

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5719512号
(P5719512)

(45) 発行日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(24) 登録日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)

(51) Int.Cl.	F 1				
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A		
C 0 7 K 14/415 (2006. 01)	C 0 7 K	14/415			
A 6 1 K 39/36 (2006. 01)	A 6 1 K	39/36			
A 6 1 P 37/08 (2006. 01)	A 6 1 P	37/08			
G 0 1 N 33/53 (2006. 01)	G 0 1 N	33/53		Q	
請求項の数 13 (全 47 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号 特願2009-549373 (P2009-549373)
 (86) (22) 出願日 平成20年2月13日 (2008. 2. 13)
 (65) 公表番号 特表2010-518813 (P2010-518813A)
 (43) 公表日 平成22年6月3日 (2010. 6. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/001092
 (87) 国際公開番号 W02008/098749
 (87) 国際公開日 平成20年8月21日 (2008. 8. 21)
 審査請求日 平成23年1月19日 (2011. 1. 19)
 (31) 優先権主張番号 07102260. 2
 (32) 優先日 平成19年2月13日 (2007. 2. 13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 507180423
 ビオマイ アクチエンゲゼルシャフト
 オーストリア, ヴィエンナ アー-109
 O, トップ 1, ラツァレットガッセ 1
 9
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK
 (72) 発明者 フェレイラ, ファチマ
 オーストリア, アー-5020 ザルツブ
 ルグ, ラッドニツキシュトラーセ 16
 (72) 発明者 ボーレ, バーバラ
 オーストリア, アー-1040 ヴィエン
 ナ, ワーガッセ 17-19/26
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プタクサ (アンブロシアアルテミシーフォリア) の主要アレルゲンから得られるペプチドおよびこれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドを備える、ワクチン調合物。

【請求項 2】

配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 7 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 8 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 9 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 1 3 7 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 8 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 1 3 8 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 9 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 1 3 7 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 9 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド；または配列番号 5 2 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 1 3 7 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 1 3 8 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 1 3 9 によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドを備える、請求項 1 に記載のワクチン調合物

。【請求項3】

少なくとも1つの薬学的に受容可能な補佐剤、賦形剤および/または担体をさらに備えることを特徴とする請求項1または2に記載のワクチン調合物。

【請求項4】

配列番号52によって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、または1アミノ酸残基だけ異なるそのバリエーションからなり、かつブタクサ花粉アレルギーAmb a 1から得られる、ペプチド。

【請求項5】

請求項4に記載のペプチドおよび免疫原から得られる第2のペプチドの少なくとも1つを備え、

上記免疫原が、Amb a 2、Amb a 3、Amb a 5、Amb a 6、Amb a 7、Amb a 8、Amb a 9、Amb a 10、Amb t 5、Art v 1、Art v 2、Art v 3、Art v 4、Art v 5、Art v 6、Hel a 1、Hel a 2、Hel a 3、Mer a 1、Che a 1、Che a 2、Che a 3、Sal k 1、Cat r 1、Pla l 1、Hum j 1、Par j 1、Par j 2、Par j 3、Par o 1、Cyn d 1、Cyn d 7、Cyn d 12、Cyn d 15、Cyn d 22w、Cyn d 23、Cyn d 24、Dac g 1、Dac g 2、Dac g 3、Dac g 5、Fes p 4w、Hol l 1、Lol p 1、Lol p 2、Lol p 3、Lol p 5、Lol p 11、Pha a 1、Phl p 1、Phl p 2、Phl p 4、Phl p 5、Phl p 6、Phl p 11、Phl p 12、Phl p 13、Poa p 1、Poa p 5、Sor h 1、Pho d 2、Aln g 1、Bet v 1、Bet v 2、Bet v 3、Bet v 4、Bet v 6、Bet v 7、Car b 1、Cas s 1、Cas s 5、Cas s 8、Cor a 1、Cor a 2、Cor a 8、Cor a 9、Cor a 10、Cor a 11、Que a 1、Fra e 1、Lig v 1、Ole e 1、Ole e 2、Ole e 3、Ole e 4、Ole e 5、Ole e 6、Ole e 7、Ole e 8、Ole e 9、Ole e 10、Syr v 1、Cry j 1、Cry j 2、Cup a 1、Cup s 1、Cup s 3w、Jun a 1、Jun a 2、Jun a 3、Jun o 4、Jun s 1、Jun v 1、Pla a 1、Pla a 2、Pla a 3、Aca s 13、Blo t 1、Blo t 3、Blo t 4、Blo t 5、Blo t 6、Blo t 10、Blo t 11、Blo t 12、Blo t 13、Blo t 19、Der f 1、Der f 2、Der f 3、Der f 7、Der f 10、Der f 11、Der f 14、Der f 15、Der f 16、Der f 17、Der f 18w、Der m 1、Der p 1、Der p 2、Der p 3、Der p 4、Der p 5、Der p 6、Der p 7、Der p 8、Der p 9、Der p 10、Der p 11、Der p 14、Der p 20、Der p 21、Eur m 2、Eur m 14、Gly d 2、Lep d 1、Lep d 2、Lep d 5、Lep d 7、Lep d 10、Lep d 13、Tyr p 2、Tyr p 13、Bos d 2、Bos d 3、Bos d 4、Bos d 5、Bos d 6、Bos d 7、Bos d 8、Can f 1、Can f 2、Can f 3、Can f 4、Equ c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4、Equ c 5、Fel d 1、Fel d 2、Fel d 3、Fel d 4、Fel d 5w、Fel d 6w、Fel d 7w、Cav p 1、Cav p 2、Mus m 1、Rat n 1、Alt a 1、Alt a 3、Alt a 4、Alt a 5、Alt a 6、Alt a 7、Alt a 8、Alt a

10、Alt a 12、Alt a 13、Cla h 2、Cla h 5、Cla
 h 6、Cla h 7、Cla h 8、Cla h 9、Cla h 10、Cl
 a h 12、Asp fl 13、Asp f 1、Asp f 2、Asp f 3
 、Asp f 4、Asp f 5、Asp f 6、Asp f 7、Asp f 8
 、Asp f 9、Asp f 10、Asp f 11、Asp f 12、Asp
 f 13、Asp f 15、Asp f 16、Asp f 17、Asp f 18
 、Asp f 22w、Asp f 23、Asp f 27、Asp f 28、As
 p f 29、Asp n 14、Asp n 18、Asp n 25、Asp o
 13、Asp o 21、Pen b 13、Pen b 26、Pen ch 13、
 Pen ch 18、Pen ch 20、Pen c 3、Pen c 13、Pen
 c 19、Pen c 22w、Pen c 24、Pen o 18、Fus c
 1、Fus c 2、Tri r 2、Tri r 4、Tri t 1、Tri t
 4、Cand a 1、Cand a 3、Cand b 2、Psi c 1、Psi
 c 2、Cop c 1、Cop c 2、Cop c 3、Cop c 5、Cop
 c 7、Rho m 1、Rho m 2、Mala f 2、Mala f 3、M
 ala f 4、Mala s 1、Mala s 5、Mala s 6、Mala
 s 7、Mala s 8、Mala s 9、Mala s 10、Mala s 1
 1、Mala s 12、Mala s 13、Epi p 1、Aed a 1、Ae
 d a 2、Api m 1、Api m 2、Api m 4、Api m 6、Ap
 i m 7、Bom p 1、Bom p 4、Bla g 1、Bla g 2、Bl
 a g 4、Bla g 5、Bla g 6、Bla g 7、Bla g 8、Pe
 r a 1、Per a 3、Per a 6、Per a 7、Chi k 10、C
 hi t 1-9、Chi t 1.01、Chi t 1.02、Chi t 2.0
 101、Chi t 2.0102、Chi t 3、Chi t 4、Chi t 5
 、Chi t 6.01、Chi t 6.02、Chi t 7、Chi t 8、C
 hi t 9、Cte f 1、Cte f 2、Cte f 3、Tha p 1、L
 ep s 1、Dol m 1、Dol m 2、Dol m 5、Dol a 5、P
 ola 1、Pol a 2、Pol a 5、Pol d 1、Pol d 4、P
 old 5、Pol e 1、Pol e 5、Pol f 5、Pol g 5、P
 olm 5、Vesp c 1、Vesp c 5、Vesp m 1、Vesp m
 5、Ves f 5、Ves g 5、Ves m 1、Ves m 2、Ves m
 5、Ves p 5、Ves s 5、Ves vi 5、Ves v 1、Ves
 v 2、Ves v 5、Myr p 1、Myr p 2、Sol g 2、Sol
 g 4、Sol i 2、Sol i 3、Sol i 4、Sol s 2、Tria
 p 1、Gad c 1、Sal s 1、Bos d 4、Bos d 5、Bos
 d 6、Bos d 7、Bos d 8、Gal d 1、Gal d 2、Gal
 d 3、Gal d 4、Gal d 5、Met e 1、Pen a 1、Pen
 i 1、Pen m 1、Pen m 2、Tod p 1、Hel as 1、Ha
 l m 1、Ran e 1、Ran e 2、Bra j 1、Bra n 1、Br
 a o 3、Bra r 1、Bra r 2、Hor v 15、Hor v 16、
 Hor v 17、Hor v 21、Sec c 20、Tri a 18、Tri
 a 19、Tri a 25、Tri a 26、Zea m 14、Zea m 25
 、Ory s 1、Api g 1、Api g 4、Api g 5、Dau c 1
 、Dau c 4、Cor a 1.04、Cor a 2、Cor a 8、Fra
 a 3、Fra a 4、Mal d 1、Mal d 2、Mal d 3、Mal
 d 4、Pyr c 1、Pyr c 4、Pyr c 5、Pers a 1、Pru
 ar 1、Pru ar 3、Pru av 1、Pru av 2、Pru av
 3、Pru av 4、Pru d 3、Pru du 4、Pru p 3、Pru
 p 4、Aspa o 1、Cro s 1、Cro s 2、Lac s 1、Vit
 v 1、Mus xp 1、Ana c 1、Ana c 2、Cit l 3、Ci

10

20

30

40

50

t s 1、C i t s 2、C i t s 3、L i t c 1、S i n a 1、G l y m 1、G l y m 2、G l y m 3、G l y m 4、V i g r 1、A r a h 1、A r a h 2、A r a h 3、A r a h 4、A r a h 5、A r a h 6、A r a h 7、A r a h 8、L e n c 1、L e n c 2、P i s s 1、P i s s 2、A c t c 1、A c t c 2、C a p a 1w、C a p a 2、L y c e 1、L y c e 2、L y c e 3、S o l a t 1、S o l a t 2、S o l a t 3、S o l a t 4、B e r e 1、B e r e 2、J u g n 1、J u g n 2、J u g r 1、J u g r 2、J u g r 3、A n a o 1、A n a o 2、A n a o 3、R i c c 1、S e s i 1、S e s i 2、S e s i 3、S e s i 4、S e s i 5、S e s i 6、C u c m 1、C u c m 2、C u c m 3、Z i z m 1、A n i s 1、A n i s 2、A n i s 3、A n i s 4、A r g r、A s c s 1、C a r p 1、D e n n 1、H e v b 1、H e v b 2、H e v b 3、H e v b 4、H e v b 5、H e v b 6.01、H e v b 6.02、H e v b 6.03、H e v b 7.01、H e v b 7.02、H e v b 8、H e v b 9、H e v b 10、H e v b 11、H e v b 12、H e v b 13、H o m s 1、H o m s 2、H o m s 3、H o m s 4、H o m s 5およびT r i p s 1からなる群から選択される、アレルゲンであることを特徴とする分子。

10

【請求項6】

20

配列番号12、配列番号20、配列番号27、配列番号28、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号83、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、および配列番号139のいずれかによって示されるアミノ酸配列からなるペプチド、ならびに1アミノ酸残基だけ異なるそのバリエーションからなる群から選択され、かつブタクサ花粉アレルゲンAmb a 1から得られるペプチドの少なくとも1つをさらに備える、請求項5に記載の分子。

30

【請求項7】

請求項4に記載のペプチドまたは請求項5もしくは6に記載の分子をコードする、核酸分子。

40

【請求項8】

請求項7に記載の核酸分子を備える、ベクター。

【請求項9】

上記核酸分子に対して作動可能に連結されたプロモータをさらに備えることを特徴とする請求項8に記載のベクター。

【請求項10】

請求項5もしくは6に記載の分子の少なくとも1つを備える、ワクチン調合物。

【請求項11】

少なくとも1つの薬学的に受容可能な補佐剤、賦形剤および/または担体をさらに備え

50

る、請求項 10 に記載のワクチン調合物。

【請求項 12】

ワクチン調合物の製造に関する、請求項 4 に記載のペプチドの少なくとも 1 つ、および / または請求項 5 もしくは 6 に記載の分子の使用であって、

上記ワクチン調合物が、個体におけるブタクサ花粉アレルギー、またはブタクサ花粉アレルギーと交差反応するアレルギーを処置または予防するためのものである、使用。

【請求項 13】

上記ブタクサ花粉アレルギーは Amb a 1 によって引き起こされる、請求項 12 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、Amb a 1 由来ペプチドに関する。

【0002】

ブタクサ (アムプロシア アルテミシーフォリア) およびヨモギ (アルテミシア ブルガリス) は、アステラカエア科またはコンposita 工科の植物に属する、重要なアレルギー性の草本である。ヨモギの花粉は、ヨーロッパにおいて晩夏および秋におけるアレルギー反応の主原因の 1 つであり、かつ花粉症にかかっている患者の約 10 ~ 14 % に影響を与える。ブタクサ花粉は、アトピー性 27 . 10 の個体において約 50 % の普及率を有して、米国におけるアレルギー性タンパク質の主要な発生源である。ヨーロッパにおいて、現在、ブタクサアレルギーは、フランス、イタリア、オーストリア、ハンガリー、クロアチア、およびブルガリアにおけるある特定の地域において、急速に増加している。ブタクサの主要なアレルギーである Amb a 1 およびヨモギの主要なアレルギーである Art v 1 のそれぞれは、無関係なタンパク質である。Amb a 1 は、38 kDa の非糖修飾の酸性タンパク質である。天然の Amb a 1 は、精製中にタンパク質分解を受け、かつ鎖および鎖と命名された 2 つの鎖に切断される。26 kDa の鎖は、12 kDa の鎖と非供給結合的に会合することが報告されている (King et al. *Immunochem* 11:83-92, 1974)。Amb a 1 の 2 本鎖の形態は、全長の分子とは免疫学的に識別不能と思われる (King et al. *Arch Biochem Biophys* 212:127-135, 1981)。

