3に対しては1 / 14の血清について、かつペプチド5に対しては10 / 14の血清について観察された。測定されたODユニットは、ペプチド1に関して0.051から1.998の間、ペプチド2に関して0.060から0.123の間、ペプチド3に関して0.186、およびペプチド5に関して0.056から0.056から0.677の間であった。要約すると、測定されたすべてのODユニットは、完全な Fel d 1アレルゲンに対して測定されたそれぞれの値よりも相当に低かった。

20

30

【0255】

これは、Fel d 1由来合成ペプチドが、完全な Fel d 1アレルゲンと比較して低下したIgE反応性を有することを証明している。従って、Fel d 1由来合成ペプチドは、SITに使用された場合に、低下したIgE媒介副作用を提供する低アレルゲン誘導性であると見做され得る。

【0256】

20.2. ヒト好塩基球における表面マーカーCD203cおよびCD63の発現の特異的誘導 (図17)

40

IgE結合は、効果細胞結合特異的なIgEの交差結合をも要求するタイプIのアレルギー性反応の誘導に対して、十分条件ではないが、必要条件であるので、Fel d 1由来合成ペプチドの実際のアレルギー誘導性活性は、好塩基球活性化アッセイにおいて試験される。これらのアッセイは、好塩基球活性化に対するマーカーとしていずれもが認識されている表面マーカーCD203c、およびCD63のアレルゲン特異的な上方制御を検出する (Hauswirth et al. J Allergy Clin Immunol. (2002) 110:102-109)。

【0257】

ヘパリン添加血液試料は、インフォームドコンセントが得られた後に、5人のネコアレルギー性患者から採られた。血液の部分標本 (100 μl) は、rFel d 1の希釈系列、単一成分としてもしくは等モル濃度の混合物として Fel d 1由来合成ペプチ

50

ド、抗 I g E 抗体または緩衝液 (P B S) とともに、37 °C において 15 分間に渡ってインキュベーションされた。インキュベーションの後に、細胞は、20 mM の E D T A を含有する P B S において洗浄された。それから、細胞は、10 μ l の P E 接合 C D 2 0 3 c m A b 9 7 A 6、および 20 μ l の F I T C 接合 C D 6 3 m A b C L B - g r a n 1 2 とともに、室温において 15 分に渡ってインキュベーションされた。その後、試料は、F A C S (商標) L y s i n g S o l u t i o n を用いた赤血球溶解にかけられた。それから、細胞は、洗浄され、P B S に再懸濁され、かつ P a i n t - a - G a t e S o f t w a r e を用いた、F A C S c a n (B e c t o n D i c k i n s o n、アメリカ)において 2 色フローサイトメトリーによって分析された。C D 2 0 3 c および C D 6 3 のアレルゲン誘導上方制御は、刺激した細胞 (M F I s t i m) および未刺激の細胞 (M F I c o n t r o l) を用いて得られる蛍光強度の平均値 (M F I s) から算出され、かつ刺激指標 (M F I s t i m : M F I c o n t r o l) として表された。2 以上の S I (すなわち、2 倍以上の上方制御) は、特異的な (診断的な) 応答の指標と見做された。

10

【 0 2 5 8 】

5 人の研究対象であるすべてのネコアレルギー性患者 (R R、E B、K C、M G および S M) の好塩基球において、r F e l d 1 を用いた刺激が、表面マーカー C D 2 0 3 c および C D 6 3 のアレルゲン特異的上方制御を誘導した。C D 2 0 3 c および C D 6 3 の上方制御は、4 / 5 の患者 (R R、K C M G および S M) に関して用量依存的事であることを観察された。これらの患者に関して、C D 2 0 3 c 刺激誘導は、0 . 0 0 1 μ g r F e l d 1 / m l の最も低い試験濃度に対して 1 . 1 (S M) から 3 . 2 (R R) まで、および 10 μ g r F e l d 1 / m l の最も高い試験濃度に対して 3 . 6 (K C) から 6 . 2 (R R) までの範囲であった。同じアッセイにおいて測定された C D 6 3 刺激誘導は、0 . 0 0 1 μ g / m l の最も低い r F e l d 1 試験濃度に対して 1 . 1 (R R) から 2 . 0 (M G) まで、および 10 μ g / m l の最も高い r F e l d 1 試験濃度に対して 3 . 9 (R R) から 7 . 3 (M G) までの範囲であった。患者 E B に関して、0 . 0 0 1 μ g / m l の F e l d 1 は、表面マーカー上方制御の用量依存性の観察を妨げる表面マーカー C D 2 0 3 c および C D 6 3 の高レベルな上方制御を、すでに誘導するに十分であった。

20

【 0 2 5 9 】

5 人のネコアレルギー性患者からの好塩基球は、5 つの漸増する濃度 (0 . 0 0 5、0 . 0 5、0 . 5、5 および 50 μ g / m l) の 5 つの F e l d 1 由来合成ペプチドの等モル濃度の混合物を用いて精査された。患者 R R からの好塩基球は、5 つの漸増する濃度の 5 つの単一 F e l d 1 由来合成ペプチド (0 . 0 0 1、0 . 0 1、0 . 1、1 および 10 μ g / m l) を用いて付加的に精査された。ペプチドは、好塩基球表面マーカー C D 2 0 3 c および C D 6 3 を上方制御することに関して欠陥があることを見出された。ペプチドは、患者 R R、K C および S M の細胞における C D 2 0 3 c および C D 6 3 のあらゆる増強された発現を誘導できなかった。C D 2 0 3 c (S I = 2 . 3) および C D 6 3 (S I = 2 . 5) のわずかな上方制御は、患者 M G に対して検出され得た (但し、50 μ g ペプチド混合物 / m l の最も高い試験濃度に対してのみ) 一方において、適用された最も低い濃度はまた、刺激効果を有していなかった。C D 2 0 3 c (S I = 4 . 2) および C D 6 3 (S I = 4 . 3) のより明白な上方制御は、患者 E B に対して観察されたが、同様に最も高いペプチド混合物の試験濃度に対してのみであった。患者 M G および E B の両方の場合において、ペプチドを用いた刺激後の上方制御の割合は、完全な F e l d 1 アレルゲンを用いた刺激に関する対応する値よりも相当に低かった。

30

40

【 0 2 6 0 】

これは、F e l d 1 由来合成ペプチドが完全な F e l d 1 アレルゲンよりも低いアレルギー誘導性活性を保持するという利点を与えることを証明している。これは、F e l d 1 由来合成ペプチドが S I T に使用される場合に、I g E 媒介副作用の低下した危険性と関連する。

50

【0261】

(実施例21: Fel d 1由来合成ペプチドを用いた免疫化は、完全な rFel d 1 アレルゲンと反応性の Ig G 抗体を誘導する)

Fel d 1由来合成ペプチドは、Ig E 結合に関して欠陥があることを示された。アレルゲン特異的 Ig G 抗体の誘導を目的とするワクチン接種の候補分子として、ペプチドは、特異的なアレルゲン構造を保持している必要があり、かつ完全なアレルゲンに対する特異的な Ig G 免疫応答を依然として誘導することができる必要がある。Fel d 1由来合成ペプチドがこの要求を満たすか否かを見出すために、ウサギにおける免疫実験が実施された。

【0262】

ウサギは、未結合の rFel d 1 および KLH 結合 Fel d 1 由来合成ペプチドを用いて免疫された。HPLC 精製ペプチドは、Imject Maleimide Activated Conjugation Kit (Piece、アメリカ)を用いて、それらのシステイン残基を介して結合された。

【0263】

ウサギ(ニュージーランドホワイトウサギ)は、CFA(初回免疫)およびIFA(4週間後における初回追加注入; 7週間後に不完全補助剤とともに2回目の追加注入が与えられた)(Charles River Breeding Laboratories、ドイツ)を用いた免疫原(200 µg/注入)を用いて免疫された。ウサギは、初回免疫後の8週間後およびその後は4週間の間隔をおいて、採血された。

【0264】

ペプチド-および rFel d 1 特異的抗体の誘導は、ELISA アッセイにおいて監視された。ELISA プレート(Nunc Maxisorb、デンマーク)は、rFel d 1 (0.5 µg/ウェル)を用いて被われ、洗浄され、かつブロッキングされた。それから、プレートに結合された rFel d 1 は、1:1000 に希釈された血清および対応するウサギ免疫前の血清を用いて2つ1組において精査され、かつ結合した Ig G は、1:2000 に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗血清(Jackson ImmunoResearch Inc.、アメリカ)を用いて検出された。2つ1組の平均値が算出され、かつ5%未満の誤差を示した。

【0265】

Fel d 1由来合成ペプチドを用いた免疫化は、Fel d 1 反応性 Ig G 抗体を誘導した。Fel d 1由来合成ペプチドのそれぞれを用いた初回免疫の8週間後において、完全な Fel d 1 アレルゲンに対して反応性を有する Ig G 抗体は、5つのウサギ抗血清のそれぞれにおいて、検出され得た。Ig G 抗体レベルは、次の採血において匹敵するレベルを維持した(図16)。

【0266】

抗ペプチド 1、抗ペプチド 2、抗ペプチド 4 および抗ペプチド 5 の抗ウサギ血清は、抗 Fel d 1 ウサギ抗血清とおよそ同程度において、Fel d 1 に対する Ig G 反応性を示した。また、抗ペプチド 3 ウサギ抗血清は、識別可能であるが、やや低い Fel d 1 に対する Ig G 反応性を示した。

【0267】

これは、Fel d 1 合成ペプチドのすべてが、Fel d 1 特異的 Ig G 抗体反応を誘導するための候補分子であることを示している。

【0268】

(実施例22: Fel d 1由来合成ペプチドは、Fel d 1 よりも低いリンパ球増殖応答を誘導する)

改良された SIT に関して所望の候補分子は、低下した Ig E 関連副作用という利点を与えるだけでなく、低下した T 細胞媒介副作用という利点も与える。Fel d 1 由来合成ペプチド T 細胞活性化特性を調べるために、リンパ球増殖アッセイが実施された。

【0269】

10

20

30

40

50

P B M C は、F i c o l l (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 、イギリス) によって7人のネコアレルギー性患者から単離された。P B M C (2×10^5) は、加湿した雰囲気において5%のCO₂を用いて37°Cにおいて、2 mMのL-グルタミン、(S i g m a 、アメリカ)、50 μMのβ-メルカプトエタノール、(S i g m a) およびmlごとに0.1 mgのゲンタマイシン(S i g m a) を補った200 μlの無血清Ultra Culture培地(C a m b r e x 、ベルギー) において、96ウェルプレート(N u n c l o n e 、N a l g e n e N u n c I n t e r n a t i o n a l 、デンマーク) において、3つ1組にして培養された。細胞は、異なる濃度(5、2.5、1.25および0.6 μg/ウェル) のF e l d 1および単一の成分としてもしくは等モル濃度の混合物としてF e l d 1由来合成ペプチド、ならびに対照を目的とした4 Uのインターロイキンもしくは培地単独を用いて刺激された。6日間の培養の後に、ウェルごとに0.5 μCiの³H-チミジン(A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) が、添加され、かつその16時間後に、取り込まれた放射性がマイクロベータシンチレーションカウンター(W a l l a c A D I 、ドイツ) を用いた液体シンチレーション計数によって測定され、かつcpmの平均値は、3つ1組から算出された。刺激指標(S I) は、抗原刺激もしくはインターロイキン-2刺激、および未刺激の培地対照によって得られたcpmの商として算出された。

10

【0270】

I L - 2 は、7人の試験ネコアレルギー性患者のすべてからのP B M C の増殖の増殖を刺激して、R R に関して9.8、E B に関して5.2、K C に関して3.2、M G に関して6.7、S M に関して6.3、R A に関して15.7およびA R に関して13.9の刺激指標を結果として生じた。

20

【0271】

F e l d 1 由来合成ペプチドは、より低い刺激を誘導した。

【0272】

表9：等モル濃度の基準がF e l d 1 よりも低いリンパ球増殖応答を誘導するF e l d 1 由来合成ペプチドは、同定され得る。7人のネコアレルギー性患者からのP B M C は、r F e l d 1 または単一の成分としてF e l d 1 由来合成ペプチドの希釈系列を用いて刺激された。特異的リンパ球増殖応答は、刺激指標として示されている。

【0273】

30

【表 3 5】

表9

		5 $\mu\text{g}/\text{w}$	2.5 $\mu\text{g}/\text{w}$	1.25 $\mu\text{g}/\text{w}$	0.6 $\mu\text{g}/\text{w}$	
患者RR	rFel d1	2.6	1.8	1.5	1.9	10
	へ°フ°チ°ト° 1	1.9	0.6	1.3	1.5	
	へ°フ°チ°ト° 2	2.1	1.3	2.0	1.6	
	へ°フ°チ°ト° 3	3.5	2.8	2.0	3.0	
	へ°フ°チ°ト° 4	2.5	2.4	1.5	0.8	
	へ°フ°チ°ト° 5	1.7	0.9	2.3	0.7	
患者EB	rFel d1	8.2	2.9	1.6	1.5	
	へ°フ°チ°ト° 1	1.3	0.9	1.0	1.2	
	へ°フ°チ°ト° 2	2.4	1.7	1.8	1.6	
	へ°フ°チ°ト° 3	1.1	1.2	1.4	1.7	
	へ°フ°チ°ト° 4	3.6	3.6	3.2	2.3	
	へ°フ°チ°ト° 5	2.2	2.1	1.4	2.1	
患者KC	rFel d1	0.8	1.2	1.3	5.2	20
	へ°フ°チ°ト° 1	0.7	1.0	1.1	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 2	1.2	1.5	1.0	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 3	0.6	0.5	0.5	0.6	
	へ°フ°チ°ト° 4	1.6	1.4	1.3	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 5	1.3	1.4	0.9	1.4	
患者MG	rFel d1	2.9	2.3	2.3	2.2	
	へ°フ°チ°ト° 1	1.8	1.4	1.4	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 2	1.2	1.3	1.4	0.9	
	へ°フ°チ°ト° 3	1.1	0.5	0.6	0.7	
	へ°フ°チ°ト° 4	1.1	1.5	1.8	1.0	
	へ°フ°チ°ト° 5	1.5	1.2	1.6	0.8	
患者SM	rFel d1	2.3	1.6	1.8	1.1	30
	へ°フ°チ°ト° 1	1.1	1.0	0.8	1.0	
	へ°フ°チ°ト° 2	1.8	1.1	1.3	1.2	
	へ°フ°チ°ト° 3	2.6	2.1	2.1	1.5	
	へ°フ°チ°ト° 4	1.9	1.6	1.7	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 5	2.3	1.3	1.4	1.0	
患者RA	rFel d1	3.2	1.2	2.4	1.2	40
	へ°フ°チ°ト° 1	0.8	0.7	1.3	1.1	
	へ°フ°チ°ト° 2	1.2	0.5	1.7	1.6	
	へ°フ°チ°ト° 3	2.0	2.3	1.6	0.9	
	へ°フ°チ°ト° 4	3.0	1.3	1.1	0.6	
	へ°フ°チ°ト° 5	0.4	0.6	0.9	0.9	
患者AR	rFel d1	1.4	0.6	0.9	1.0	
	へ°フ°チ°ト° 1	1.0	0.5	1.7	0.7	
	へ°フ°チ°ト° 2	0.7	0.6	0.9	0.6	
	へ°フ°チ°ト° 3	1.6	1.6	2.1	1.0	
	へ°フ°チ°ト° 4	1.0	0.7	0.7	0.6	
	へ°フ°チ°ト° 5	0.8	0.5	0.3	0.5	

(実施例23: Fe1 d 1由来合成ペプチドを用いた免疫化によって誘導されるIg抗体は、ネコアレルギー性患者のIgEの完全なFe1 d 1アレルギーに対する結合を阻害する)

完全なrFe1 d 1に対するアレルギー性患者のIgE抗体の結合を阻害する、ペプチド誘導ウサギIgGの能力は、ELISA競合アッセイにおいて試験された。ELISAプレート(Nunc Maxisorb、デンマーク)は、rFe1 d 1(0.05 µg/ウェル)を用いて被われ、洗浄され、かつブロッキングされた。それから、プレート結合rFe1 d 1は、1:100に希釈したウサギ抗ペプチド抗血清(単一の抗ペプチド抗血清および抗ペプチド抗血清の混合物が使用された)、ウサギ抗rFe1 d 1抗血清、および対照を目的としてまた、それぞれのウサギ免疫前の血清とともに、前インキュベーションされた。プレートが洗浄された後に、それらは、ネコアレルギー性患者からの、1:5に希釈したヒト血清とともにインキュベーションされた。結合したIgE抗体は、1:2500に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体(KPL、アメリカ)を用いて検出された。抗ペプチド抗血清との前インキュベーションによって達成されたIgE結合の阻害%は、以下のように(IgE結合の阻害% = $100 - O.D._I / O.D._p \times 100$ (O.D._Iは、ウサギ免疫血清との前インキュベーションの後に測定された光学密度であり、かつO.D._pは、ウサギ免疫前の血清との前インキュベーションの後に測定された光学密度である))算出された。

【0275】

5つの抗ペプチドウサギ抗血清とのELISAプレート結合Fe1 d 1の前インキュベーションは、ネコアレルギー性患者からの14の異なる試験血清の間において変化する阻害様式を結果として生じた。抗ペプチド 1ウサギ抗血清は、13/14の試験患者の血清についてFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害し、抗ペプチド 2ウサギ抗血清は、8/14の試験患者の血清についてFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害し、抗ペプチド 3ウサギ抗血清は、13/14の試験患者の血清についてのFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害し、抗ペプチド 4ウサギ抗血清は、9/14の試験患者の血清についてのFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害し、かつ抗ペプチド 5ウサギ抗血清は、5/14の試験患者の血清についてのFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害した。

【0276】

また、阻害の範囲は、異なる抗血清の間において変化を示した。単一の試験抗ペプチドウサギ抗血清のなかでも、抗ペプチド 1ウサギ抗血清は、0 - 55% (平均29%)の阻害を伴う最高の阻害率を示した。抗ペプチド 2ウサギ抗血清について0 - 18% (平均5%)の阻害率が達成され得、抗ペプチド 3ウサギ抗血清について0 - 29% (平均11%)の阻害率が達成され得、抗ペプチド 3ウサギ抗血清について0 - 24% (平均8%)の阻害率が達成され得、抗ペプチド 5ウサギ抗血清について0 - 18% (平均4%)の阻害率が達成され得た。