20

【0003】

30

ブタクサから得られる天然の Amb a 1 (n Amb a 1) は、最初に説明されかつ単離されたアレルギーであった (King et al. *Biochem* 3:458-468, 1964)。Amb a 1 をコードする cDNA は、Rafnar et al によって 1991 年にブタクサ花粉から単離された (*J. Biol. Chem.* 266:1229-1236)。しかしこれまでのところ、正しくフォールディングされかつ活性な組み換え Amb a 1 (r Amb a 1) を大量に発現し、かつ精製する方法は、報告されていない。

【0004】

国際公開第 96 / 13589 号は、少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを備える、Amb a 1 から得られた単離されたペプチドに関する。

【0005】

40

国際公開第 90 / 11293 号には、Amb a 1 のアミノ酸配列が記載されている。また、これらにおいて、Amb a 1 のペプチドが、T 細胞エピトープを備え、かつアムプロシア特異的な免疫応答を誘発し得ることについて、確認されている。

【0006】

国際公開第 99 / 34826 号は、アレルギーから得られたペプチドを投与することによって、患者を脱感作する方法および手段に関する。当該ペプチドは、個体における T 細胞応答を誘発可能である。

【0007】

Michael J.G. et al (*J.Br.Soc.Aller.Clin.Immunol.* 20(6)(1990):669-674) において、Amb a 1 のプロテアーゼ消化によって得られるペプチドの T 細胞応答が調べられ

50

ている。

【0008】

Cardinale E.J. et al (J.Aller.Clin.Immunol. 107(2001):p 19) は、アレルゲンの同定および性質決定にとってのMALDI-TOF質量分析の使用に関する。

【0009】

同様に、米国特許第6,33,5019号は、個体におけるAmb a 1に対するT細胞応答を誘発し得るAmb a 1に関する。

【0010】

Griffith et al. (Int.Arch.Aller.Appl.Immunol. 96(1991):296-304) は、Amb a 1およびAmb a 2ファミリーの一員の配列多形に関する。

10

【0011】

本発明の目的は、アレルギー（特にブタクサ花粉アレルゲンによって引き起こされるアレルギー）の処置、予防または診断に使用され得る、ブタクサ花粉アレルゲンAmb a 1から得られるペプチドおよび分子を提供することである。

【0012】

したがって、本発明は、Amb a 1、特に配列番号12、配列番号20、配列番号27、配列番号28、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号83、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139 およびこれらの機能的な等価物からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるAmb a 1から得られるペプチドに関する。

20

30

【0013】

配列番号12、配列番号20、配列番号27、配列番号28、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号83、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138および配列番号139からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する本発明のペプチドが、アレルギー性の個体から単離されたT細胞と反応性を示すこと、したがってワクチン（特にブタクサ花粉アレルゲンによって引き起こされるアレルギー

40

50

ーおよびブタクサ花粉アレルゲンと交差反応するアレルギーにとってのワクチン)の製造に使用されることが明らかになった。特に、配列番号52、配列番号68、配列番号86、配列番号91および配列番号126～配列番号139を有するペプチドは、ブタクサ花粉アレルギーにかかっている個体から得られたサンプルと高いT細胞反応性を示す。

【0014】

本発明のペプチドのさらなる利点は、それらのすべてがIgE結合活性を欠如していることである。したがって、これらのペプチドを備える分子は、個体に対して投与された場合に、アレルギー反応(例えば、ヒスタミン放出の増加)を誘発しない。

【0015】

治療を目的としたアレルゲンから得られるペプチドは、Amb a 1に特異的なIgEと結合しないか、または対応する未処置の精製Amb a 1もしくは組み替式的に生成されたAmb a 1の鎖よりも、実質的に低い程度において当該IgEと結合(少なくとも100倍だけ低い程度、より好ましくは少なくとも1000倍だけ低い程度において結合)する。本発明のペプチドが診断試薬として使用される場合には、ペプチドまたはタンパク質が、未処置のAmb a 1アレルゲンと比べて低下したIgE結合活性を有する必要はない。ペプチドのIgE結合活性は、例えばあらかじめAmb a 1にさらされている個体(すなわち、アレルギーの個体)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、測定され得る。簡単に説明すると、試験されるペプチドは、マイクロタイタープレートの壁を覆っている。上記壁を洗浄しかつブロッキングした後に、アレルギーの個体の血清または血漿からなる抗体溶液が、上記壁内においてインキュベートされる。当該アレルギーの個体は、試験されるペプチドまたはペプチドが由来するタンパク質にさらされている。通常、上記血漿は、インキュベーション前にIgGが枯渇させられている。しかし、高い特異性を有する抗IgE抗体が使用される場合には、枯渇は必須ではない。さらに、特定の免疫療法を受けていない個体は、いくつかの場合において、問題のアレルゲンに特異的なIgG抗体をほとんど検出不可可能な状態である。標識された2次抗体が、上記壁内に加えられ、かつインキュベートされる。それから、IgEの結合量が、定量化され、かつ未処置の精製Amb a 1タンパク質によって結合されるIgEの量と比較される。代替可能に、ペプチド結合活性は、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を用いたポリアクリルアミドゲルに流される。それから、ペプチドは、ニトロセルロースに転写され、続いてアレルギー患者からの血清とインキュベートされる。それから、標識された2次抗体とのインキュベーションの後に、IgEの結合量が測定され、かつ定量化される。

【0016】

ペプチドのIgE結合活性の測定に使用され得る他のアッセイは、競合ELISAアッセイである。簡単に説明すると、IgE抗体のプールが、ブタクサ花粉アレルギー個体から得られた血漿または血清を組み合わせることによって生成される。当該血漿または血清は、直接的ELISAによって未処置のAmb a 1とIgE反応性を有していることを示されている。このプールは、未処置のAmb a 1に対するIgEの結合を試験されるペプチドと比較するための、ELISA競合アッセイに使用される。未処置のAmb a 1タンパク質および試験されるペプチドについてのIgE結合は、測定され、かつ定量化される。

【0017】

さらに、本発明のペプチドは、マスト細胞または好塩基球からの媒介物質(例えば、ヒスタミン)の放出を生じないことが好ましい。IgEと結合するペプチドが媒介物質の放出を生じるか否かを測定するために、ヒスタミン放出アッセイが、標準的な試薬および手順を用いて実施され得る。簡単に説明すると、試験されるペプチドの緩衝化溶液は、アレルギー患者から得られた、等容積の完全なヘパリン添加血液と混合される。混合およびインキュベーションの後に、細胞がペレット化される。そして、上清が、例えば放出されたヒスタミンの量を測定するための放射免疫測定を用いて、処理されかつ分析される。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の分子は、本発明のペプチドの2つ以上をあらゆる組み合わせにおいて備え得る。これらのペプチドは、互いに化学的に接合され得るか、または組み換え技術によって融合され得る。当該分子は、少なくとも2、3、4、5、7、10、15、20のペプチド備え得る。

【0019】

本発明の少なくとも1つのペプチドは、当該ペプチドをコードする配列を有する核酸を用いて形質転換された宿主細胞において、組み換えDNA技術によって、生成され得る。また、本発明の単離されたペプチドは、化学合成によって生成され得る。もちろん、タンパク質アレルゲンの化学的切断または酵素的切断によって、ペプチドを生成することも可能である。

【0020】

ペプチドが組み換え技術によって生成される場合に、本発明の核酸（または上記ペプチド（または当該ペプチドの機能的な等価物）をコードする配列を有する核酸の等価物）を用いて形質転換された宿主細胞は、当該細胞にとって好適な培地において培養される。ペプチドは、当該技術において公知のペプチドおよびタンパク質を精製する技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞またはその両方から精製され得る。当該精製する技術としては、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過、電気泳動または当該ペプチドに特異的な抗体を用いた免疫精製が挙げられる。本発明の単離されたペプチドは、組み換えDNA技術によって生成された場合に、細胞由来の物質または培養培地を本質的に含んでいないか、または化学的に合成された場合に、化学的な前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含んでいないか、または化学的切断もしくは酵素的切断によって生成された場合に、他の物質もしくは試薬を含んでいない。

【0021】

また、本発明のペプチドは、アミノ酸置換、アミノ酸欠失またはアミノ酸付加によって改変され得る。したがって、本発明のペプチドは、配列番号1～139のアミノ酸配列の少なくとも7アミノ酸残基を備えている。また、本発明の範囲には、12アミノ酸残基を超えるペプチドが含まれる。ここで、これらの付加的な残基は、未処置のAmb a 1分子から取得され得、かつ未処置のAmb a 1分子、無作為のアミノ酸または他のペプチドもしくはタンパク質において当該ペプチドと隣接して見られ得る。しかし、これらの改変されたペプチド（バリエーション）は、未修飾のペプチドと類似の特性を示すか、または同一の特性さえも示す。特に、免疫原性の特性は、本質的に同一であるべきである。これは、これらの改変されたペプチドを対象にする抗体がまた、配列番号1～139のアミノ酸配列を有するペプチドと結合することを意味する。

【0022】

本発明において使用されるときに、“ペプチド”は、当該ペプチドが得られるタンパク質のアミノ酸配列の全体より少ないアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を指す。また、“ペプチド”という用語は、ペプチドの機能的な等価物もしくはバリエーション、またはペプチドのあらゆる断片もしくは部分を指す。ペプチドの“機能的な等価物”は、同じかもしくは増強されたMHC結合能を有するペプチド、同じT細胞の亜集団を刺激可能なペプチド、T細胞応答（例えば、刺激（増殖またはサイトカイン分泌））の同じかもしくは増強された誘導能を有するペプチド、少なくとも同程度に低下したIgE結合を有するペプチド、およびAmb a 1から直接に得られたペプチドと少なくとも同じ最小レベルのIgE合成刺激活性を誘導するペプチドを含む。最小のIgE刺激活性は、未処置の精製ブタクサ花粉アレルゲンによって誘発されるIgE産生量よりも少ない、IgE合成刺激活性を指す。本発明のペプチドおよびこれらの機能的な等価物は、6～50、好ましくは7～45、より好ましくは8～40、さらに好ましくは9～35、特に10～30のアミノ酸残基からなることが好ましい。本発明のペプチドの“機能的な等価物”は、上記ペプチドのC末端および/またはN末端において少なくとも1つのさらなるアミノ酸残基をさらに備え得る。当該少なくとも1つのさらなるアミノ酸残基は、連結基（例えば、システイン

10

20

30

40

50

)として機能し得るか、または野生型 Amb a 1において当該ペプチドと隣接して見られ得る。

【0023】

本明細書において使用されるときに、“バリエント”という用語は、通常に関連する他のポリペプチドと1つ以上のアミノ酸残基だけ異なっている、アミノ酸配列を指す。バリエントは、“保存的な”変更を有し得る。ここで、置換されたアミノ酸は、類似の構造的な特性または類似の化学的特性を有する。保存的なアミノ酸置換の1種は、類似の側鎖を有する残基が交換可能であることを指す。例えば、脂肪族の側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族-水酸基の側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族の側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性の側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；かつ硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。保存的なアミノ酸置換の好ましい群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンである。保存的な変更よりはまれに、バリエントは“非保存的な”変更を有し得る（例えば、トリプトファンとのグリシンの置換）。また、類似のより少ない変異としては、アミノ酸の欠失もしくは挿入、またはその両方が挙げられる。本発明のペプチドおよび分子の好ましいバリエントは、10%未満、好ましくは5%未満、より好ましくは2%未満の変更（置換、欠失および挿入のいずれか）を有する。

【0024】

本発明の他の局面は、配列番号12、配列番号20、配列番号27、配列番号28、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号83、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138および配列番号139からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、かつブタクサ花粉アレルゲンから得られるペプチドに関する。

【0025】

本発明の他の局面は、本発明のペプチドの少なくとも1つ、および Amb a 1以外の免疫原から得られた第2のペプチドの少なくとも1つを備えるペプチドに関する。

【0026】

本発明の分子は、 Amb a 1に由来しない1つ以上の他の分子と、接合され得るか、化学的に結合され得るか、または融合され得る。当該分子は、例えば、本発明のブタクサ花粉アレルゲンペプチドおよび（例えば細菌起源またはウイルス起源の）上記第2の免疫原に対する免疫応答を誘導する、ワクチンとして使用され得る。

【0027】

本発明のペプチドなどの小分子（ハプテン）に対する抗体を誘発するために、これらの小分子は、担体に結合（例えば、接合）され得る。この結合は、免疫原性のハプテンを作

10

20

30

40

50

り出す。免疫原性は、個体に注入された後に抗体が生成されることを意味する。担体タンパク質に対するハプテンの結合は、しばしば共有結合的であるが、しかし、当該結合は、イオン性であり得るか、またはハプテンおよび担体を架橋する化学的構成要素を介してもたらされ得る。担体は典型的にタンパク質である。しかし、担体はまた、単量体または重合体の形態における糖および脂質を含有し得る。