【0277】

5つの抗ペプチドウサギ抗血清のすべての混合物は、すべての患者の血清について達成された阻害および25 - 84% (平均59%)の阻害を伴って、最も効率的にFe1 d 1に対する患者のIgE結合を阻害した。これらの阻害は、抗Fe1 d 1ウサギ抗血清との免疫前によって達成される阻害よりもはるかに明らかであった(表10)。

【0278】

Fe1 d 1由来合成ペプチドに対して産生されたウサギ抗血清は、Fe1 d 1に対するヒトIgEの結合を阻害する。ウサギ抗血清とのFe1 d 1の前インキュベーションによって達成されたFe1 d 1に対するIgE結合の阻害%は、14人の患者について、かつ平均値として示されている。前インキュベーションは、5つのFe1 d 1由来合成ペプチド(抗ペプチド1 - 5)に対して産生された5つのウサギ抗血清、5つの抗ペプチド抗血清の混合物(Mix)およびFe1 d 1に対して産生された抗血清(抗rFe1 d 1)とともに実施された。

【0279】

【表36】

表10

患者	抗-ペプチド 1	抗-ペプチド 2	抗-ペプチド 3	抗-ペプチド 4	抗-ペプチド 5	5つの 抗-ペプチド 高血清の 混合物	抗-rFel d 1	
1	48	18	29	20	18	78	64	10
2	24	0	8	0	0	67	43	
3	55	11	5	17	8	84	74	
4	38	7	11	24	8	66	49	
5	10	5	5	12	0	54	48	20
6	33	0	12	5	0	68	46	
7	6	1	10	5	0	58	45	
8	44	3	17	10	0	60	53	
9	26	17	12	15	16	53	43	
10	0	0	10	0	0	31	26	30
11	38	0	0	0	0	52	56	
12	47	0	22	0	7	75	51	
13	27	2	8	0	0	56	41	
14	16	0	6	5	0	25	25	40
平均値	29	5	11	8	4	59	47	

【0280】

抗ペプチド 1 ウサギ抗血清が、他の抗ペプチド抗血清のそれぞれと組み合わせられた場合に、アレルギー性患者の I g E 結合の阻害は、抗 r F e l d 1 抗体を用いて得られる値 (6 7 %) にほとんど達するまでに実質的に増加された (例えば、抗ペプチド 1 + 2 : 4 1 % 、抗ペプチド 1 + 4 : 4 2 %) (表 1 1) 。

【0281】

【表 3 7】

表11

患者	抗-ヘプチド1 + 抗-ヘプチド2	抗-ヘプチド1 + 抗-ヘプチド3	抗-ヘプチド1 + 抗-ヘプチド4	抗-ヘプチド1 + 抗-ヘプチド5	抗-rFel d 1
1	61	49	61	63	75
2	24	17	28	28	74
3	60	52	62	57	86
4	43	33	43	40	68
5	17	9	27	30	67
6	37	24	42	46	73
7	26	21	36	34	74
8	51	46	53	55	72
9	40	28	46	43	61
10	16	11	30	34	40
11	45	35	47	45	78
12	52	40	56	59	76
13	29	17	29	32	62
14	7	10	14	16	28
平均値	36	28	41	42	67

10

20

30

40

50

【0282】

(実施例24: Bet v 1由来ペプチドは、担体由来のT細胞エピトープからのT細胞の援助を受けるBet v 1特異的IgG応答を誘導し、かつBet v 1特異的T細胞増殖を低下させる)

Bet v 1に由来する、表面露出B細胞エピトープは、治療的ワクチン接種および予防的ワクチン接種のモデルマウスにおける防御性のBet v 1特異的IgG応答を誘導することを、すでに示されている(Focke M et al. Clin Exp Allergy (2004) 34:1525-1533)。Focke M et al. (2004)において、6つのBet v 1由来ペプチドがマウスの免疫化の前に担体分子KLHに対して結合された。本実施例において、これらのペプチド(表1)を用いて誘導されたBet v 1特異的IgG応答が、Bet v 1アレルゲンではなく、担体に由来するT細胞エピトープの助けによって促進されることが示される。LFPKVPAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISF(配列番号

20)、GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTN(配列番号21)およびVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK(配列番号22)の配列を有するBet v 1由来ペプチドが、関連するT細胞応答を誘導しないことが、驚くことに見出され、かつT細胞応答の大部分が、担体分子であるKLHに対して対象化されていることが証明され得た(図18および19)。この知見は、治療的なワクチン接種の間における副作用の低下にとって、かつ予防的ワクチン接種の間における潜在的な感作の危険を低下させることにとって、非常に重要なものである。あらゆるIgE反応性を欠如するが、アレルゲン由来T細胞エピトープを含むアレルゲン由来ペプチドが、T細胞活性化に起因する副作用を誘導したことは、過去に証明されている。Bet v 1について例証されているような、IgEおよびT細胞反応性を欠如するアレルゲン由来ペプチドは、治療的ワクチン接種の間において、IgE媒介副作用もT細胞媒介作用も誘導しない。予防的ワクチン接種に使用される場合に、ペプチドは、Bet v 1特異的T細胞の準備刺激なしに、Bet v 1特異的防御性IgG応答を誘導する。これは、続くアレルギー性感作のための道を敷き得るワクチンを介した、アレルギー性免疫応答を前準備刺激することの危険を最小化すべきである。

10

20

【0283】

本実施例において、治療的および予防的なアレルゲンワクチン接種のモデルマウスにおけるアレルゲン-、および担体-特異的T細胞応答が、分析された。Bet v 1由来ペプチド 2、3、および6(Focke M et al. (2004))は、選択され、かつそれらがBALB/cマウスにおける公知のBet v 1特異的T細胞エピトープのうちのあらゆるものを含有するか否かについて試験された。マウスは、以下のように免疫化された(表10は、感作および処置を示す)。BALB/cマウス(n=5)の群は、10 μ gの組み換えBet v 1(Biomay、オーストリア)、および/またはペプチド 2、3および6(10 μ gのそれぞれ)を用いて免疫化された。ペプチドは、これまでに説明されているように(Focke M et al. (2004))、KLHに対して結合された。免疫化に関して、Bet v 1およびペプチド混合物は、150 μ l/マウスの総量において水酸化アルミニウム(Alu-Gel-s、Serva、ドイツ)に対して吸収された。

【0284】

【表 3 8】

表12: 感作および処置手順

群 (n = 5)	感作 (rBet v 1)	治療 (ペプチド KLH)	
感作なし/治療なし (S-/T-)	——	——	
感作/治療なし (S+/T-)	0日、20日、40日	——	10
感作なし/治療 (S-/T+)	——	60日、80日、100日	
感作/治療 (S+/T+)	0日、20日、40日	60日、80日、100日	
	予防処置 (ペプチド KLH)	感作 (rBet v 1)	
予防処置なし/感作 (P-/S+)	——	60日、80日、100日	
予防処置/感作なし (P+/S-)	0日、20日、40日	——	20
予防処置/感作 (P+/S+)	0日、20日、40日	60日、80日、100日	

【0285】

アレルゲン -、ペプチド - および担体 - 特異的なリンパ球増殖が、T細胞増殖アッセイにおいて分析された。脾臓は、無菌条件下において取り出され、かつホモジナイズされた。赤血球の溶解の後に、細胞は、洗浄され、かつ完全培地 (RPMI、10%ウシ胎児血清、0.1 mg/ml のゲンタマイシン、2 mM のグルタミン) に再懸濁された。単一細胞の懸濁液は、96 ウェルの丸底プレートの中に、 2×10^5 細胞/ウェルの濃度において播かれ、かつ陽性対照としてのコンカバリン A (0.5 μ g/ウェル)、rBet v 1 (2 μ g/ウェル)、KLH (2 μ g/ウェル)、ペプチド混合物 (それぞれのペプチドが 0.34 μ g/ウェル) または培地単独を用いて4日間に渡って刺激された。培養液は、0.5 μ Ci/ウェルのトリチウムを含むチミジンを適用され、かつ回収された。増殖応答は、シンチレーション計数によって測定された。抗原刺激後の増殖平均値および培地対照値の割合 (すなわち、刺激指標 (SI)) が算出された。

【0286】

興味深いことに、Bet v 1由来ペプチドを用いた治療的ワクチン接種が、感作されたが、未処理のマウスである群 S+/T- と比較して、Bet v 1感作されたマウス (群 S+/T+) における Bet v 1 特異的増殖を低減し得ることが示され得た。感作されかつ処理された群において、ペプチド特異的増殖は、測定され得なかったが、担体の影響に従って、KLH特異的増殖が観察された。ペプチドワクチン単独 (群 S-/T+) は、KLH特異的なT細胞を主に誘導したが、Bet v 1特異的なT細胞応答をほとんど誘導しなかった (図18)。

【0287】

ペプチドを用いた予防的ワクチン接種は、Bet v 1感作群 P-/S+ と比較して、Bet v 1特異的増殖 (群 P+/S-) を誘導しなかったが、KLH特異的増殖を誘導した。予防的にワクチン接種され、かつ続いて感作されたマウス (群 P+/S+) において、Bet v 1特異的増殖が顕著に誘導され、さらにペプチド特異的応答が、あらゆるマウスの群において観察されなかった (図19)。

【0288】

30

40

50

このようにして、担体結合アレルゲン由来 B 細胞ペプチドを用いた予防的ワクチン接種が、ペプチド特異的 T 細胞を準備刺激しなかったが、アレルゲン特異的ではほとんどないが担体特異的な T 細胞を準備刺激したことは、示され得た。アレルゲン感作に先立つ予防的ワクチン接種だけでなく、感作されたマウスの治療的ワクチン接種はまた、アレルゲン特異的 T 細胞増殖を低減させた。

【0289】

B e t v 1 由来ペプチドを用いた予防的処置は、B e t v 1 特異的 T 細胞の助けなしで、B e t v 1 特異的 I g G 応答を誘導した。さらに、予防的処置は、初回感作後の 20 および 40 日においてすでに、B e t v 1 アレルゲンによって誘導された B e t v 1 特異的 I g G 応答を増強した (図 20)。

10

【0290】

これらの結果は、ペプチドワクチンが、アレルゲンばくろによって促進され得る B e t v 1 特異的 I g G 応答を誘導することを証明している。

【0291】

(実施例 25 : 低下した I g E 結合能を示す D e r p 2 由来ペプチド)

D e r p 2 由来ペプチドの I g E 結合能は、表 13 に従ったペプチドを採用し、かつイエダニアレルギーにかかっている個体の血清を用いる、実施例 15 . 1 および 20 . 1 に記載のように決定された。

【0292】

【表 39】

20

表13: Der p 2由来ペプチド

ペプチド	位置	配列	配列番号
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	97
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWIV PKIAPKSEN	99
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGVLACAIATHAKIRD	100

30

40

【0293】

結果は、本発明の D e r p 2 由来ペプチドが、有意に低減した I g E 結合活性を示すことを明確に示す。

【0294】

【表 4 0】

表14:結果

	rDer p 2	ペプチド1	ペプチド2	ペプチド3	ペプチド4	ペプチド5
平均値 (n=5)	1,080	0,010	0,015	0,004	0,031	0,006

10

【0295】

(実施例26:ペプチドの長さに関する変動は、ペプチドの、I g E 結合活性、T細胞反応性および免疫原性に対する効果を有しない。)

26.1. ペプチドの設計

I g E 結合活性に対する、ペプチド長における変動の影響を研究するために、Phl p 5由来ペプチドのT細胞反応性および免疫原性の変異体が、少数のアミノ酸だけ、ペプチド1(P1)の長さを伸ばすこと、およびペプチド2(P2)の長さを減らすことによって設計された(表15)。

【0296】

表15:合成Phl p 5由来ペプチド(1、2)ならびにそれらの変異体(1a、2b)の位置、配列、アミノ酸の数で数えた長さおよび分子量。

20

【0297】

【表41】

表15:PHL p 5由来合成ペプチドのバリエーション

	位置	配列	アミノ酸の数	分子量(MW)
ペプチド1	98-128	CGAASNKFAEGLSGEPKGA AESS SKAALTSK	32	3026
1a	93-128	CFVATFGAASNKFAEGLSGEPKGA AESS SKAALTSK	37	3592
ペプチド2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	34	3068
2b	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	29	2644

30

【0298】

26.2. I g E 反応性の欠如

Phl p 5由来ペプチド1、2およびこれらの変異体1a、2bのI g E反応性を分析するために、0.2 μgのペプチド/ドットを適用し、かつ7人の草本花粉アレルギー患者からの血清(p1-p7)および非アレルギー患者からの血清(NHS)を用いて、ドットプロットアッセイが実施された。結合したI g Eは、125I標識抗ヒトI g E(Phadia、Uppsala、スウェーデン)を用いて検出された。rPhl p 5は、陽性対照として使用され、かつHSAは、陰性対照として使用された。患者は、rPhl p 5に対して反応するが、ペプチドおよびペプチドの変異体に対して反応しない(図21)。

40

【0299】

26.3. リンパ球増殖性応答

2人のアレルギー患者からのPBMCは、異なる濃度の、Phl p 5由来ペプチド1、2、それらの変異体1a、2bおよび対照を目的としたrPhl p 5を用

50

いて、刺激された。ペプチドを用いて得られた刺激指標は、r P h l p 5を用いて得られた刺激指標よりも有意に低かった(図22)。

【0300】

26.4. ペプチド変異の免疫原性

ウサギは、K L H結合 P h l p 5由来ペプチドおよび変異体を用いて免疫された。E L I S A実験が用いられて、ペプチドおよびそれらの変異体に対する、得られたウサギ抗血清の I g G反応性を測定した(表16)。ペプチドおよびそれらの変異体を用いた免疫化は、ペプチドおよび対応する変異体を認識する交差反応性 I g G抗体を誘導した。

【0301】

表16: K L H接合ペプチドを用いた免疫化によってウサギにおいて、産生された抗 P h l p 5ペプチド抗血清の交差反応性。ペプチド(1、2)および変異体(1a、2b)に対するペプチド抗血清の I g G反応性が示される。免疫前の血清(前P1、前P1a、前P2、前P2b)を用いて反応性が観察されなかった。

a. 抗ペプチド 1血清(抗P1)は、ペプチド 1変異体(1a)と交差反応し、かつ抗ペプチド 1a血清(抗P1a)は、ペプチド 1と交差反応する。

b. 抗ペプチド 2血清(抗P2)は、ペプチド 2変異体(2b)と交差反応し、かつ抗ペプチド 2b血清(抗P2b)は、ペプチド 1と交差反応する。

【0302】

【表42】

表16:ウサギ抗血清の交差反応性

(a)

	前P1	抗P1	前P1a	抗P1a
P1	0,041	0,880	0,052	0,947
P1a	0,038	0,705	0,048	0,859

(b)

	前P2	抗P2	前P2b	抗P2b
P2	0,089	1,168	0,042	1,175
P2b	0,075	0,954	0,053	1,122

【0303】

26.5. ペプチド誘導されたウサギ抗血清は、草本花粉アレルギー性患者の r P h l p 5に対する I g E結合を阻害する

ヒト I g Eが r P h l p 5に対して結合することを阻害する、ウサギ抗ペプチド 2および 2b I g Gの能力は、競合 E L I S Aにおいて研究された。r P h l p 5を結合させた E L I S Aプレートは、抗 P 2、抗 P 2 b、および対照を目的とした抗 P h l p 5抗血清を用いて前インキュベーションされた。それから、プレートは、12人の草本花粉アレルギー性患者からの血清にさらされた。r P h l p 5に対する I g E結合の阻害%は、表17に示される。抗ペプチド 2抗血清および抗ペプチド 2b抗血清は、患者の r P h l p 5に対する I g E結合を同程度に阻害する。

【0304】

また、競合ELISAは、ウサギ抗ペプチド 1および1a抗血清を用いて実施された。実施例17(Phl p 5由来ペプチドを用いた免疫化が、草本花粉アレルギー性患者IgEのPhl p 5に対する結合を阻害するIgG抗体を、誘導する)において、抗ペプチド 1(P1)抗体は、患者のPhl p 5に対するIgE結合を、28.5%の平均阻害率において、阻害した。同様の結果が、23.7%の阻害率を示したペプチド 1a抗血清を用いて得られた。

【0305】

表17:抗ペプチド抗血清による、rPhl p 5に対する患者のIgE結合の阻害。抗ペプチド 2および抗ペプチド 2b抗血清は、患者のrPhl p 5に対するIgE結合を同程度に阻害する。rPhl p 5を結合させたELISAプレートは、抗P2、抗P2b、および対照を目的とした抗Phl p 5抗血清を用いて、前インキュベーションされた。それから、プレートは、12人の草本花粉アレルギー性患者からの血清にさらされた。rPhl p 5に対するIgE結合の阻害の%が示されている。

10

【0306】

【表43】

表17: IgE結合の阻害%

患者	抗P2	抗P2b	抗Phl p 5
1	33.38	24.40	84.77
2	52.20	57.40	87.00
3	52.70	54.85	90.81
4	51.44	59.76	78.26
5	43.19	49.15	77.93
6	47.04	52.02	83.68
7	62.67	58.00	76.62
8	52.36	50.27	74.44
9	57.63	50.91	88.13
10	35.10	37.99	75.03
11	44.44	41.24	68.39
12	47.56	45.41	77.34

20

30

【0307】

(実施例27:抗VP1抗体の交差反応性)

ヒトライノウイルスは、100を越えて異なる株からなる。この中和試験において、1つの株のライノウイルス感染がまた、他の株のVP1特異的抗体によって阻害され得ることは、示される。HeLa細胞は、等しい密度において、ウェルに播種された。100TC₅₀のHRV14は、抗14VP1-および抗89VP1-抗体の希釈物(未希釈; 1:2-1:32を1-6のウェル)を用いて前インキュベーションされ、かつレーンAおよびDのそれぞれにおけるウェルに加えられた。レーンBおよびCにおいてTC₅₀のHRV89は、抗14VP1-および抗89VP1抗体の希釈物のそれぞれを用いて前インキュベーションされ、かつ細胞に対して加えられた。3日後に、生細胞が、紫に染色された。抗89VP1抗体および抗14VP1抗体は、類似の様式において、HRV14の感染を阻止する。また、14VP1および89VP1に対して産生された抗体は、同じ濃度までのHRV89の感染を阻害する。