【0028】

本発明に係る免疫原は、好ましくはアレルゲンである。当該アレルゲンは、Amb a 2、Amb a 3、Amb a 5、Amb a 6、Amb a 7、Amb a 8、Amb a 9、Amb a 10、Amb t 5、Art v 1、Art v 2、Art v 3、Art v 4、Art v 5、Art v 6、Hel a 1、Hel a 2、Hel a 3、Mer a 1、Che a 1、Che a 2、Che a 3、Sal k 1、Cat r 1、Pla l 1、Hum j 1、Par j 1、Par j 2、Par j 3、Par o 1、Cyn d 1、Cyn d 7、Cyn d 12、Cyn d 15、Cyn d 22w、Cyn d 23、Cyn d 24、Dac g 1、Dac g 2、Dac g 3、Dac g 5、Fes p 4w、Hol l 1、Lol p 1、Lol p 2、Lol p 3、Lol p 5、Lol p 11、Pha a 1、Phl p 1、Phl p 2、Phl p 4、Phl p 5、Phl p 6、Phl p 11、Phl p 12、Phl p 13、Poa p 1、Poa p 5、S or h 1、Pho d 2、Aln g 1、Bet v 1、Bet v 2、Bet v 3、Bet v 4、Bet v 6、Bet v 7、Car b 1、C as s 1、C as s 5、C as s 8、Cor a 1、Cor a 2、C or a 8、Cor a 9、Cor a 10、Cor a 11、Que a 1、Fra e 1、Lig v 1、Ole e 1、Ole e 2、Ole e 3、Ole e 4、Ole e 5、Ole e 6、Ole e 7、Ole e 8、Ole e 9、Ole e 10、Syr v 1、Cry j 1、Cry j 2、Cup a 1、Cup s 1、Cup s 3w、Jun a 1、Jun a 2、Jun a 3、Jun o 4、Jun s 1、Jun v 1、Pla a 1、Pla a 2、Pla a 3、Aca s 13、Blo t 1、Blo t 3、Blo t 4、Blo t 5、Blo t 6、Blo t 10、Blo t 11、Blo t 12、Blo t 13、Blo t 19、Der f 1、Der f 2、Der f 3、Der f 7、Der f 10、Der f 11、Der f 14、Der f 15、Der f 16、Der f 17、Der f 18w、Der m 1、Der p 1、Der p 2、Der p 3、Der p 4、Der p 5、Der p 6、Der p 7、Der p 8、Der p 9、Der p 10、Der p 11、Der p 14、Der p 20、Der p 21、Eur m 2、Eur m 14、Gly d 2、L ep d 1、Lep d 2、Lep d 5、Lep d 7、Lep d 10、Lep d 13、Tyr p 2、Tyr p 13、Bos d 2、Bos d 3、Bos d 4、Bos d 5、Bos d 6、Bos d 7、Bos d 8、Can f 1、Can f 2、Can f 3、Can f 4、Equ c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4、Equ c 5、Fel d 1、Fel d 2、Fel d 3、Fel d 4、Fel d 5w、Fel d 6w、Fel d 7w、Cav p 1、Cav p 2、Mus m 1、Rat n 1、Alt a 1、Alt a 3、Alt a 4、Alt a 5、Alt a 6、Alt a 7、Alt a 8、Alt a 10、Alt a 12、Alt a 13、Cla h 2、Cla h 5、Cla h 6、Cla h 7、Cla h 8、Cla h 9、Cla h 10、Cla h 12、Asp f 13、Asp f 1、Asp f 2、Asp f 3、Asp f 4、Asp f 5、Asp f 6、Asp f 7、Asp f 8、Asp f 9、Asp

10

20

30

40

50

f 10、 Asp f 11、 Asp f 12、 Asp f 13、 Asp f 15
 、 Asp f 16、 Asp f 17、 Asp f 18、 Asp f 22w、 As
 p f 23、 Asp f 27、 Asp f 28、 Asp f 29、 Asp n
 14、 Asp n 18、 Asp n 25、 Asp o 13、 Asp o 21、 P
 en b 13、 Pen b 26、 Pen ch 13、 Pen ch 18、 Pen
 ch 20、 Pen c 3、 Pen c 13、 Pen c 19、 Pen c 2
 2w、 Pen c 24、 Pen o 18、 Fus c 1、 Fus c 2、 Tri
 r 2、 Tri r 4、 Tri t 1、 Tri t 4、 Cand a 1、 Ca
 nd a 3、 Cand b 2、 Psi c 1、 Psi c 2、 Cop c 1、
 Cop c 2、 Cop c 3、 Cop c 5、 Cop c 7、 Rho m 1、 10
 Rho m 2、 Mala f 2、 Mala f 3、 Mala f 4、 Mala
 s 1、 Mala s 5、 Mala s 6、 Mala s 7、 Mala s 8、
 Mala s 9、 Mala s 10、 Mala s 11、 Mala s 12、 M
 ala s 13、 Epi p 1、 Aed a 1、 Aed a 2、 Api m 1
 、 Api m 2、 Api m 4、 Api m 6、 Api m 7、 Bom p 1
 、 Bom p 4、 Bla g 1、 Bla g 2、 Bla g 4、 Bla g 5
 、 Bla g 6、 Bla g 7、 Bla g 8、 Per a 1、 Per a 3
 、 Per a 6、 Per a 7、 Chi k 10、 Chi t 1-9、 Chi
 t 1.01、 Chi t 1.02、 Chi t 2.0101、 Chi t 2.0
 102、 Chi t 3、 Chi t 4、 Chi t 5、 Chi t 6.01、 C 20
 hi t 6.02、 Chi t 7、 Chi t 8、 Chi t 9、 Cte f
 1、 Cte f 2、 Cte f 3、 Tha p 1、 Lep s 1、 Dol m
 1、 Dol m 2、 Dol m 5、 Dol a 5、 Pol a 1、 Pol a
 2、 Pol a 5、 Pol d 1、 Pol d 4、 Pol d 5、 Pol e
 1、 Pol e 5、 Pol f 5、 Pol g 5、 Pol m 5、 Vesp c
 1、 Vesp c 5、 Vesp m 1、 Vesp m 5、 Ves f 5、 Ve
 s g 5、 Ves m 1、 Ves m 2、 Ves m 5、 Ves p 5、 Ve
 s s 5、 Ves vi 5、 Ves v 1、 Ves v 2、 Ves v 5、 M
 yr p 1、 Myr p 2、 Sol g 2、 Sol g 4、 Sol i 2、 S
 ol i 3、 Sol i 4、 Sol s 2、 Tria p 1、 Gad c 1、 30
 Sal s 1、 Bos d 4、 Bos d 5、 Bos d 6、 Bos d 7、
 Bos d 8、 Gal d 1、 Gal d 2、 Gal d 3、 Gal d 4、
 Gal d 5、 Met e 1、 Pen a 1、 Pen i 1、 Pen m 1、
 Pen m 2、 Tod p 1、 Hel as 1、 Hal m 1、 Ran e 1
 、 Ran e 2、 Bra j 1、 Bra n 1、 Bra o 3、 Bra r 1
 、 Bra r 2、 Hor v 15、 Hor v 16、 Hor v 17、 Hor
 v 21、 Sec c 20、 Tri a 18、 Tri a 19、 Tri a 25
 、 Tri a 26、 Zea m 14、 Zea m 25、 Ory s 1、 Api
 g 1、 Api g 4、 Api g 5、 Dau c 1、 Dau c 4、 Cor
 a 1.04、 Cor a 2、 Cor a 8、 Fra a 3、 Fra a 4、 M 40
 al d 1、 Mal d 2、 Mal d 3、 Mal d 4、 Pyr c 1、 P
 yr c 4、 Pyr c 5、 Pers a 1、 Pru ar 1、 Pru ar
 3、 Pru av 1、 Pru av 2、 Pru av 3、 Pru av 4、 Pr
 u d 3、 Pru du 4、 Pru p 3、 Pru p 4、 Aspa o 1、
 Cro s 1、 Cro s 2、 Lac s 1、 Vit v 1、 Mus xp 1
 、 Ana c 1、 Ana c 2、 Cit l 3、 Cit s 1、 Cit s 2
 、 Cit s 3、 Lit c 1、 Sin a 1、 Gly m 1、 Gly m 2
 、 Gly m 3、 Gly m 4、 Vig r 1、 Ara h 1、 Ara h 2
 、 Ara h 3、 Ara h 4、 Ara h 5、 Ara h 6、 Ara h 7
 、 Ara h 8、 Len c 1、 Len c 2、 Pis s 1、 Pis s 2 50

、 Act c 1、 Act c 2、 Cap a 1w、 Cap a 2、 Lyc e 1、 Lyc e 2、 Lyc e 3、 Sola t 1、 Sola t 2、 Sola t 3、 Sola t 4、 Ber e 1、 Ber e 2、 Jug n 1、 Jug n 2、 Jug r 1、 Jug r 2、 Jug r 3、 Ana o 1、 Ana o 2、 Ana o 3、 Ric c 1、 Ses i 1、 Ses i 2、 Ses i 3、 Ses i 4、 Ses i 5、 Ses i 6、 Cuc m 1、 Cuc m 2、 Cuc m 3、 Ziz m 1、 Ani s 1、 Ani s 2、 Ani s 3、 Ani s 4、 Arg r、 Asc s 1、 Car p 1、 Den n 1、 Hev b 1、 Hev b 2、 Hev b 3、 Hev b 4、 Hev b 5、 Hev b 6 . 01、 Hev b 6 . 02、 Hev b 6 . 03、 Hev b 7 . 01、 Hev b 7 . 02、 Hev b 8、 Hev b 9、 Hev b 10、 Hev b 11、 Hev b 12、 Hev b 13、 Hom s 1、 Hom s 2、 Hom s 3、 Hom s 4、 Hom s 5および Trip s 1からなる群から選択されることが好ましい。

10

【0029】

上記アレルゲンから得られる他のアレルゲンまたはペプチドに対して、ブタクサ花粉アレルゲン Amb a 1から得られる本発明のペプチドを、融合および/または接合することが特に好ましい。そのような融合タンパク質/融合ポリペプチド/融合ペプチドまたはタンパク質接合物/ポリペプチド接合物/ペプチド接合物は、ワクチンまたは診断に使用する場合に有用である。

20

【0030】

本発明の他の局面は、本発明に係るペプチドまたは分子をコードする核酸分子に関する。

【0031】

本発明の核酸分子は、例えば、当該核酸分子によってコードされるペプチド/ポリペプチド/タンパク質の組み換え生成に使用され得る。さらに、それらはまた、治療的局面（例えば、遺伝子療法、細胞療法）に使用され得る。

【0032】

本発明の他の局面は、本発明に係る核酸分子を備えるベクターに関する。

【0033】

本発明の核酸分子は、ベクターに導入され得る。ベクターは、本発明のペプチドもしくは分子の組み換え生成、または治療的局面に使用され得る。

30

【0034】

本明細書において使用されるときに、“ベクター”は、プラスミド、コスミドならびにウイルスDNAおよびファージDNAを指す。本発明に係る核酸分子を備えるプラスミドは、当該核酸分子と隣り合って、例えば、複製開始点、選択マーカ（例えば、抗生物質耐性マーカ、栄養要求マーカ）、マルチクローニングサイト、当該核酸分子と作動可能に連結されたプロモータ領域および/または宿主のゲノムにベクターもしくはこれらの一部を相同組み込みする配列伸張鎖を含み得る。

【0035】

本発明のベクターは、上記核酸分子と作動可能に連結されたプロモータをさらに備えて、したがって発現カセットを生じることが好ましい。

40

【0036】

本発明の発現カセットは、プロモータおよび本発明のペプチドをコードする核酸分子を備える。プロモータは、本発明の核酸分子の5'末端（上流）に配置されていることが好ましい。発現カセットに使用されるプロモータは、当該プロモータがそれぞれの宿主によって制御され得るものであれば、あらゆるプロモータであり得る。

【0037】

本発明のさらなる局面は、本発明に係る少なくとも1つの分子および/または少なくとも1つのペプチドを備えるワクチン調合物に関する。

50

【0038】

配列番号1～139からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、かつブタクサ花粉アレルゲンAmb a 1から得られる少なくとも1つのペプチドを備える、本発明のペプチドおよび/または分子は、ワクチン調合物に使用され得る。これらのペプチドが、ブタクサ花粉アレルゲンAmb a 1に対するT細胞応答を誘発可能であるので、ワクチン調合物は、ブタクサ花粉アレルギーおよびブタクサ花粉アレルゲンと交差反応するアレルギー（例えば、ヨモギ花粉）の脱感作、予防または処置に使用され得る。IgE結合活性の欠如に起因して、アレルギー性反応が上記ワクチンによって誘発されないか、または実質的に誘発されないので、ペプチドはワクチンに使用する場合に特に有利である。本発明のワクチン調合物は、少なくとも1つの、好ましくは少なくとも2つの、より好ましくは少なくとも3つの本発明のペプチドを備え得る。

10

【0039】

脱感作されるべき個体に対する本発明の治療的組成物の投与は、アレルゲンに対する個体の感受性を低下させる（すなわち、アレルギー反応を低下させる）ために有効な用量および期間において、公知の手法を用いて実施され得る。治療的組成物の有効量は、Amb a 1に対する個体の感受性の程度、年齢、性別および個体の体重、ならびにタンパク質またはこれらの断片による個体における抗原反応の誘発能といった要因にしたがって変わる。活性な化合物（すなわち、タンパク質またはこれらの断片）は、好都合な方法において投与される。当該方法は、例えば、注入（皮下、静脈内など）、経口投与、吸入、経皮適用、または直腸投与である。投与経路に依存して、活性な化合物は、酵素、酸、当該化合物を不活化し得る他の天然の条件（後述を参照すればよい）の作用から当該化合物を保護する物質に被覆され得る。例えば、単回投与ごとに、好ましくは約0.05 μg～1000 μg、より好ましくは約0.1 μg～1000 μgの活性な化合物（すなわち、タンパク質またはこれらの断片）が、注入によって投与され得る。投与計画は、最適な治療反応を提供するために調節され得る。例えば、治療状況の緊急性によって示されるように、種々の分割量が毎日投与され得るか、または単回の投与量が減らされ得る。

20

【0040】

もちろん、本発明に係るペプチドまたは分子に対して結合された抗体を提供することも可能であり、かつ当該抗体は本発明の範囲内にある。また、当該抗体は、ワクチン調合物において使用され得る。

30

【0041】

本発明に係る抗体としては、これらに限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片および上述のあらゆる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分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）であると見做される。本発明の免疫グロブリン分子は、IgG型、IgM型、IgD型、IgA型およびIgY型、免疫グロブリン分子のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスに属することが好ましい。