40

【図面の簡単な説明】

50

【0308】

【図1A】ベクター p89VP1の模式的な概要を示す。

【図1B】pET-17bベクターのマルチクローニング部位および89VP1コード遺伝子のDNA配列を示す。

【図1C】核酸融合を作り出すための3つの可能性の模式的な説明を示す。

【図2】生成した89VP1ヒスタグ付きタンパク質を含む、クーマシーブルー染色した12%のSDS-PAGEゲルを示す。

【図3】14VP1のIgG認識：14VP1および対照の免疫プロットングを示す。

【図4】マウスにおける89VP1特異的なIgG応答を示す。

【図5】マウスにおけるPhl p 1特異的IgG1応答を示す。

10

【図6】免疫化マウスにおけるオオアワガエリ花粉抽出物特異的IgG1応答を示す。

【図7】19人の患者のすべてのrPhl p 1、r98P5およびKLHP5に対する抗血清を用いた前インキュベーションによる、患者のrPhl p 1に対するIgEへ都合の阻害%の平均を示す。

【図8】免疫化マウスの脾臓細胞の増殖を示す。

【図9】ELISA測定によってヒトの血清において決定された14VP1、89VP1およびrPhl p 1に対するIgG1、IgG2、IgG4およびIgA応答を示す。

【図10】アレルギー性患者の血清における抗89Vp1抗体および抗rPhl p 1抗体の検出を示す。

20

【図11】HRV14タンパク質抽出物および生成14VP1に対する抗14VP1IgG結合を示す。

【図12】HRV14の中和化を示す。

【図12A】HRV14の中和化を示す。

【図12B】HRV14の中和化を示す。

【図13】完全なPhl p 5に対する抗ペプチド血清のIgG反応性を示す。

【図14】rPhl p 5およびCD203c発現によって検出されるような、ペプチド混合物のアレルギー誘発性活性を示す。

【図15】Phl p 5由来ペプチドが低いリンパ球増殖応答を誘導することの検証を示す。

30

【図16】ウサギにおけるFel d 1特異的なIgG免疫応答を誘導するFel d 1由来合成ペプチドを示す。

【図17】アレルギー性患者の抗塩基球上におけるCD63およびCD203cによって決定されるように、Fel d 1由来合成ペプチドの低いアレルギー誘発性活性を示す。

【図18】KLH連結Bet v 1由来ペプチドを用いた処理が感作したマウスにおいて、rBet v 1に対してリンパ球増殖応答を誘導することを示す。

【図19】感作後においてrBet v 1に対するリンパ球増殖応答を誘導するKLH連結Bet v 1由来ペプチドを用いた、天然のマウスの予防的ワクチン接種を示す。

【図20】Bet v 1特異的IgG応答を誘導し、かつ完全なアレルギーによるアレルギー特異的IgG応答の誘導を開始するKLH連結Bet v 1由来ペプチドを用いた、天然のマウスの予防的ワクチン接種を示す。

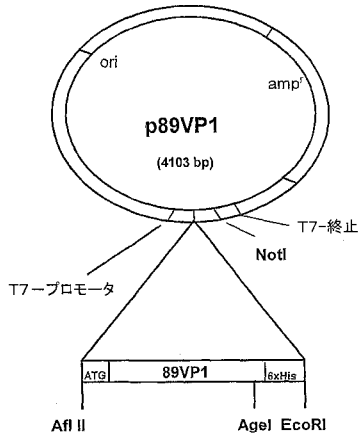
40

【図21】IgE反応性の比較を示す。

【図22】Phl p 5由来ペプチド(1、2)および異形(1a、2b)のリンパ球増殖応答を示す。

【図23】抗VP1抗体の干渉効果を示す。

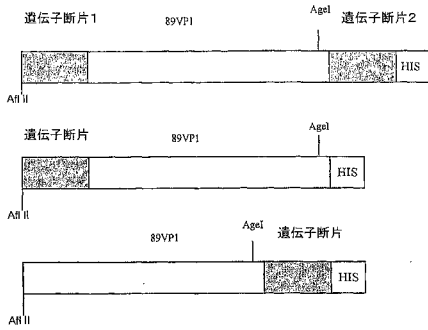
【 図 1 A 】



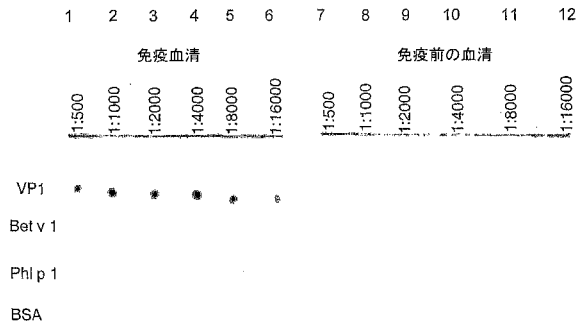
【 図 1 B 】

MCS p89VP1:
 SD MR
 5'..TAAGAAGGAGATATATCTTAAAGATG AAC CCA GTT GAA AAT TAT ATA GAT
 開始 N P V E N Y I D
 AGT GTA TTA AAT GAA GTT CTT GTG GTG GCA AAT ATC CAA CCT AGC ACA
 S V L N E V L V V P N I Q P S T
 TCT GTG TCA AGT CGT GCA GCG CCT GCA TTG GAT GCT GCG GAA ACC
 S V S S H A A P A L D A A E T
 GGA CAC AGC AGC TCT GTT CAA CCT GAA GGT ATG ATT GAA ACT AGA
 G H T S S V Q P E D M I E T R
 TAT GTT ATA ACT GAT CAA ACA AGG GAT GAA ACA AGT ATT GAG AGT TTC
 Y V I T D D O Y R D E T S I E S F
 TTA GGT AGG TCA GCG TGT ATC GCT ATG ATA GAA TTT AAT ACA AGT AGT
 L G R S G C I A M I E F N T S S
 GAT AAA ACT GAA CAT GAT AAA ATT GGT AAA GGA TTC AAA AGA TGG AAG
 D K T E H D K I G K G E K T W K
 GTT AGT CTT CAA GAA ATG GCA CAA ATC AGA AGA AAA TAT GAA TTA TTC
 I S L Q E M A Q I R R K Y E L F
 ACA TAT ACA AGA TTT GAT TCA GAG ATA AGA ATA GTC ACT GCA GCC GCA
 T Y T R F D S E I T I V T A A A
 CCT CAA GGA AAT GAT AGT GGA CAT ATA GTA TTG CAA TTT ATG TAT GTA
 A D G D D S G H I V L Q F M Y V
 CCC CCA GGA GCA CCT GTC CCC GAA AAA CGT GAT BAT TAC ACA TGG
 P P G A P V P E K R D D Y T W
 CAA TCA GGA ACA AAT GCA TCT GTC TTC TGG CAA GAA GGA CAA CCA
 Q S G T N A S V F W Q E G Q P
 TAC CCC AGA TTC ACA ATC CGT TTT ATG AGC ATT GCA TCA GCC TAT TAC
 Y P R F T I P F M S I A S A Y Y
 ATG TTT TAT GAT GGT TAT GAT GGT GAT AGT GCA GCA TCA AAA TAC GGT
 M F Y D G Y D G D S A A S K Y G
 TCT GTA GTC ACT AAT GAT ATG GSA ACC ATA TGT GTT AGA ATA GTG ACA
 S V V T N D M G T I C V R I V T
 TCC AAC CAA AAA CAT GAT TTA AAT AIT GTG TGC CGC ATT TAC CAC AAG
 S N Q K H D L N I V C R I Y H K
 GCC AAA CAT ATA AAA GCA TGG GT CDT CGC CCA CCA AGG GCT GTT GCC
 A K H I K A W C P R P P R A V A
 TAT CAA CAC ACA CAG TCA ACC AAT TAC ATA CCA TCC AAT GGT GAG GCC
 Y Q H T H S T N Y I P S N G E A
 ACA ACT CAG ATT AAA AGC AGA CCT GAT GTT TTT AGC GGT ACA AAC GTC
 T T Q I K T R P D V F T G T N V
 CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAA TTT TGC AGA TAT CCA TCA CAC
 H H H H H H 終止 EcoRV
 TGG CGG CGG GTC GAG GAG ATC CCG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG
 NotI
 AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG ... 3'

【 図 1 C 】



【 図 3 】



【 図 2 】

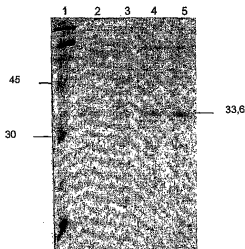
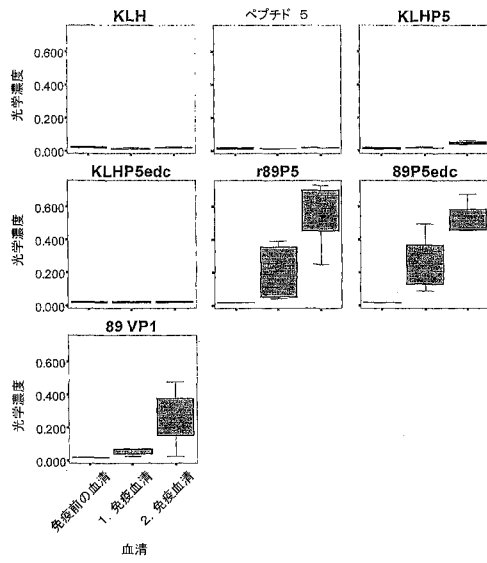
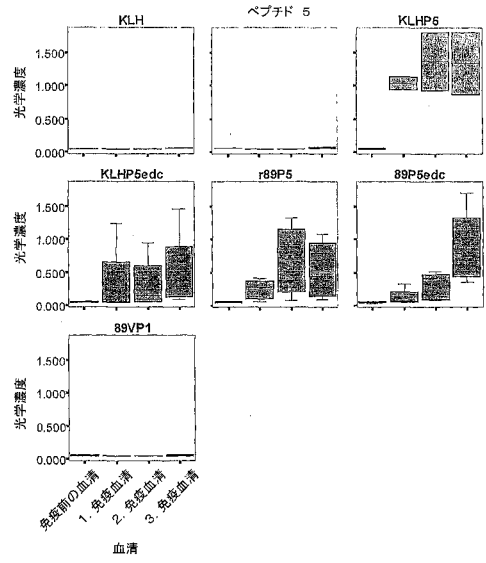


Fig. 2

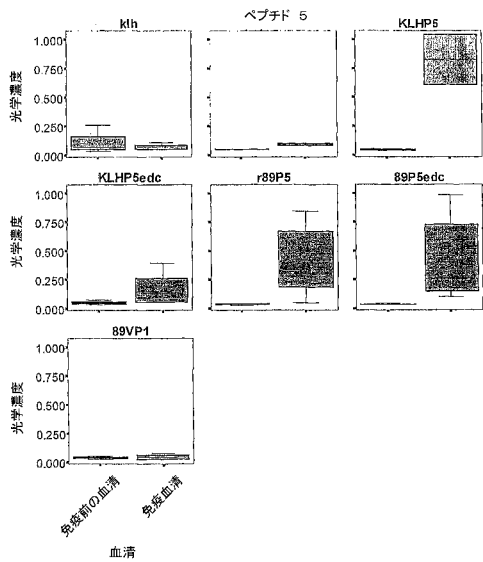
【 図 4 】



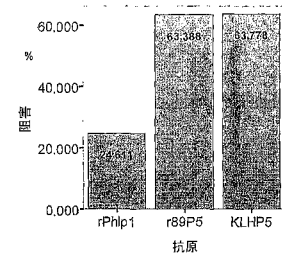
【 図 5 】



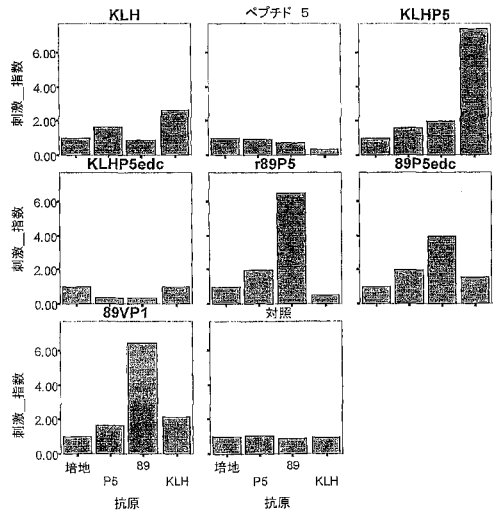
【 図 6 】



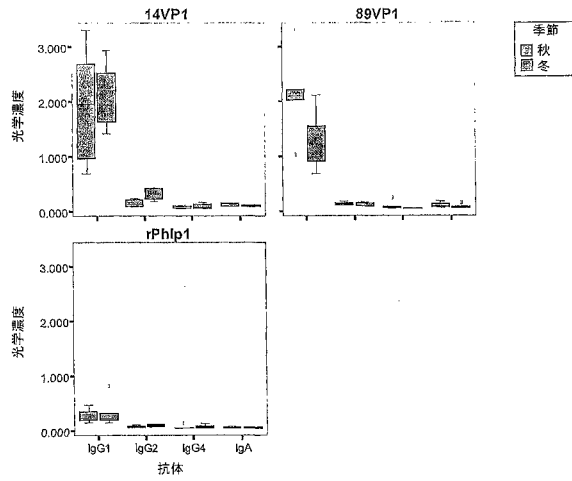
【 図 7 】



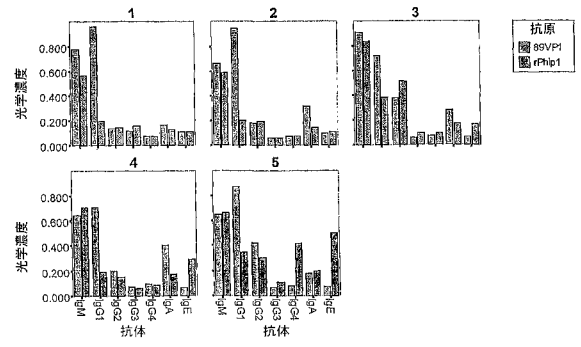
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

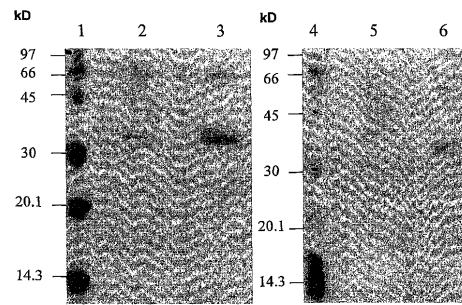


Fig. 11

【 図 12 】

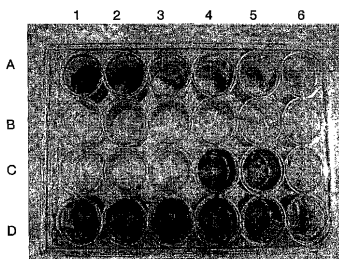


Fig. 12

【 図 12 A 】

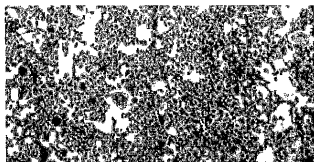


Fig. 12A

【 図 12 B 】

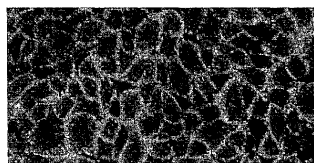
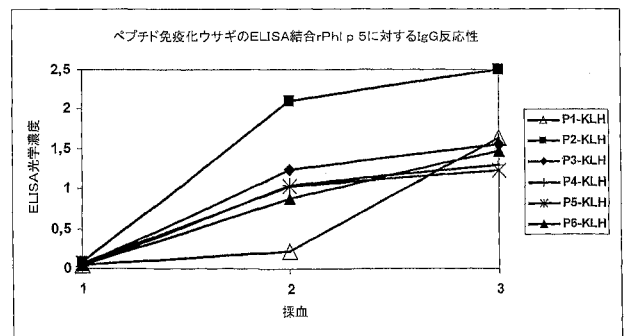
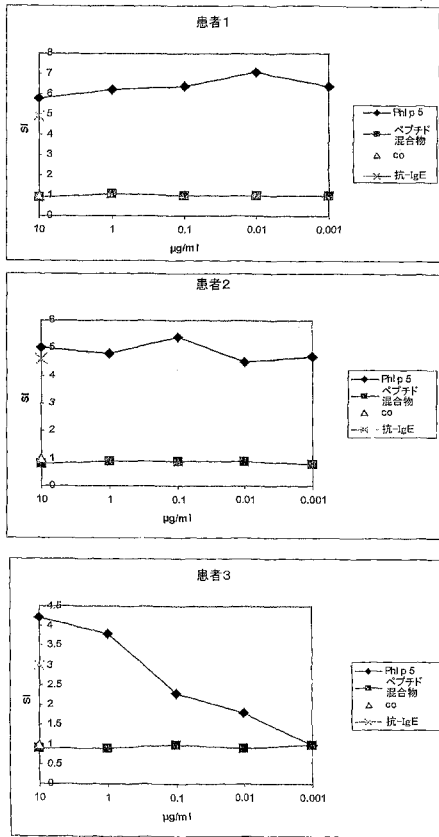