40

【0042】

ポリクローナル抗体は、好ましくは補佐剤を用いて、ヒト以外の哺乳類に対して本発明のポリペプチドを投与すること、およびこれによって生じた血清を回収することによって調製され得る。長期間にわたって繰り返し注入することによって、高い力価を得ることができる。抗原の誘導に使用され得る哺乳類の種に特に限定はないが、ウサギまたはテングネズミを使用することが一般的に好ましいが、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。抗原の生成において、本発明の免疫原の一定量が、例えば、好適な濃度にまで生理食塩水溶液を用いて希釈され、かつこれによって生じた希釈溶液が、例えば懸濁液を調製するための完全フロインドアジュバント、またはミネラルゲルとともに混合される。ミネラルゲルは、例えば、水酸化アルミニウム、界面活性剤（例えば、リソレクチン、プルロニックポリオール(pluronic poly

50

o 1))、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、および見込みのある有用なヒト免疫賦活剤（例えば、BCG（ウシ型弱毒結核菌）およびコリネバクテリウム パルヴム）である。懸濁液および混合物は、単回投与ごとに約50 μg ~ 約2500 μgの本発明のポリペプチドを用いて哺乳類（例えば、ウサギ）に対して、例えば腹腔内に投与される。懸濁液は、免疫をもたらすために、2 ~ 3ヶ月以下、好ましくは約1ヶ月の期間にわたって約2週間ごとに投与されることが好ましい。抗体は、最後の投与から1 ~ 2週間が経過した後に免疫した動物から血液を採取すること、血液を遠心分離することおよび血液から血清を単離することによって回収される。

【0043】

モノクローナル抗体は、例えば、ヒトまたはマウス起源のものであり得る。マウスモノクローナル抗体は、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の骨髄腫細胞株との超免疫化マウスの脾臓細胞の融合によって、調製され得る。

【0044】

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子（例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリンの定常領域を有する抗体）である。キメラ抗体の製造方法は、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。

【0045】

ヒト化抗体は、ヒト以外の種の相補性決定領域(CDRs)およびヒト免疫グロブリン分子のフレームワーク領域を有し、所望の抗原と結合するヒト以外の種の抗体から得られる抗体分子である。ヒトのフレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、抗原結合性を変更させるために、好ましくは向上させるために、CDRのドナー抗体から得られる対応する残基としばしば置換される。これらのフレームワーク置換は、当該分野において公知の方法によって確認される。当該公知の方法は、例えば、抗原結合性にとって重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較である（例えば、Queen et alの米国特許第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知られる種々の技術を用いてヒト化され得る。抗体のヒト化に使用される技術としては、CDRグラフィティング（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 91:969-913 (1994)）、およびチェーンシャッフリング（米国特許第5,565,332号明細書）が挙げられる。

【0046】

本発明に係る抗体は、アレルギー、特にイェダニアレルギーにかかっている個体の受動免疫化に有利に使用され得る。受動免疫に関して、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、この抗体はまた、個体の脱感作に使用され得る。

【0047】

本発明のワクチン調合物は、少なくとも1つの薬学的に受容可能な補佐剤、賦形剤および/または担体をさらに備える。

【0048】

10

20

30

40

50

好ましく使用される薬学的に受容可能な担体は、生理食塩水、縮物油、鉱油、カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液またはポリビニルピロリドン水溶液である。好適な補佐剤としては、これらに限定されないが、界面活性剤（例えば、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、リソレクチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびブルロニックポリオール）；ポリアミン（例えば、ピラン、硫酸デキストラン、ポリIC、カルボボル）；ペプチド（例えば、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシン）；油乳濁物；ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）など、および免疫刺激複合体が挙げられる。補佐剤は、例えば、植物油を含有する組成物もしくはミョウバン、イソマンニドモノオレエート（*isomannide monooleate*）、およびアルミニウムモノステアレートであり得る。他の好ましい補佐剤としては、生物適合性マトリクス材料の微粒子またはビーズが挙げられる。本発明の分子は、微粒子またはマイクロカプセルに組み込まれて、個体に対する抗原性物質のばくろを延長し得て、したがって長期にわたって個体を感染から保護し得る。また、免疫原は、リポソームに組み込まれ得るか、または多糖類および/またはワクチン調合物に使用する他の重合体と接合され得る。

10

【0049】

また、本発明の一部は、本発明の分子、特にペプチドおよび担体、好ましくは生物学的に受容可能な担体、より好ましくは薬学的に受容可能な担体を備える組成物である。典型的な担体は、水、緩衝化水溶液および水性のアルコール混合物などといった水性担体である。薬学的な使用、特にヒトにおける使用に向けた担体を備える組成物は、薬理的に受容可能な担体を備える。当該担体の例は当該技術において公知である。

20

【0050】

そのようなワクチンは、注射剤として、液体溶液剤または液体懸濁剤のいずれかとして調製される。また、ワクチンは、注射の前に液体が調製され得る、溶液または懸濁液に好適な個体の形態の注射剤として調製され得る。ワクチンは、生理学的に受容可能な希釈剤の存在下において、あらゆる都合の良い経路（例えば、皮下、腹腔内、筋肉内、皮内、静脈内、経口、鼻腔内、乳房内）によって標的の動物に投与され得る。抗原は、単回の用量または複数回の用量において投与され得る。本発明のワクチンは、冷蔵状態、凍結した形態、凍結乾燥した形態において保存され得る。ワクチンは、対照と比べて防御的な免疫応答を誘発するための有効量において、個体に投与され得る。有効量は、例えば、年齢および大きさとともに変わり、当業者によって容易に決定され得る。また、初回投与および追加抗原投与にとって好適な計画は、一定ではないが、初回投与の後に続く接種または他の投与によって代表され得る。

30

【0051】

本発明のワクチン調合物は、配列番号12、配列番号20、配列番号27、配列番号28、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号83、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138および配列番号139からなる群か

40

50

ら選択されるペプチドを備える少なくとも1つの分子を含有する。

【0052】

本発明の特に好ましい実施形態において、ワクチン調合物は、配列番号52、配列番号68、配列番号86、配列番号91、および配列番号126～配列番号139からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを備える。ここで、さらに好ましい調合物の実施形態は、配列番号52および配列番号137～139からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを備える。これらの分子は、ブタクサアレルギーにかかっている患者において高いT細胞反応性を示す（上記ペプチドは、ブタクサアレルギーに対して感作されたアレルギー性の、90%を超える個体によって認識される）。さらに、これらの分子/ペプチドは、単独に調合され得るか、またはあらゆる組み合わせにおいて単一の調合物に調合され得る。したがって、ワクチン調合物は、配列番号52、配列番号68、配列番号86、配列番号91、および配列番号126～配列番号139からなる群から選択される、好ましくは配列番号52および配列番号137～139からなる群から選択される少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つのペプチドを備える。ペプチドの特に好ましい組み合わせは、配列番号52および配列番号137；配列番号52および配列番号138；配列番号52および配列番号139；配列番号137および配列番号138；配列番号137および配列番号139；配列番号52、配列番号137および配列番号138；配列番号52、配列番号138および配列番号139；配列番号52、配列番号137および配列番号139；配列番号137、配列番号138および配列番号139；配列番号52、配列番号137、配列番号138および配列番号139である。

10

20

【0053】

本発明のさらに他の局面は、上記において概略を述べたようなワクチン調合物の製造に、本発明に係るペプチドおよび/または分子を使用することに関する。

【0054】

ワクチン調合物は、個体におけるブタクサ花粉アレルギー、特にAmb a 1によって引き起こされるアレルギーまたはブタクサ花粉アレルゲンと交差反応するアレルギーの予防または処置に使用される。

【0055】

本発明の他の局面は、ブタクサ花粉アレルゲン、特にAmb a 1に対する個体の感受性、または個体におけるブタクサアレルギーの診断に、本明細書に開示される分子を使用することに関する。

30

【0056】

また、本発明の分子、特に本発明のペプチドは診断目的に使用され得る。本発明の分子およびペプチドは、Amb a 1と交差反応するアレルギーまたはブタクサアレルギーの検出および診断に使用され得る。例えば、これらのアレルギーの検出および診断は、(1)血中の構成要素（例えば、抗体、T細胞、B細胞）を（複数の）ペプチドまたはタンパク質と結合させるために適切な条件において、Amb a 1の単離された1つもしくは複数のペプチドまたはAmb a 1の単離された鎖もしくは鎖と、ブタクサアレルギーに対する感受性を評価される個体から得られる血液または血液からの生成物を組み合わせること、ならびに(2)そのような結合を生じる程度を測定することによってなされ得る。本発明のペプチドが使用され得るアレルギー性疾患にとっての他の診断方法としては、放射性アレルゲン吸着試験(RAST)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、表斜免疫測定(RIA)、免疫放射定量測定法(IRMA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ヒスタミン放出アッセイおよびIgE免疫プロットが挙げられる。

40

【0057】

本発明のさらなる局面は、ブタクサ花粉アレルゲンに対する個体の感受性を診断する方法に関する。当該方法は、以下の工程：

マスト細胞もしくは好塩基球および/または抗体、特にIgE分類の抗体を含有する、個体のサンプルを準備する工程、

本発明に係る分子/ペプチドと当該サンプルを接触させる工程、

50

上記分子との接触によって上記マスト細胞もしくは好塩基球から放出されたヒスタミンの量を測定する工程、および/または上記サンプルにおけるブタクサ花粉アレルゲン特異的抗体の量を測定する工程、

放出されたヒスタミンの上記量および/または上記サンプル中のブタクサ花粉アレルゲン特異的抗体の上記量が、ブタクサ花粉アレルギーもしくはブタクサ花粉アレルギーと交差反応を示すアレルギーにかかっていない個体から得られたサンプルと比べて増加している場合に、ブタクサ花粉アレルゲン、特に Amb a 1 に対する個体の感受性を診断する工程を包含する。

【0058】

本発明に係る方法に使用されるサンプルは、血液サンプル、涙液サンプル、唾液サンプルまたは鼻汁サンプルであることが好ましい。

【0059】

本発明の更なる局面は、配列番号142または配列番号143のアミノ酸配列からなる Amb a 1 の単離された鎖、ならびに配列番号144または配列番号145のアミノ酸配列からなる Amb a 1 の単離された鎖に関する。ここで、配列番号142のアミノ酸配列は、PILRQASDGD TINVAGSSQI WIDHCSLSKS FDGLVDVTLG STHVTISNCK FTQQSKAILL GADDTHVQDK GMLATVAFNM FTDNVDQRMP RCRFGFFQVV NN NYDRWGTY AIGGSSAPTI LCQGNRFLAP DDQIKKNVL A RTGTGAAESM AWNWRSDKDL LENGAIFVTS GSDPV LTPVQ SAGMIPAEPG EAAIKLTSSA GVLSCRPGAP C である。また、配列番号143のアミノ酸配列は、VLPGGMIKSN DGPPIL RQAS DGDTINVAGS SQIWIDHCSL SKSFDGLVDV TL GSTHVTIS NCKFTQQSKA ILLGADDTHV QDKGMLATV A FNMFTDNVDQ RMPRCRFGFF QVVNNNYDRW GTYAI GGSSA PTILCQGNRF LAPDDQIKKN VLARTGTGAA E SMAWNWRSD KDLENGAIF VTS GSDPVLTPVQSAGMI PA EPGEAAIKLT SSAGVLS CRP GAPC である。また、配列番号144のアミノ酸配列は、AEGVGEILPS VNETRSLQAC EAYNII DKCW RGKADWENNR QALADCAQGF AKGTYGGKWG DV YTVTSNLD DDVANPKEGT LRF AAAQNRPLWIIIFKNDM V INLNQELVVN SDKTIDGRGV KVEIINGGLT LMNVK NIIIH NINIHDVKVL PGGMIKSN DG P である。また、配列番号145のアミノ酸配列は、AEGVGEILPS VNETRSLQAC EAYNII DKCW RGKADWENNR QALADCAQGF AKGTYGGKWG DV YTVTSNLD DDVANPKEGT LRF AAAQNRPLWIIIFKNDM V INLNQELVVN SDKTIDGRGV KVEIINGGLT LMNVK NIIIH NINIHDVK である。

【0060】

Amb a 1 は、2つの断片、鎖（配列番号142または配列番号143）および鎖（配列番号144）に実質的に分割され得る。意外にも両方の鎖が異なる免疫学的特性を示すことがわかった。Amb a 1 の鎖が低いIgE反応性を示す一方において、鎖が Amb a 1 のIgEエピトープのほとんどを含有している。

【0061】

本発明のさらに他の局面は、本発明に係る Amb a 1 . 3 の単離された鎖および Amb a 1 . 3 の単離された鎖を備える薬学的調製物に関する。

【0062】

本発明の他の局面は、個体におけるブタクサ花粉アレルギー、特に Amb a 1 によって引き起こされるアレルギーまたはブタクサ花粉アレルゲンと交差反応するアレルギー

10

20

30

40

50

を処置する薬剤の製造に、本発明に係る Amb a 1.3 の単離された鎖および Amb a 1.3 の単離された鎖を使用することに関する。

【0063】

本発明のさらなる局面は、個体におけるブタクサアレルギーもしくはブタクサ花粉アレルギーと交差反応するアレルギーの診断、またはブタクサ花粉アレルゲン、特に Amb a 1 に対する個体の感受性の診断に、本発明に係る Amb a 1.3 の単離された鎖および Amb a 1.3 の単離された鎖を使用することに関する。

【0064】

本発明は、以下の図面および実施例によって例示されるが、これらに限定れるものではない。

【0065】

図1は、8Mの尿素におけるニッケルキレートクロマトグラフィー(NCC)を用いた r Amb a 1.3 の精製を示す。サンプルは、SDS-PAGE/クーマシー染色を用いて分析された。精製画分は大きな凝集を示した。

【0066】

図2は、組み換え Amb a 1.3 の IgE ドットプロット分析を示す。大腸菌において生成された r Amb a 1.3 は、上述のように精製され、かつニトロセルロース膜上にドット化された。17人のブタクサ花粉アレルギー患者から得られた血清(1~17)は、試験され、かつ r Amb a 1.3 との非常に弱い IgE 反応性を示したか、もしくは IgE 反応性を示さなかった。同じ患者らは、n Amb a 1 との強い IgE 反応性を示した。

【0067】

図3は、精製された天然の Amb a 1 または Amb a 1.3 を用いて、異なる濃度において刺激した TCL を示す。最適濃度の値が示されている。N = 13 ; ピアスン相関係数 : 0.979 ** (p < 0.01) またはスピアマンの : 0.912 **。

【0068】

図4は、TCL 増殖アッセイにおけるアレルゲン力価測定(天然アレルゲンと対比した複数の組み換えアレルゲン(r Amb a 1.3 の異なるロット、ロット L1~L4))の例を示す。STA および OPO は、2人の異なるブタクサアレルギー患者のそれぞれから得られた TCL である。

【0069】

図5は、ブタクサ抽出物および r Amb a 1.3 によって TCL において誘導される類似のサイトカイン産生を示す。

【0070】

図6は、天然の Amb a 1 および r Amb a 1.3 によって TCL および TCC において誘導される同等のサイトカイン産生を示す。

【0071】

図7は、天然の Amb a 1 または r Amb a 1.3 を用いて誘導された TCL が類似の T 細胞エピトープを認識することを示す。

【0072】

図8は、Amb a 1.3 の関連する T 細胞活性化領域を示す。それぞれのエピトープを認識する患者の百分率が、3を超える刺激指標(SI > 3) および 5を超える刺激指標(SI > 5)のそれぞれについて個別に分析された。

【0073】

図9は、精製 n Amb a 1 の IgE 免疫プロットを示す。n Amb a 1 が、SDS-PAGE によって分析され、かつ PVDF 膜上に電気プロットされた。膜片は、ブタクサ花粉アレルギー患者から得られた血清を用いて(レーン 1~29)か、または非アレルギーの提供者から得られた血清を用いて(レーン C) インキュベートされた。結合した IgE は、¹²⁵I - 標識化ヤギ抗ヒト IgE を用いて検出された。ブタクサ花粉感作患者は、オーストリア(レーン 1~13) またはイタリア(レーン 14~29)において募

10

20

30

40

50

られた。

【0074】

図10は、SDS-PAGEおよびPVDF膜上への電気プロットの後における、精製された天然のAmb a 1のクーマシー染色を示す。プロセッシングを受けていないnAmb a 1、鎖および鎖に対応するバンドは、N末端配列を得るためにエドマン分解にかけられた。

【0075】

図11は、プロセッシングを受けていない天然のAmb a 1 (nAmb a 1、図10を参照すればよい)のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

10

【0076】

図12は、天然のAmb a 1 (nAmb a 1、図10を参照すればよい)の鎖のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

【0077】

図13は、天然のAmb a 1 (nAmb a 1、図10を参照すればよい)の鎖のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

【0078】

図14は、Amb a 1アイソフォームならびにそれらの鎖および鎖の推定されるアミノ酸配列を示す。アイソフォームのAmb a 1.1、Amb a 1.2、Amb a 1.3、Amb a 1.4およびAmb a 2が、公開され (Rafnar et al., J. Biol. Chem. 266: 1229-1236, 1991) かつ特許された (米国特許第5,776,761号)。R2クローンが、抗Amb a 1の親和性精製ウサギ抗体を用いたブタクサ花粉cDNAの花粉の免疫スクリーニングによって、研究室において単離された。そして、R2クローンは、タンパク質レベルにおいてAmb a 1.3と同一である。下線が付された文字は、演算手順SignalP (HYPERLINK "http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/"http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) を用いて予測されたシグナルペプチドを表す。斜字体において表されているのは、N末端配列決定および天然のAmb a 1の質量分析に基づく推定の鎖の配列である。斜字体および下線付きの文字は、N末端配列決定および天然のAmb a 1の質量分析に基づく推定の鎖の配列である (図10~13; 表4)。N末端配列分析によって、太字の配列が精製された天然のAmb a 1調製においてタンパク質分解的に除かれた。

20

30

【0079】

図15は、Amb a 1アイソフォームの配列整合を示す。Amb a 1.1、Amb a 1.2、Amb a 1.3およびAmb a 2のそれぞれがクローン化され、配列決定され、かつ公開された (Rafnar et al., J. Biol. Chem. 266: 1229-1236, 1991)。配列整合は、ソフトウェアClustaw (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustaw.html) を用いて生成された。図14に示される推定される完全なアミノ酸配列は、整合に使用された。

40

【0080】

図16は、Amb a 1.3 (R2クローン) の推定されるアミノ酸配列を示す。(a) N末端配列決定および精製された天然のAmb a 1の質量分析 (図1~13; 表4を参照すればよい) からの情報に基づく推定の鎖および鎖。(b) Amb a 1.3の組み換えの鎖および鎖を生成するために研究所において作製された第1のコンストラクト。(c) 2つの鎖の発現は、全長のAmb a 1.3よりも良好であったが、得られた収量は低かった。さらに、鎖からT細胞反応性のドメイン (四角の囲み、178~189位のアミノ酸) を排除した。178~189位のアミノ酸と対応するT細胞エピトープを鎖に含めるために設計された、Amb a 1.3の改変した鎖および鎖 (バージョン1)。(d) 178~189位のアミノ酸と対応するT細胞エピトープ

50

を鎖に含めるために、かつ天然の Amb a 1 においてタンパク質分解的に除去されることが示されている N 末端における最初の 20 アミノ酸を鎖において排除するために設計された、Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖 (バージョン 2)。

【0081】

図 17 は、大腸菌株 BL21 および Rosetta-gami B (DE3) pLysS における、Amb a 1 の改変した鎖および鎖 (バージョン 1) の発現を示す。

【0082】

図 18 は、ニッケルカラム上における親和性精製後における、Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖 (バージョン 1) の SDS-PAGE およびクーマシー染色を示す。鎖および鎖は、大腸菌株 Rosetta-gami B (DE3) pLysS (Novagen) を用いて高収率に得られた。精製された 2 つの鎖は、可溶性であり、かつ全長の Amb a 1.3 アレルゲンにともなう大きな問題であった凝集するあらゆる傾向を示さなかった。

10

【0083】

図 19 は、天然の Amb a 1 ならびに Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖 (バージョン 1) のヒト IgE を用いた ELISA を示す。

【0084】

図 20 は、Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖 (バージョン 1) を用いた Amb a 1 特異的 TCL の増殖を示す。天然の Amb a 1、異なる濃度の全長 rAmb a 1.3、鎖および鎖が、刺激剤として使用された。TCL は、rAmb a 1.3 (Amb) を用いて惹起された。

20

【0085】

図 21 は、全長の rAmb a 1.3、Amb a 1 の改変した鎖および鎖 (バージョン 1) を用いた、2 つの Amb a 1 特異的 TCL の増殖応答を示す。TCL は、rAmb a 1.3 (Amb) またはブタクサ花粉抽出物 (RW) を用いて惹起された。

【0086】

図 22 は、Amb a 1.3 における同定された関連する T 細胞活性化領域を示す。17/26 のエピトープは、Amb a 1 の C 末端領域に配置されている。したがって、上記鎖および鎖は、これらの関連する T 細胞エピトープを含むように設計された。

30

【0087】

〔実施例〕

(実施例 1: Amb a 1 をコードする cDNA の単離)

実施例 1.1: ウサギ抗 Amb a 1 抗体の親和性精製

天然の Amb a 1 を用いて免疫したウサギからの血清は、当該技術において公知の通常の方法によって取得され得る。ブタクサ花粉 cDNA ライブラリのスクリーニングのために、Amb a 1 特異的抗体は、親和性クロマトグラフィーによって精製された。ブタクサ花粉から精製された 5 mg の天然の Amb a 1 は、CNBr 活性化セファロース (GE Healthcare Life Science) に対して結合させられた。ウサギ血清の結合後に、樹脂が洗浄され、かつ非常に特異性の高い Amb a 1 特異的抗体が、0.2 M のグリシン pH 2.8 を用いて溶出された。抗体は、直ちに中和され、かつ pH 7.4 の 1 × PBS (8 g の NaCl、0.2 g の KCl、1.44 g の Na₂HPO₄、0.24 g の KH₂PO₄、HCl を用いて pH 7.4 に調節) に対して透析された。それから、精製された抗体は、免疫プロットングおよびライブラリスクリーニング実験に使用された。

40

【0088】

実施例 1.2: ブタクサ花粉 cDNA ライブラリの構築および免疫スクリーニング

ブタクサ花粉 cDNA ライブラリは、ZAP II ベクター (Stratagene) において構築された。精製されたウサギ抗 Amb a 1 抗体は、ブタクサ花粉 cD

50

NAライブラリの400,000のプラーク(plaque)をスクリーニングするために使用された。4つの陽性Amba 1クローンが単離され、かつUni-ZAP XRベクターからのpBluescriptファージミドのインビボにおける切り出しに使用された。R1、R2、R3およびR4と名付けられたクローンは、DNA配列決定に関して選抜された。DNA配列決定は、フランキングプライマーT7およびT3を含む4つおよび5つのプライマーを用いた“プライマーウォーキング”技術によって実施された。R1およびR4のそれぞれは、5'末端において短く切断され、したがって本実験においてさらには使用されなかった。R2およびR3の両方の鎖は2回配列決定された。

【0089】

実施例1.3：発現ベクターpHis-parallel-2へのクローニング

R2(Amba 1.3)cDNAは、発現ベクターpHis-parallel-2に連結された。クローニング手順に関して、2つの隣接するクローニングプライマーが構築された。完全なcDNA配列は、推定されるシグナルペプチドをコードする75ヌクレオチドだけ5'末端において切断された。以下のプライマー：Rag-Nco-forward：5'-GAGAGAGACCATGGCCGAAGGGGTCGG-AGAAATCTTACCTTCAG-3'(配列番号140)およびRag-Xho-reverse：5'-GAGAGAGACTCGAGTTAGCAAGGTGCTCCAGGACGGCATGAG-3'(配列番号141)が使用された。Nco IおよびXho Iの制限酵素部位が、5'末端および3'末端に導入された。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の産物は、制限酵素のNco IおよびXho I(New England Biolabs)を用いて消化され、かつベクターpHis-parallel-2のそれぞれの部位に対して連結された。生じたpHis-parallel-2/R2コンストラクトは、Dye Terminator Cycle配列決定の手順(Applied Biosystems)にしたがって配列決定された。

【0090】

実施例1.4：大腸菌における組み換え R2(Amba 1)の発現

組み換えタンパク質発現は、コンストラクトpHis-parallel-2/R2を受容れている形質転換受容性の大腸菌株BL21 DE3(Stratagene)を用いて実施された。形質転換体は、100mg/Lのアンピシリンを含有するLBプレート上において選択され、単一の形質転換体コロニーが拾い上げられた。いくつかの小規模発現実験が実施され、かつ大規模タンパク質生成を試みる前に最適化された。培養培地(10g/Lのペプトン、5g/Lの酵母抽出物、10g/Lのグリセロール、5g/LのNaCl、2.5g/Lの(NH₄)₂SO₄、0.5g/LのMgSO₄·7H₂Oおよび1.5g/LのNa₂HPO₄·2H₂O、pH7.4に調節された)は、3%のオーバーナイト培養の条件において接種され、150μg/mLのペニシリン(Biochemie)を有する培養培地において増殖させられた。醗酵は、10LのBioflow 3000 Fermenter(New Brunswick Scientific Co.)、37、7%の飽和率の200~400rpmの攪拌、および1.0のOD₆₀₀における0.4mMのIPTGを用いた誘導の条件において実施された。細菌細胞(10Lの培養液から60~80gの湿重量の細胞)が、誘導から3時間後に遠心分離によって回収され、かつ100mLのTris塩基、1mMのEDTA、0.1%のTriton X-100(pH未調節、100mL/1gの細胞)に懸濁された。新たに溶解されたライソザイム(100μg/1gの細胞)の添加および1時間にわたる室温におけるインキュベーションの後に、細胞は3回の凍結融解サイクルによって溶解された。可溶画分の分離が遠心分離によってなされ、かつ未処理の封入体が、1%のTriton X-100、20mMのTris-HCl pH8.0、1mMのEDTAを用いて2~3回洗浄され、その後50%のエタノール、20mMのTris-HCl pH8.0を用いて2回洗浄された。精製された封入体は、500mLの8Mの尿素、0.5MのNaCl、20mMのTris-HCl pH8.0に溶解された。

【0091】

実施例 1.5 : 組み換え R2 (Amb a 1.3) アレルゲンの精製

溶液は、製造者の手引書にしたがって NiCl_2 を用いて帯電させた後に、直前の工程において説明された緩衝液を用いてあらかじめ平衡化した 150 mL の Chelating Cellufine Column (Millipore) 上に乗せられた。クロマトグラフィーのすべての段階は、Biopilot FPLC system (GE Healthcare Life Science) において実施された。結合したタンパク質は、0 ~ 300 mM の範囲のイミダゾール直線勾配を用いて溶出された。画分の精製は、従来の SDS-PAGE によって分析された。ほぼ純粋な Amb a 1.3 を含有する画分は、2 mM の EDTA を用いて安定化され、続いて Vivaflow 50 ultrafiltration (Vivascience) におけるゲルろ過段階によって、50 mL の容積まで濃縮されて調製された。ゲルろ過は、Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Science) カラム上において、8 M の尿素、0.5 M の NaCl、20 mM の Tris-HCl pH 8.0、2 mM の EDTA において実施された。純粋な Amb a 1 画分は、限外ろ過によって約 3 mg/mL のタンパク質濃度にまでふたたび濃縮された。凍結乾燥の前にリフォールディング手順が実施された。リフォールディング手順において、ジスルフィド結合が、10 mM のメルカプトエタノールの添加によって還元され、続いて 1000 ~ 2000 倍の容積を有する 5 mM の NH_4HCO_3 に対する 4 における透析の間にふたたび酸化された。