Fig. 12B

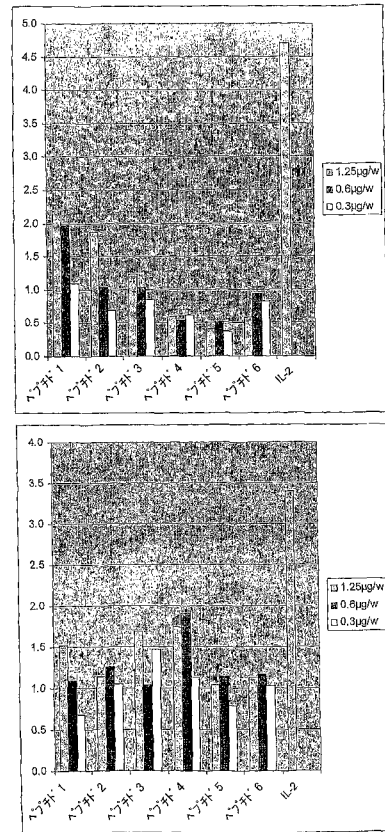
【 図 13 】



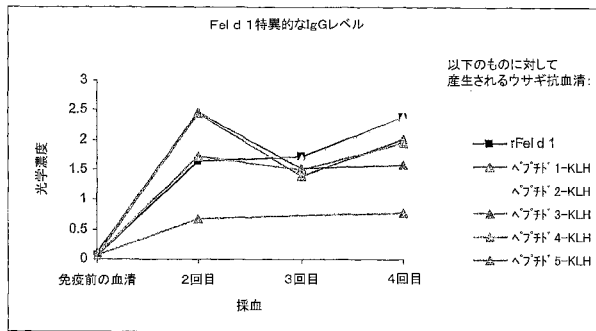
【 図 1 4 】



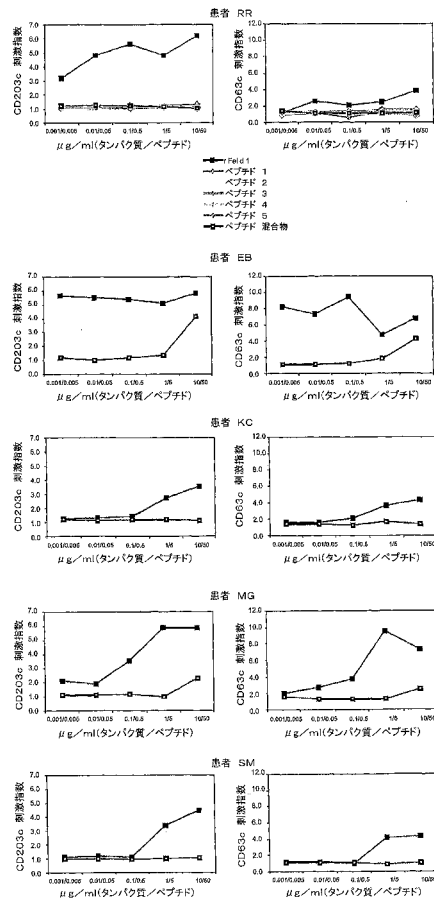
【 図 1 5 】



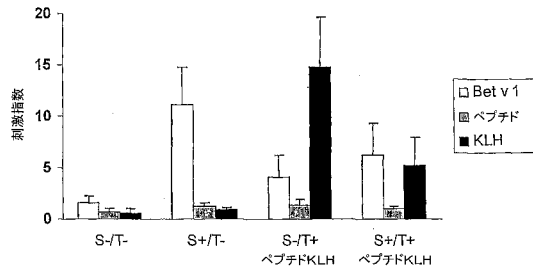
【 図 1 6 】



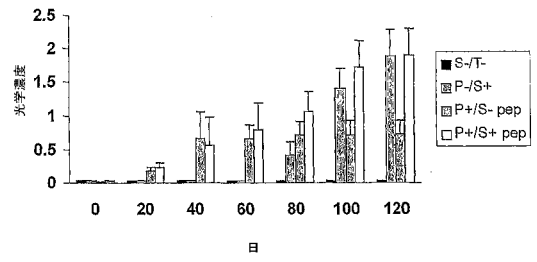
【 図 1 7 】



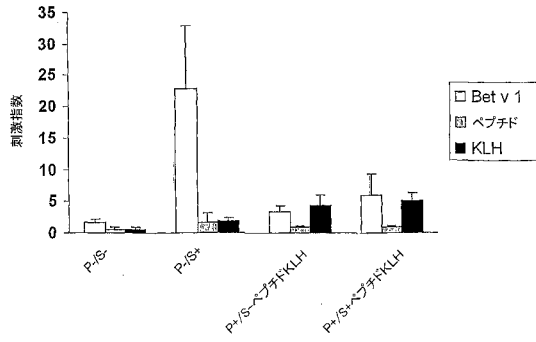
【 図 1 8 】



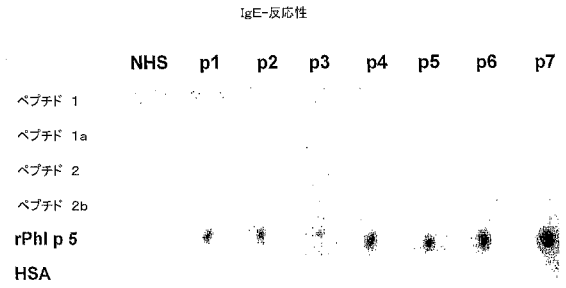
【 図 2 0 】



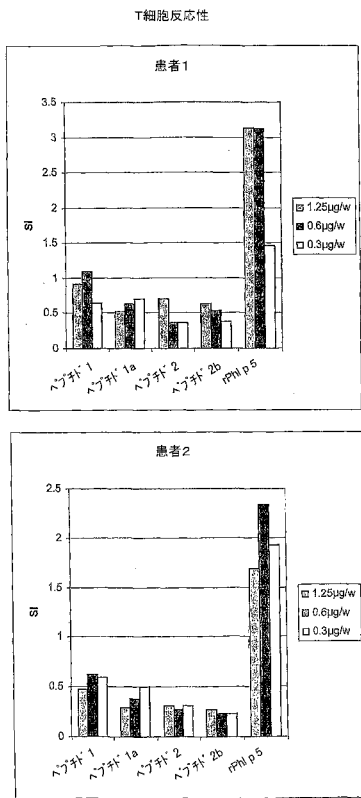
【 図 1 9 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

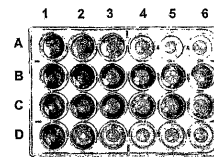


Fig. 23

【配列表】

2009539354000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/AT2007/000281
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K19/00 A61K38/16 A61K39/35		
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) 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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/072601 A (MERCK PATENT GMBH [DE]; SUCK ROLAND [DE]; FIEBIG HELMUT [DE]; CROMWELL) 4 September 2003 (2003-09-04) page 9, line 16 - page 10, line 16; claims 12-15	1-26
X	WO 02/40676 A (ALK ABELLO AS [DK]; HOLM JENS [NO]; IPSEN HENRIK [DK]; NEDERGAARD LARS) 23 May 2002 (2002-05-23) page 29 - page 30; page 45, line 25 - page 46, line 6; page 48, line 15 - page 49, line 14 page 18 - page 20; example 1	1-20
X	WO 2006/058359 A (BIOMAY PROD & HANDEL [AT]; WESTRITSCHNIG KERSTIN [AT]; FOCKE MARGARETE) 8 June 2006 (2006-06-08) page 5 - page 6; claims 11-29; table A	1-26
-/--		
<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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 January 2008		05/02/2008
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 Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2007/000281

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/088549 A1 (ARNOLD GAIL F [US] ET AL) 27 April 2006 (2006-04-27) paragraph [0004]; claims 1-34	27, 28
X	WO 02/04007 A (UNIV GEORGETOWN [US]; SCHLEGEL C RICHARD [US]; GARCEA ROBERT [US]) 17 January 2002 (2002-01-17) page 7, lines 16-20; page 6, line 1 - line 9; claims 29-31	27, 28
A	EP 0 358 485 A (WELLCOME FOUND [GB]) 14 March 1990 (1990-03-14) claims 1,2,9,10	27, 28
A	BREITWIESER A ET AL: "A recombinant bacterial cell surface (S-layer)-major birch pollen allergen-fusion protein (rSbsC/Bet v1) maintains the ability to self-assemble into regularly structured monomolecular lattices and the functionality of the allergen" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 15, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 243-249, XP002240938 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-26
A	ELFMAN L H M ET AL: "IgE binding capacity of synthetic and recombinant peptides of the major storage mite (Lepidoglyphus destructor) allergen, Lep d 2" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, XX, XX, vol. 117, no. 3, November 1998 (1998-11), pages 167-173, XP008086057 ISSN: 1018-2438 abstract; page 168, left-hand column; figures 2 and 4; page 172	1-26
A	BAUER R ET AL.: "Generation of hypoallergic DNA vaccines by forced ubiquitination: Preventive and therapeutic effects in a mouse model of allergy" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 118, 10 May 2006 (2006-05-10), pages 269-276, XP002459963 abstract	1-26
A	WO 2004/092210 A (NAT UNIVERSITY OF SYNGAPORE [SG]; AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY [SG];) 28 October 2004 (2004-10-28) claims 1-44	1-26

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2007/000281

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/12503 A (UNIV MADRID COMPLUTENSE [ES]; RODRIGUEZ GARCIA ROSALIA [ES]; VILLALBA) 14 February 2002 (2002-02-14) claims 3,15	1-26
A	WO 2006/008018 A (MERCK PATENT GMBH [DE]; FIEBIG HELMUT [DE]; WALD MARTIN [DE]; NANDY AN) 26 January 2006 (2006-01-26) page 14, line 10 - line 29; page 12, line 4 - line 15; claims 1-26	1-26
A	GONZALEZ ET AL: "Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 43, no. 6, February 2006 (2006-02), pages 570-578, XP005211223 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-26
A	WO 2005/085278 A (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE [IT]; GERACI DOMENICO [IT]; BONURA ANGELA) 15 September 2005 (2005-09-15) page 5 - page 7; claims 1-23	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AT2007/000281

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 27 and 28 encompass a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
27,28 (completely) and 1-26 (partially), directed to inventions 1 and 13
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/AT2007/000281

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-26 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major birch pollen allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

2. claims: 29-32 (completely) and 1-26,39-57 (partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major timothy grass pollen allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

3. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major house dust mite allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

4. claims: 33-38 (completely) and 1-26,39-57 (partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major cat allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

5. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major bee allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

6. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from major wasp allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

7. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from profilins, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

8. claims: 1-26,39-57 (all partially)

International Application No. PCT/AT2007 /000281

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from olive allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

9. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from Parietaria judaica allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

10. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from Ragweed allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

11. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from mugwort pollen allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

12. claims: 1-26,39-57 (all partially)

hypoallergenic protein, wherein the allergen is selected from storage mite allergens, its nucleic acid molecule, vector, host, antibody, vaccine and use

13. claims: 27,28 (completely)

use of a viral capsid protein from a virus of the family of picornaviridae as a carrier or for diagnosing a viral infection