10

【0092】

20

実施例 1.6 : 精製組み換え Amb a 1 の SDS-PAGE 分析および免疫プロット分析

タンパク質は、15% のアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE、および分子量基準 RPN 756 (GE Healthcare Life Science) を用いたクーマシー染色分析された。アレルギー患者から得られた血清は、陽性の IgE 反応性に関して試験された。rAmb a 1 および rArt v 6 は、15% (重量/重量) のポリアクリルアミドゲルにおいて分離され、かつ PVDF 膜上に電気プロットングされた。ブロッキング緩衝液 (それぞれ 1 L に対して、7.5 g の NaH_2PO_4 、5 g の BSA および 5 mL の Tween 20) を用いて非特異的タンパク質結合部位をブロッキングした後に、膜は、室温において 6 時間以上にわたって患者の血清 (ブロッキング緩衝液に 1 : 10 において希釈された) とともにインキュベートされた。膜は、少なくとも 30 分間にわたってブロッキング緩衝液を用いて洗浄された後に、ブロッキング緩衝液に希釈された (1 : 40) 放射線標識 [^{125}I] 抗ヒト IgE (RAST, 5 Ci, MedPro) とともに、オーバーナイトで室温においてインキュベートされた。第 2 の 30 分間の洗浄の後に、膜は画像化プレート上に配置された。スクリーンは、少なくとも 24 時間にわたって露光され、かつ検出用の PhotoImager Bas 1800 I I スキャナーおよび機器の指示ソフトウェア (Fujifilm) を用いて現像された。

30

【0093】

実施例 1.7 : Amb a 1 アイソフォームをコードする cDNA クローン

ブタクサ花粉ライブラリから単離された R2 クローンおよび R3 クローンは、完全であり、かつ Amb a 1 アイソフォームにコードされた。推測された R3 のアミノ酸配列は、成熟 Amb a 1.1 アイソフォームと 1 つのアミノ酸において異なっていた。成熟 Amb a 1.1 の 50 位におけるグリシンが、R3 においてアラニンに交換されている。推測された R2 のアミノ酸配列は、Amb a 1.3 アイソフォームと同一である。R2 クローンは、ここに記載されているすべての実験に使用された。以下において R2 クローンを Amb a 1.3 と呼ぶ。

40

【0094】

実施例 1.8 : Amb a 1.3 の組み換え生成および IgE 結合活性

IgE 結合活性に関して、大腸菌において全長の rAmb a 1.3 を生成する最初の試みは、希望を与えるものではなかった。何よりも、タンパク質分解性の切断が、大腸

50

菌において生成された r A m b a 1 . 3 の精製の間に生じた。r A m b a 1 . 3 の収量は、10 L の発酵培養液から約 15 mg の r A m b a 1 . 3 であった。r A m b a 1 . 3 は、まったく封入体のみに見られ、したがってリフォールディング手順の使用が必要であった。しかし、全長の r A m b a 1 . 3 の正確なリフォールディングは、困難であることが分かった。リフォールディングに関する異なる標準的な手法を用いた後に、最良の調製物は、ほとんどが不溶性の凝集体を構成した（図 1 を参照すればよい）。

【 0 0 9 5 】

精製手順の種々の変更および異なる安定化剤の種々の添加は、正しくフォールディングされた可溶性のタンパク質を生じなかった。非変性アッセイ（例えば、ドットプロット、E L I S A ）において、r A m b a 1 . 3 は、ヒト I g E と結合できなかった（図 2）。還元および熱処理（S D S - P A G E / 免疫ブロッティングにとっての標準的な手法）の後にのみ、r A m b a 1 . 3 は、患者の I g E と反応した。これらの結果は、上述のように生成された r A m b a 1 . 3 が、アレルギーの診断および治療に好適な試薬ではないことを明らかに証明した。したがって、完全な I g E 結合活性を有する組み換え試薬を生成する他の方法が、実施例 4 に記載の通りに実施された。その低い I g E 結合活性にもかかわらず、r A m b a 1 . 3 は、T 細胞エピトープマッピングおよび増殖アッセイに首尾よく使用されたので、正しいフォールディングは、T 細胞の認識に必須ではない。

【 0 0 9 6 】

（実施例 2 : A m b a 1 の T 細胞認識）

実施例 2 . 1 : 患者

A m b a 1 に対する T 細胞応答は、確立されたインビトロにおける培養系（Jahn-Schmid et al., J. Immunol. 169: 6005-11, 2002; Jahn-Schmid et al., J. Allergy Clin. Immunol., 115: 399-404, 2005）を用いて、詳細に性質決定された。典型的な病歴、陽性の皮膚プリック試験およびブタクサ抽出物に関する C A P / R A S T 試験を有する、臨床的に十分に規定される合計 85 人の患者（ウィーンから 75 人およびミラノから 10 人）が含まれた。

【 0 0 9 7 】

実施例 2 . 2 P B M C、A m b a 1 特異的 T 細胞株（T C L）および T 細胞クローン（T C C）

末梢血単核球（P B M C）が、フィコール密度勾配遠心分離によって、アレルギー患者の末梢血から単離された。アレルゲン特異的な T 細胞株（T C L）および T 細胞クローン（T C C）を生成するために、 1.5×10^6 の P B M C が、24 ウェルの平底培養プレート（コスター、U S A）において、最適濃度（ $4 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）のブタクサ抽出物またはヨモギ抽出物、または r A m b a 1 . 3（ $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を用いて刺激された。5 日後にヒト r I L - 2（ $10 \text{U} / \text{ml}$ 、ポーリンガー、マンハイム、ドイツ）が加えられ、かつ培養は、さらに 7 日間にわたって続けられた。それから、T 細胞芽球が密度遠心分離によって単離された。T 細胞芽球のほとんどは、I L - 2 および放射線照射を受けた P B M C を用いて増やされた。少数の T 細胞芽球は、限界希釈によって単クローン性の T 細胞株を確立するために使用された。放射線照射を受けた（ 60Gy ） 2×10^5 の P B M C、0.25%（容積 / 容積）の P H A（G i b c o、U S A）および r I L - 2（ $4 \text{U} / \text{ml}$ ）の存在下における上述の培地を入れた、96 ウェルの丸底プレート（N u n c l o n e）に、0.3 の T 細胞 / ウェルが播かれた。14 ~ 21 日後に、成長している微量培養物は、わずかな間隔を置いて、r I L - 2 および放射線照射を受けた P B M C を用いて増やされた。T C C の特異性は、放射線照射を受けた異質遺伝子型 P B M C、H L A 適合 P B M C または放射線照射を受けた E B V 癌化の異質遺伝子型 B 細胞、ならびに $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の A m b a 1 . 3 を用いた、増殖アッセイにおいて評価された。48 時間後に、トリチウムを含む（ ^3H ）-チミジンの細胞への取り込みが、1 分ごとのカウント（c p m）における増殖の測定に利用された。刺激指標（S I ; T C C + 自己の A P C + 抗原

を含有する培養において得られた c p m と、T C C および A P C 単独を含有する培養において得られた c p m との間の比率) が > 1 0 であった場合に、応答は陽性と見做された。アレルギー特異的 T C C は、放射線照射を受けた自己の A P C およびアレルギー、または異質遺伝子型の支持細胞および r I L - 2 を用いた刺激の交互の転換によって増やされた。自己反応性に起因して異なる程度のバックグラウンド増殖を示した P B M C および T C L に関して、> 3 の S I またはそれぞれ 1 0 , 0 0 0 d p m は、抗原特異性に関するカットオフ値 (c u t - o f f) と見做された。

【 0 0 9 8 】

A m b a 1 特異的な T C L および T C C は、A m b a 1 . 3 の T 細胞エピトープを同定するために使用された。T 細胞株は、A m b a 1 . 3 の C 末端ペプチドを代表する 1 2 1 の合成ペプチド (1 2 0 の 1 2 m e r ペプチドおよび 1 つの 1 3 m e r のペプチド) の一群 (P e p s e t , B i o t r e n d , ドイツ) を用いて刺激された。ペプチドは、A m b a 1 . 3 のアミノ酸配列にしたがって合成されており、かつ隣りあうペプチドと 9 アミノ酸残基だけ重複している (表 1) 。ペプチドは、刺激のために 5 μ g / m l の濃度において使用され、かつ T 細胞株の増殖は、4 8 時間後の 3 H - チミジンの取り込みによって測定された。T C L における自己反応性によって引き起こされるしばしば観察された高いバックグラウンドのために、少なくとも 1 0 の刺激ペプチドを用いて (ペプチドは無毒である) 観察された c p m の平均が、S I の算出における陰性対照として使用された。本明細書を通して、刺激指標が少なくとも 3 . 0 であった場合に、ペプチドが 1 つの T 細胞エピトープを備えていた。また、S I 5 . 0 を有する強い刺激ペプチドは、表 2 および 3 に示されている。

【 0 0 9 9 】

10

20

【表1】

表1.Amb a 1.3のT細胞エピトープマッピングに使用された合成ペプチド。成熟(シグナルペプチドなし)のAmb a 1.3の推定アミノ酸配列が、120個の12mer+1(13mer)のペプチド(Amb a 1.3のC末端に対応する)を設計するための鋳型として使用された。

アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列	アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列
25-36	1	SAEGVGEILPSV	205-216	61	QIWIDHCSLSKS
28-39	2	GVGEILPSVNET	208-219	62	IDHCSLSKSF DG
31-42	3	EILPSVNETRSL	211-222	63	CSLSKSF DGLVD
34-45	4	PSVNETRSLQAC	214-225	64	SKSF DGLVDVTL
37-48	5	NETRSLQACEAY	217-228	65	FDGLVDVTLGST
40-51	6	RSLQACEAYNII	220-231	66	LVDVTLGSTHVT
43-54	7	QACEAYNIIDKC	223-234	67	VTLGSTHVTISN
46-57	8	EAYNIIDKCWRG	226-237	68	GSTHVTISNCKF
49-60	9	NIIDKCWRGKAD	229-240	69	HVTISNCKFTQQ
52-63	10	DKCWRGKADWEN	232-243	70	ISNCKFTQQSKA
55-66	11	WRGKADWENNRQ	235-246	71	CKFTQQSKAILL
58-69	12	KADWENNRQALA	238-249	72	TQQSKAILLGAD
61-72	13	WENNRQALADCA	241-252	73	SKAILLGADDTHT
64-75	14	NRQALADCAQGF	244-255	74	ILLGADDTHTVQD
67-78	15	ALADCAQGFAGK	247-258	75	GADDTHTVQDKGM
70-81	16	DCAQGFAGKTYG	250-261	76	DHTVQDKGMLAT
73-84	17	QGFAGKTYGGKW	253-264	77	VQDKGMLATVAF
76-87	18	AKGTYGGKWGDV	256-267	78	KGMLATVAFNMF
79-90	19	TYGGKWGDVYTV	259-270	79	LATVAFNMF T DN
82-93	20	GKWGDVYTV T SN	262-273	80	VAFNMF T DNVDQ
85-96	21	GDVYTV T SNLDD	265-276	81	NMF T DNVDQRMP
88-99	22	YTV T SNLDDDDVA	268-279	82	TDNVDQRMPRCR
91-102	23	TSNLDDDDVANPK	271-282	83	VDQRMPRCRFGF
94-105	24	LDDDDVANPKEGT	274-285	84	RMPCRFRGFFQV
97-108	25	DVANPKEGTLRF	277-288	85	RCRFRGFFQVVNN
100-111	26	NPKEGTLRFAAA	280-291	86	FGFFQVVNNNYD
103-114	27	EGTLRFAAAQNR	283-294	87	FQVVNNNYDRWG
106-117	28	LRFAAAQNRPLW	286-297	88	VNNNYDRWGTYA
109-120	29	AAQNRPLWIIIF	289-300	89	NYDRWGTYAIGG
112-123	30	QNRPLWIIIFKND	292-303	90	RWGTYAIGGSSA
115-126	31	PLWIIIFKNDMVI	295-306	91	TYAIGGSSAPTI

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【表 2】

表1.

アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列	アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列
118-129	32	IIFKNDMVINLN	298-309	92	IGGSSAPTILCQ
121-132	33	KNDMVINLNQEL	301-312	93	SSAPTILCQGNR
124-135	34	MVINLNQELVFN	304-315	94	PTILCQGNRFLA
127-138	35	NLNQELVVNSDK	307-318	95	LCQGNRFLAPDD
130-141	36	QELVVNSDKTID	310-321	96	GNRFLAPDDQIK
133-144	37	VVNSDKTIDGRG	313-324	97	FLAPDDQIKKNV
136-147	38	SDKTIDGRGVKV	316-327	98	PDDQIKKNVLAR
139-150	39	TIDGRGVKVEII	319-330	99	QIKKNVLARTGT
142-153	40	GRGVKVEIINGG	322-333	100	KNVLARTGTGAA
145-156	41	VKVEIINGGLTL	325-336	101	LARTGTGAAESM
148-159	42	EIINGGLTMNV	328-339	102	TGTGAAESMAWN
151-162	43	NGGLTMNVKNI	331-342	103	GAAESMAWNWRS
154-165	44	LTMNVKNIH	334-345	104	ESMAWNWRSKDK
157-168	45	MNVKNIHININ	337-348	105	AWNWRSDKDLLE
160-171	46	KNIHININIH	340-351	106	WRSDKDLLENGA
163-174	47	IHNINIHDKV	343-354	107	DKDLLENGAIFV
166-177	48	NINIHDKVLP	346-357	108	LLENGAIFVTSG
169-180	49	IHDVKVLP	349-360	109	NGAIFVTSGSDP
172-183	50	VKVLP	352-363	110	IFVTSGSDPVLT
175-186	51	LPGGMKSNDGP	355-366	111	TSGSDPVLT
178-189	52	GMIKSNDGPPIL	358-369	112	SDPVLT
181-192	53	KSNDGPPILRQA	361-372	113	VLTPVQSAGMIP
184-195	54	DGPPILRQASDG	364-375	114	PVQSAGMIPAEP
187-198	55	PILRQASDGTI	367-378	115	SAGMIPAEPGEA
190-201	56	RQASDGTINVA	370-381	116	MIPAEPGEAAIK
193-204	57	SDGDTINVAGSS	373-384	117	AEPGEAAIKLTS
196-207	58	DTINVAGSSQIW	376-387	118	GEAAIKLTSSAG
199-210	59	NVAGSSQIWDH	379-390	119	AIKLTSSAGVLS
202-213	60	GSSQIWDHCSL	382-393	120	LTSSAGVLS
			385-397	121	SAGVLS

10

20

30

【0101】

実施例 2.3 : サイトカインの測定

T細胞は、洗浄され、かつ刺激物(5 µg/ml)の存在下において48時間にわたって放射線照射を受けた自己のAPCとともにインキュベートされた。生じた上清におけるサイトカインレベルは、適合抗体対(Endogen, USA)を用いたELISA(感度の限界: IL-4: 9 pg/ml, IFN-γ: 9 pg/ml)において測定された。TCCおよびAPC単独を含有する株が、陰性対照の役割を果たした。>10のIFN-γ/IL-4の割合を有するTCCは、Th1と分類され、当該割合が0.1~10のTCCはTh0と分類され、かつ当該割合が<0.1のTCCはTh2と分類された。

40

【0102】

実施例 2.4 : フローサイトメトリー

TCCの表現型は、FACSscanならびにFITC標識モノクローナル抗体である、抗Leu/CD3、抗Leu 2a/CD8、抗TCR WT 31、抗TCR

50

およびCRTH2 + ヤギ抗ラットPE (すべての抗体は、BD Bioscience、USAから入手された)を用いた、フローサイトメトリーによって分析された。

【0103】

実施例2.5:天然Amb a 1とのrAmb a 1の比較

組み換えAmb a 1.3アイソフォームが天然のAmb a 1 (アイソフォームの混合物)と比べてT細胞を刺激したかを確認するために、PBMCおよびAmb a 1特異的TCLおよびAmb a 1特異的TCCは、異なる濃度の天然のAmb a 1またはrAmb a 1.3を用いて刺激された。増殖およびサイトカイン応答が測定された。両方のアレルゲンの刺激能は、濃度の範囲の全体に渡って安定であり、天然のAmb a 1およびrAmb a 1.3は、同等のT細胞増殖 (図3および4) およびサイトカイン産生 (図5および6) を一般的に誘導した。クローンレベルにおいて、rAmb a 1.3の異なるエピトープを認識するAmb a 1特異的TCCが試験されたうちの1/6は、天然Amb a 1に対して反応しなかった (エピトープ: 265 ~ 276アミノ酸)。ブタクサ抽出物または組み換えAmb a 1.3を用いて誘導されたTCLは、類似のT細胞エピトープパターンを示した (図7)。

10

【0104】

実施例2.6: Amb a 1のT細胞エピトープ

Amb a 1.3のT細胞エピトープマッピングが実施されて、異なる患者 (ウィーンから37人およびイタリアから9人) から得られた48のTCLを評価した (表2)。当該TCLは、ブタクサ抽出物 (天然のアレルゲンを含有している) またはrAmb a 1.3を用いて惹起されている。ブタクサ抽出物またはrAmb a 1.3のいずれかを用いて誘導された、同じ個体からのTCLは、類似のT細胞エピトープを認識した (表2、図7)。オーストリア人およびイタリア人の患者は、類似のエピトープ認識プロファイルを示した。したがって、これらのデータは、さらなる分析と組み合わせられた (表3)。多くの吸入アレルゲンにとって典型的な、多数のT細胞活性化領域がAmb a 1.3において検出された。単一の個体からのT細胞によって認識されたペプチドの数は、平均して17.8のペプチドであり、2から最大で60のペプチドの範囲であった (SI > 3に関して中央値 = 16; それぞれ0 ~ 36 / 11.9 / SI > 5に関して12) (表3を参照すればよい)。合計して26の関連する、12 ~ 18位のアミノ酸を備えるT細胞活性化領域 (すなわち、10%の試験された患者によって認識された) が同定された。これらのエピトープ含有領域は、普及の等級に分けられた (SI > 5を参照すればよい)。

20

30

【0105】

11の領域が10 ~ 20%の患者において陽性であった:

ペプチド20 (82 ~ 93位のアミノ酸)、GKWGDVYTVTSN (配列番号20)、14.6%によって認識された;

ペプチド42 (148 ~ 159位のアミノ酸)、ペプチドEIIINGGLTLMNV (配列番号42)、10.4%によって認識された;

ペプチド44 (154 ~ 165位のアミノ酸)、LTL MNVKNI I I H (配列番号44)、18.8%によって認識された;

40

ペプチド78 (256 ~ 267位のアミノ酸)、KGM LATVA FNMF (配列番号78)、12.5%によって認識された;

ペプチド80 ~ 81 (262 ~ 276位のアミノ酸)、VAFNMFTDNVDQRMP (配列番号122)、12.5%によって認識された;

ペプチド83 (271 ~ 282位のアミノ酸)、VDQRMPRCRFGF (配列番号83)、16.7%によって認識された;

ペプチド88 ~ 89 (286 ~ 300位のアミノ酸)、VNNNYDRWGTYAIGG (配列番号123)、12.5%によって認識された;

ペプチド94 (304 ~ 315位のアミノ酸)、PTILCQGNRFLA (配列番号94)、18.8%によって認識された;

50

ペプチド98～99(316～330位のアミノ酸)、PDDQIKKNVLRRTGT
(配列番号124)、16.7%によって認識された;

ペプチド100(322～333位のアミノ酸)、KNVLRRTGTGAA(配列番号
100)、10.4%によって認識された;

ペプチド101/102(325～339位のアミノ酸)、LARTGTGAAESMA
WN(配列番号125)、14.6%によって認識された。

【0106】

9の領域が21～30%の患者において陽性であった:

ペプチド27～28(103～117位のアミノ酸)、EGTLRF AAAQNRPLW
(配列番号126)、22.9%によって認識された;

ペプチド30～31(112～126位のアミノ酸)、QNRPLWIIFKNDMVI
(配列番号127)、20.8%によって認識された;

ペプチド33～34(121～135位のアミノ酸)、KNDMVINLNQELVVN
(配列番号128)、27.1%によって認識された;

ペプチド36～37(130～144位のアミノ酸)、QELVVNSDKTIDGRG
(配列番号129)、25.0%によって認識された;

ペプチド46～48(160～177位のアミノ酸)、KNIIIHNIHNDVKV
LPG(配列番号130)、20.8%によって認識された;

ペプチド86(280～291位のアミノ酸)、FGFFQVVNNNYD(配列番号8
6)、20.6%によって認識された;

ペプチド91(295～306位のアミノ酸)、TYAIGGSSAPTI(配列番号9
1)、22.9%によって認識された;

ペプチド109～111(349～366位のアミノ酸)、NGAIFVTS GSDPV
LTPVQ(配列番号131)、22.9%によって認識された;

ペプチド118～120(376～393位のアミノ酸)393、GEAAIKLTSS
AGVLS CRP(配列番号132)、20.8%によって認識された。

【0107】

3つの領域が31～49%の患者において陽性であった:

ペプチド38～40(136～153位のアミノ酸)、SDKTIDGRGVKVEII
NGG(配列番号133)、33.3%によって認識された;

ペプチド68(226～237位のアミノ酸)、GSTHV TISNCKF(配列番号6
8)、33.3%によって認識された;

ペプチド114～115(364～378位のアミノ酸)、PVQSAGMIPAEPG
EA(配列番号134)、35.4%によって認識された。

【0108】

3つの領域が>50%の患者において陽性であった:

ペプチド52(178～189位のアミノ酸)、GMIKSNDGPPIL(配列番号5
2)、56.3%によって認識された;

ペプチド59～61(199～216位のアミノ酸)、NVAGSSQIWIDHCSL
SKS(配列番号135)、58.3%によって認識された;

ペプチド107～108(343～357位のアミノ酸)、DKDLLENGAIFVT
SG(配列番号136)、56.3%によって認識された。

【0109】

50%を超えるアレルギー患者において増殖性応答を誘導する3つのT細胞活性化領域
は、免疫優性エピトープであると決定した(図8、表3)。

【0110】

あるペプチドのT細胞活性化能は、認識の頻度と一般的に相関しない。したがって、“
陽性指標(PI;陽性患者の百分率×SIの平均)”が他の重要なエピトープを明らかに
するために算出された。PIは、98～2300までの範囲内であり、かつ上述の3つの
免疫優性領域および4つのさらなる領域(PI>700;27%の最高値)を、Amb

10

20

30

40

50

a 1.3における強い免疫原性領域として決定した：

46～48：160～177位のアミノ酸：KNIIIHNIHDKVLPGLPG（配列番号130）

109～111：349～366位のアミノ酸：NGAIFVTSGSDPVLTPVQ（配列番号131）

114～115：364～378位のアミノ酸：PVQSAGMIPAEPGEA（配列番号134）

118～120：376～393位のアミノ酸：GEAAIKLTSSAGVLSLRP（配列番号132）。

【0111】

TCLに加えて、10人の異なるブタクサ花粉アレルギー患者から100を超えるAmba1特異的TCCが確立された。1つのCD8+TCCを除いて、これらのTCCは、CD4+TCR α +T細胞であることが示された。108のAmba1特異的TCC（n=10の患者）におけるサイトカイン産生の調査によって、これらのTCCの大部分（50%）においてTh2様サイトカインプロファイルが明らかになった（Th1：11%；Th0：39%）。さらに、調査された68のTCC（患者n=8）のうちの74%がCRTh2を発現した。CRTh2は、Th2T細胞の表面マーカーであり、またわれわれの株におけるAmba1特異的T細胞が関連するアレルギー性T細胞を代表することを示している。Amba1特異的TCCを用いたAmba1.3のT細胞エピトープマッピングは、TCLから得られたデータを反映していた。その結果から、Amba1の提示が多様である（制限要素としてHLA-DR、-DPまたは-DQを含む）ことが示された。

【0112】

米国特許第6,335,020号明細書（ブタクサ花粉由来のアレルギー性ペプチド）において、T細胞反応性の主要な4つの領域：57～101位、182～215位、280～322位および342～377位のアミノ酸が報告されている（図6）。このエピトープ分布は、本発明のエピトープといくつかの内容物に関して異なる。例えば、57～101位のアミノ酸の領域に対比して、101～180位のアミノ酸内のエピトープがはるかに頻度よく認識されることが見出された。関連する木本花粉アレルギーChao1（ヒノキ）、Cryj1（スギ）に由来するT細胞エピトープは、他者によって説明されている（Sone et al., Clin Exp Allergy, 35: 664-71, 2005）。これらのアレルギーの主要なエピトープは、Amba1における副次的なT細胞エピトープと相同な領域に配置されている。

【0113】

10

20

30

【表3】

表2.48人の異なるブタクサ花粉アレルギー患者から得られた、Amb a 1特異的TCLのT細胞エピソード。TCLは、rAmb a 1.3またはブタクサ花粉抽出物のいずれかを用いて開始された。3および5を超える刺激指標(SI)を示すペプチドが、各患者について一覧表にされている。

患者の番号	ペプチドの番号(SI>3)	ペプチドの番号(SI>5)
1	112, 114	8, 31, 33, 36, 44, 52, 59, 60, 61, 68, 78, 102, 108, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 118, 119, 120
2	29, 30, 42, 64, 67, 79, 88, 89, 93, 98, 101, 103	27, 28, 33, 52, 60, 61, 68, 94, 107, 108, 111, 114, 115, 116, 118, 119, 120
3	120	107
4	41, 42, 60, 90, 98	52, 83, 91, 107, 108
5	39, 78, 85, 99, 101, 102, 107, 108	28, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 86, 100, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 119, 120
6	34	83, 91, 107, 108, 115
7	11, 58, 68, 78, 82, 84, 86, 88, 89, 99, 108	33, 39, 47, 48, 51, 52, 59, 60, 61, 107
8	34, 44, 45, 72, 79, 80	33, 39, 40, 50, 71, 83, 107
9	50, 76, 83, 87, 101, 112, 113, 119, 121	39, 69, 91, 93, 107, 117
10	47, 96, 97, 110, 119	44, 46, 60, 61, 69, 89, 101, 107, 108, 115
11	110	33, 38, 39, 46, 52, 60, 69, 83, 90, 91, 107, 108, 115
12	59	36, 37, 52, 60, 61, 68, 86, 96, 97, 98
13	14, 37, 44, 61, 71, 77, 108, 111, 121	20, 28, 36, 47, 101, 109, 110, 118
14	30, 31, 111, 120	119
15	8, 20, 46, 47, 71, 77, 107, 108	
16	87	21, 46, 47, 54, 55, 63, 86
17	14, 23, 29, 34, 53, 58, 69, 76, 80, 82, 85, 99, 102, 107, 115	20, 22, 28, 31, 33, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 68, 77, 81, 84, 88, 98, 108, 109, 110, 111, 118, 119, 120
18	33, 104	38, 39, 52, 60, 61, 68, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 112

10

20

30

【0114】

【表4】

表2.

患者の番号	ペプチドの番号(SI>3)	ペプチドの番号(SI>5)
19		20, 28, 36, 37, 44, 47, 48, 52, 59, 60, 67, 77, 78
20	60, 61	
21	29, 34, 47, 61	30, 33, 38, 39, 42, 43, 46, 49, 52, 60, 91, 94, 107, 108, 114, 115
22	20, 39, 44, 52, 53, 64, 69, 85, 94	28, 37, 38, 40, 60, 61, 68, 86
23	23, 51, 53, 54, 55, 59, 116, 117, 120	9, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 46, 47, 48, 52, 60, 61, 68, 81, 88, 89, 98, 99, 107, 108, 111, 115, 118, 119
24	28, 114	11, 34, 37, 38, 52, 68, 83, 89, 91, 100, 101, 102, 107, 108, 109, 110, 115
25	44, 111, 119, 120	60, 61, 77, 92, 93, 94, 107, 108, 109, 110
26	28, 29, 30, 36, 44, 68, 83, 84, 118, 121	12, 15, 22, 23, 31, 33, 52, 60, 61, 73, 74, 78, 82, 86, 107, 108, 111, 113, 115, 119, 120
27	43, 107	10, 22, 28, 30, 33, 36, 37, 48, 52, 60, 61, 86, 87
28	33, 39, 61, 73, 93, 94, 99, 118	36, 52, 60, 77, 88, 102, 107, 108, 109, 110, 111, 119, 120
29	28, 81, 83, 86, 87, 91, 100	31, 39, 52, 59, 60, 61, 67, 68, 69, 80, 107, 108, 111, 115, 118, 119, 120
30	4, 78	20, 27, 28, 29, 30, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 68, 80, 93, 94, 108, 117
31	11, 32, 77	29, 30, 38, 39, 40, 42, 46, 47, 48, 61, 79, 89, 94, 108, 115
32	1, 77	4, 20, 22, 28, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 50, 52, 60, 61, 62, 66, 68, 78, 83, 86, 90, 91, 96, 97, 98, 105, 107, 108, 115
33	12, 61	52, 60, 68, 108
34	28, 30, 42, 91	24, 27, 29, 94, 108, 114
35	37, 38, 69, 72	20, 28, 33, 36, 39, 42, 44, 48, 52, 58, 60, 61, 68, 94, 114

10

20

30

40

【表5】

表2.