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/AT2007/000281

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 03072601	A	04-09-2003	AU 2003208817 A1	09-09-2003			
			CA 2477409 A1	04-09-2003			
			JP 2005536454 T	02-12-2005			
			RU 2311424 C2	27-11-2007			
			US 2005123568 A1	09-06-2005			
WO 0240676	A	23-05-2002	AU 2350502 A	27-05-2002			
			CA 2429172 A1	23-05-2002			
			CN 1484699 A	24-03-2004			
			CZ 20031653 A3	17-03-2004			
			EP 1373510 A2	02-01-2004			
			HU 0302601 A2	28-11-2003			
			JP 2004521618 T	22-07-2004			
			MX PA03004174 A	02-12-2004			
			NO 20032213 A	02-07-2003			
			NZ 525820 A	28-01-2005			
			PL 362273 A1	18-10-2004			
			WO 2006058359	A	08-06-2006	AT 501101 A1	15-06-2006
						AU 2005312324 A1	08-06-2006
CA 2589187 A1	08-06-2006						
CN 101068830 A	07-11-2007						
EP 1817330 A2	15-08-2007						
US 2006088549	A1	27-04-2006	NONE				
WO 0204007	A	17-01-2002	AU 7543801 A	21-01-2002			
			EP 1305039 A2	02-05-2003			
			US 2007212374 A1	13-09-2007			
EP 0358485	A	14-03-1990	AU 4122689 A	15-03-1990			
			DK 442189 A	09-03-1990			
			JP 2223594 A	05-09-1990			
			ZA 8906820 A	27-06-1990			
WO 2004092210	A	28-10-2004	GB 2417246 A	22-02-2006			
			US 2006275312 A1	07-12-2006			
WO 0212503	A	14-02-2002	AU 7256501 A	18-02-2002			
			ES 2209563 A1	16-06-2004			
WO 2006008018	A	26-01-2006	AU 2005263477 A1	26-01-2006			
			CA 2574449 A1	26-01-2006			
			CN 1989151 A	27-06-2007			
			DE 102004035337 A1	16-03-2006			
			EP 1768996 A1	04-04-2007			
WO 2005085278	A	15-09-2005	CA 2558660 A1	15-09-2005			
			EP 1720900 A1	15-11-2006			
			US 2007178122 A1	02-08-2007			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/44 (2006.01)	C 0 7 K 14/44	
C 0 7 K 14/085 (2006.01)	C 0 7 K 14/085	
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Q
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 P 21/08	

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

- (72)発明者 リンハート, ビルギット
オーストリア, アー - 3 6 1 0 ヴァイセンキルヒェン, ヌマー 9 5
- (72)発明者 ビラタラ, スザンネ
オーストリア, アー - 1 2 1 0 ウィーン, シェンケンドルフガッセ 1 6 / 1 / 4
- (72)発明者 ヴァレント, ベーター
オーストリア, アー - 1 1 8 0 ウィーン, シュールガッセ 7 / 1 8
- (72)発明者 ライニンガー, レナーテ
オーストリア, アー - 1 0 4 0 ウィーン, ホイミュールガッセ 1 6 / 1 4
- (72)発明者 シュピツアウアー, スザンネ
オーストリア, アー - 1 1 3 0 ウィーン, ラインツァー シュトラーセ 5 6
- (72)発明者 スヴォボダ, イネス
オーストリア, アー - 1 0 2 0 ウィーン, グローセ シュペールガッセ 7 / 4
- (72)発明者 ヴァン ハーゲ, マリアンネ
スウェーデン, エス - 1 6 7 5 8 ブロンマ, ソベルグレンド 1 1
- (72)発明者 グルンルンド, ハンス
スウェーデン, エス - 1 8 1 6 1 リディング, パルクセトラヴェーゲン 2 3
- (72)発明者 ティンホーファ, ヨハナ
オーストリア, アー - 1 0 9 0 ウィーン, リヒテンシュタインシュトラーセ 1 1 2 / 8
- (72)発明者 ヴェストリッチング, ケルスティン
オーストリア, アー - 1 1 8 0 ウィーン, ゲンツガッセ 9 2
- (72)発明者 ポポフ - クラウプ, テレジア
オーストリア, アー - 1 1 8 0 ウィーン, ペッツラインスドルファーシュトラーセ 1 7 / 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA42 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11
EA04 GA11 HA03
4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA86Y AA87X AA87Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA45 CA46
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA10 CA20 CA30 CA40 CA50
DA76 DA86 EA31 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	疫苗载体		
公开(公告)号	JP2009539354A	公开(公告)日	2009-11-19
申请号	JP2009513514	申请日	2007-06-11
[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	ヴァレンタルドルフ フォッケテイケルマルガレーテ リンハートビルギット ビラタラスザンネ ヴァレントペーター ライニンガーレナーテ シュピツアウアースザンネ スヴォボダイネス ヴァンハーゲマリアンネ グルンルンドハンス テインホーフアヨハナ ヴェストリッチングケルスティン ポポフクラウドテレジア		
发明人	ヴァレンタルドルフ フォッケ-テイケル,マルガレーテ リンハート,ビルギット ビラタラ,スザンネ ヴァレント,ペーター ライニンガー,レナーテ シュピツアウアー,スザンネ スヴォボダ,イネス ヴァン ハーゲ,マリアンネ グルンルンド,ハンス テインホーフア,ヨハナ ヴェストリッチング,ケルスティン ポポフ-クラウド,テレジア		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/005 C07K14/195 C07K14/37 C07K14/44 C07K14/085 C07K14/415 C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/00 A61K39/00 A61P31/12 A61P37/08 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/35 A61K39/36 A61K2039/5256 A61K2039/5258 C07K14/415 C07K19/00 C12N2770/32734		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K14/005 C07K14/195 C07K14/37 C07K14/44 C07K14/085 C07K14/415 C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/00 A61K39/00.H A61P31/12 A61P37/08 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.Q G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA42 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA57X 4B065/AA57Y 4B065/AA86Y 4B065/AA87X 4B065/AA87Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA10 4H045/CA20 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		

優先権

2006000994 2006-06-09 AT

其他公开文献

JP5399895B2

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本发明涉及一种低变应原性蛋白质，其由至少一种衍生自过敏原的低变应原性分子组成，其与至少一种第二非变应原性蛋白质或其片段融合或缀合。

ペプチド	位置	配列	配列番号
Pep Alt a 1.1	19-58	APLESRQDTASCPTVTEGDIYVWKISEFYGRKPEGTYYNSL	23
Pep Alt a 1.2	59-95	GFNIKATNGGTLDFTCGAGADKLEDHKWYSCGENSEFM	24
Pep Alt a 1.3	91-120	ENSMDFSPDSDBGLLLKQKVSDDITYVA	25
Pep Alt a 1.4	121-157	RATLPNYCHASSNGPKDPVCGVADAYITLVLTKPSS	26
Pep Alt a 2.1	1-40	MHSNNPFKDNIPRLGSKEDDDYSRNETGGVIRLHWDAQ	27
Pep Alt a 2.2	41-80	LLMLSARKRMKVAFKLDEKQDRVWDRCTADDLGRNGFKR	28
Pep Alt a 2.3	81-120	CLQPTLYRPRDLLSLNEDAFESAFENRETTINTDLEKYAA	29
Pep Alt a 2.4	121-160	KSTSMARLEDLWKEYQKIPFISQVITSAFRGIEPELTVYT	30
Pep Alt a 2.5	161-190	CLKKIEASFLEEEENGDFKITSKIQLLKAS	31
Pep Alt a 6.1	1-34	MTTKIHRASVYDSRGNPTVEVDIVTEFGLHRAI	32
Pep Alt a 6.2	35-74	VTETGLHRAIVFSGASTGSHKACELRGGDKRWGCKGVTK	33
Pep Alt a 6.3	74-115	APALIKKELDYKQSAVDAFLNKLDSFTTKNLGAMAILGVS	34
Pep Alt a 6.4	125-165	EKGVPLYAHISDLACT KRFYVLPVVF QNVLNGGSHAGGRLA	35
Pep Alt a 6.5	174-213	CEAPTFSAMRGGAEVYOKLKLARKIYGGQAGNVGDESS	36
Pep Alt a 6.6	241-280	EKLAMDVASSSEFYKADEKKYDLDKFNPDSDRSKWLTFEGL	37
Pep Alt a 6.7	294-333	VSIEDPFAEDDWEAWSYFFRFYDGGIVGDDLVYTNPEFK	38
Pep Alt a 6.8	361-400	AKDAPGAGWGMVSHRSGEDEDVTIADIVVGLRSGQIKTG	39
Pep Alt a 6.9	401-438	APAKSERLAKLNQITLREBELGONAVYAGNNFRFVNL	40
Pep Amb a 1.1	31-70	EILPVNTRRLTTSQAYNIDGCRWKGADWAENRKLADC	41
Pep Amb a 1.2	80-120	GGKDGDIYTVTSELDLDDVANPKGTLRFGAAGNRRLWILFE	42
Pep Amb a 1.3	125-155	IRLDKRMVVNSDKTLDGRGARVEIINAGFTL	43
Pep Amb a 1.4	160-200	NVIHINIHMIDVKVNFGLIKGNDGPAAPRAGSDGDAISIS	44
Pep Amb a 1.5	225-263	GFTFLVNSLFTQHGFVLEFGAGDENIEDRGLATVAF	45