患者の番号	ペプチドの番号(SI>3)	ペプチドの番号(SI>5)
36	7, 9, 12, 15, 16, 28, 33, 37, 39, 43, 47	30, 52, 60, 61, 68, 96, 97, 98, 107
37	5, 12, 29, 55, 59	
38	19, 37, 39, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 98, 107, 109, 113	20, 22, 28, 31, 36, 44, 52, 78, 82, 86, 89, 90, 101, 102, 110, 111, 118, 119, 120
39	4, 52	33, 42, 47, 48, 59, 60, 78, 98, 99, 107
40	24, 25, 33, 52, 73, 78, 98, 109, 111, 119	31, 66, 68, 71, 80, 81, 83, 102, 107, 108, 110, 112, 115, 120
41	2, 17, 20, 28, 30, 36, 37, 38, 44, 61, 92	27, 31, 39, 52, 83, 91, 94
42	67, 80	91, 93, 101
43	28, 62, 68, 76, 88, 89	38, 39, 51, 52, 59, 60, 61, 80, 81, 86, 92, 100, 101, 102, 109, 110
44	35, 80, 88, 90, 119	30, 31, 38, 39, 46, 47, 48, 51, 52, 59, 60, 94, 100, 107, 108, 111, 112, 115, 121
45	5, 39, 41, 42, 48, 51, 52, 53, 54, 65, 67, 68, 74, 78, 79, 84, 89, 106, 109, 112	47, 60, 61, 63, 64, 66, 72, 73, 75, 76, 80, 85, 86, 87, 88, 101, 107, 108, 115, 116
46	88	27, 91, 107
47	3, 4, 5, 6, 13, 14, 16, 23, 28, 41, 49, 61, 74, 89, 98, 102, 108, 112, 113, 114, 116, 119, 120, 121	2, 9, 15, 30, 50, 56, 62, 91, 99, 100, 103, 105, 107, 110, 111, 115, 117
48	1, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 25, 32, 36, 42, 53, 65, 67, 69, 88, 97, 105, 106, 111	10, 11, 18, 30, 31, 33, 38, 39, 40, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 54, 59, 60, 61, 66, 68, 70, 72, 79, 80, 81, 89, 98, 99, 107, 108, 109, 114, 115, 116, 118, 121

10

20

【表6】

表3.48人の異なるブタクサ花粉アレルギー患者から得られた、Amb a 1特異的T細胞株のT細胞エピトープ(表2を参照すればよい)。重複を有する121の合成ペプチド(12mer)が、エピトープマッピングに使用された。各エピトープの関与度は、3を越える刺激指標(SI>3)および5を越える刺激指標(SI>5)に関して、別個に評価された。

ペプチド (配列番号)	アミノ酸位置	アミノ酸配列	陽性患者の 番号		陽性患者の 番号	
			SI>3	%	SI>5	%
1	25-36	SAEGVGEILPSV	2	4,2	0	0,0
2	28-39	GVGEILPSVNET	2	4,2	1	2,1
3	31-42	EILPSVNETRSL	1	2,1	0	0,0
4	34-45	PSVNETRSLQAC	4	8,3	1	2,1
5	37-48	NETRSLQACEAY	4	8,3	0	0,0
6	40-51	RSLQACEAYNII	1	2,1	0	0,0
7	43-54	QACEAYNIIDKC	1	2,1	0	0,0
8	46-57	EAYNIIDKCWRG	3	6,3	1	2,1
9	49-60	NIIDKCWRGKAD	3	6,3	2	4,2
10	52-63	DKCWRGKADWEN	2	4,2	2	4,2
11	55-66	WRGKADWENNRQ	4	8,3	2	4,2
12	58-69	KADWENNRQALA	5	10,4	1	2,1
13	61-72	WENNRQALADCA	2	4,2	0	0,0
14	64-75	NRQALADCAQGF	4	8,3	0	0,0
15	67-78	ALADCAQGFAGK	4	8,3	2	4,2
16	70-81	DCAQGFAGKTYG	2	4,2	0	0,0
17	73-84	QGFAKGTGGKW	2	4,2	1	2,1
18	76-87	AKGTGGKWGDV	1	2,1	0	0,0
19	79-90	TYGGKWGDVYTV	2	4,2	0	0,0
20	82-93	GKWGDVYTVTSN	9	18,8	7	14,6
21	85-96	GDVYTVTSNLDD	2	4,2	1	2,1
22	88-99	YTVTSNLDDDVA	4	8,3	4	8,3
23	91-102	TSNLDDDVANPK	2	4,2	1	2,1
24	94-105	LDDDVANPKEGT	2	4,2	1	2,1
25	97-108	DVANPKEGTLRF	2	4,2	0	0,0
26	100-111	NPKEGTLRFAAA	0	0,0	0	0,0
27	103-114	EGTLRFAAAGNR	5	10,4	5	10,4
28	106-117	LRFAAAGNRPLW	15	31,3	11	22,9
29	109-120	AAAQRPLWIIF	4	8,3	3	6,3

【0117】

10

20

30

40

【表7】

表3.

ペプチド (配列番号)	アミノ酸位置	アミノ酸配列	陽性患者の 番号	%	陽性患者の 番号	%
30	112-123	QNRPLWIIIFKND	11	22,9	9	18,8
31	115-126	PLWIIIFKNDMVI	11	22,9	10	20,8
32	118-129	IIIFKNDMVINLN	2	4,2	1	2,1
33	121-132	KNDMVINLNQEL	15	31,3	13	27,1
34	124-135	MVINLNQELVFN	2	4,2	2	4,2
35	127-138	NLNQELVVNSDK	1	2,1	1	2,1
36	130-141	QELVVNSDKTID	14	29,2	12	25,0
37	133-144	VVNSDKTIDGRG	14	29,2	9	18,8
38	136-147	SDKTIDGRGVKV	13	27,1	11	22,9
39	139-150	TIDGRGVKVEII	19	39,6	16	33,3
40	142-153	GRGVKVEIINGG	3	6,3	4	8,3
41	145-156	VKVEIINGGLTL	5	10,4	1	2,1
42	148-159	EIINGGLTLMNV	11	22,9	5	10,4
43	151-162	NGGLTLMNVKNI	4	8,3	1	2,1
44	154-165	LTLMNVKNIH	15	31,3	9	18,8
45	157-168	MNVKNIHNIIN	2	4,2	0	0,0
46	160-171	KNIHNIHNIHD	10	20,8	8	16,7
47	163-174	IHNIHNIHDVKV	14	29,2	10	20,8
48	166-177	NINIHDVKVLPG	10	20,8	9	18,8
49	169-180	IHDVKVLPGGMI	3	6,3	2	4,2
50	172-183	VKVLPGGMIKSN	5	10,4	4	8,3
51	175-186	LPGGMIKSNLGP	6	12,5	3	6,3
52	178-189	GMIKSNLGPPIIL	31	64,6	27	56,3
53	181-192	KSNDGPPILRQA	5	10,4	0	0,0
54	184-195	DGPPILRQASDG	4	8,3	2	4,2
55	187-198	PILRQASDGTI	3	6,3	1	2,1
56	190-201	RQASDGTINVA	1	2,1	1	2,1
57	193-204	SDGTINVAGSS	0	0,0	0	0,0
58	196-207	DTINVAGSSQIW	3	6,3	1	2,1
59	199-210	NVAGSSQIWDH	11	22,9	8	16,7
60	202-213	GSSQIWDHCSL	30	62,5	28	58,3

10

20

30

【0118】

【表 8】

表3.

ペプチド (配列番号)	アミノ酸位置	アミノ酸配列	陽性患者の 番号	%	陽性患者の 番号	%
61	205-216	QIWIDHCSSLKSKS	29	60,4	24	50,0
62	208-219	IDHCSSLKSKSFDG	3	6,3	2	4,2
63	211-222	CSLKSFDGLVD	2	4,2	2	4,2
64	214-225	SKSFDGLVDVTL	3	6,3	1	2,1
65	217-228	FDGLVDVTLGST	2	4,2	1	2,1
66	220-231	LVDVTLGSTHVT	4	8,3	4	8,3
67	223-234	VTLGSTHVTISN	6	12,5	2	4,2
68	226-237	GSTHVTISNCKF	20	41,7	16	33,3
69	229-240	HVTISNCKFTQQ	8	16,7	4	8,3
70	232-243	ISNCKFTQQSKA	1	2,1	1	2,1
71	235-246	CKFTQQSKAILL	4	8,3	2	4,2
72	238-249	TQQSKAILLGAD	4	8,3	2	4,2
73	241-252	SKAILLGADDTH	4	8,3	2	4,2
74	244-255	ILLGADDTHVQD	3	6,3	1	2,1
75	247-258	GADDTHVQDKGM	1	2,1	1	2,1
76	250-261	DTHVQDKGMLAT	4	8,3	1	2,1
77	253-264	VQDKGMLATVAF	7	14,6	4	8,3
78	256-267	KGMLATVAFNMF	11	22,9	6	12,5
79	259-270	LATVAFNMFTDN	5	10,4	2	4,2
80	262-273	VAFNMFTDNVDQ	10	20,8	6	12,5
81	265-276	NMFTDNVDQRMP	7	14,6	6	12,5
82	268-279	TDNVDQRMPRCR	3	6,3	2	4,2
83	271-282	VDQRMPRCRFGF	10	20,8	8	16,7
84	274-285	RMPRCRFGFFQV	3	6,3	1	2,1
85	277-288	RCRFGFFQVVNN	4	8,3	1	2,1
86	280-291	FGFFQVVNNNYD	12	25,0	10	20,8
87	283-294	FQVVNNNYDRWG	5	10,4	2	4,2
88	286-297	VNNNYDRWGTYA	10	20,8	4	8,3
89	289-300	NYDRWGTYAIGG	11	22,9	6	12,5
90	292-303	RWGTYAIGGSSA	5	10,4	3	6,3
91	295-306	TYAIGGSSAPTI	13	27,1	11	22,9

【表 9】

表3.

ペプチド (配列番号)	アミノ酸位置	アミノ酸配列	陽性患者の 番号	%	陽性患者の 番号	%
92	298-309	IGGSSAPTILCQ	3	6,3	2	4,2
93	301-312	SSAPTILCQGNR	6	12,5	4	8,3
94	304-315	PTILCQGNRFLA	11	22,9	9	18,8
95	307-318	LCQGNRFLAPDD	0	0,0	0	0,0
96	310-321	GNRFLAPDDQIK	5	10,4	4	8,3
97	313-324	FLAPDDQIKKNV	6	12,5	4	8,3
98	316-327	PDDQIKKNVLAR	13	27,1	8	16,7
99	319-330	QIKKNVLARTGT	8	16,7	4	8,3
100	322-333	KNVLARTGTGAA	6	12,5	5	10,4
101	325-336	LARTGTGAAESM	10	20,8	7	14,6
102	328-339	TGTGAAESMAWN	9	18,8	6	12,5
103	331-342	GAAESMAWNWRS	2	4,2	1	2,1
104	334-345	ESMAWNWRSDKD	2	4,2	1	2,1
105	337-348	AWNWRSDKDLLE	4	8,3	3	6,3
106	340-351	WRSDKDLLENGA	3	6,3	1	2,1
107	343-354	DKDLLENGAIFV	30	62,5	27	56,3
108	346-357	LLENGAIFVTSG	27	56,3	24	50,0
109	349-360	NGAIFVTSGSDP	12	25,0	9	18,8
110	352-363	IFVTSGSDPVLT	13	27,1	11	22,9
111	355-366	TSGSDPVLTVPVQ	16	33,3	11	22,9
112	358-369	SDPVLTVPVQSAG	7	14,6	3	6,3
113	361-372	VLTPVQSAGMIP	4	8,3	1	2,1
114	364-375	PVQSAGMIPAEP	8	16,7	5	10,4
115	367-378	SAGMIPAEPGEA	18	37,5	17	35,4
116	370-381	MIPAEPGEAAIK	6	12,5	4	8,3
117	373-384	AEPGEAAIKLTS	4	8,3	3	6,3
118	376-387	GEAAIKLTSSAG	10	20,8	8	16,7
119	379-390	AIKLTSSAGVLS	16	33,3	10	20,8
120	382-393	LTSSAGVLSERP	14	29,2	9	18,8
121	385-397	SAGVLSERPAPG	6	12,5	2	4,2

10

20

30

【0120】

(実施例3: Amb a 1の鎖および鎖の性質決定)

n Amb a 1は、精製の際に自然発生的にタンパク質分解を受け、かつn Amb a 1は、2つの鎖(鎖および鎖)のそれぞれに切断される。種々の国(イタリア、カナダおよびオーストリア)における患者から回収された血清を用いたデータによって、ほとんど(90%)の患者が12kDaの鎖を認識したことが示された。これに対して、鎖は、試験された患者の65%のみのIgE抗体と弱く結合した(図9)。

40

【0121】

T細胞エピトープの同定を目的とした実験(実施例2に記載した)において、これらのT細胞活性化領域が45%を超えるアレルギー患者において増殖性応答を誘導し、したがって免疫優性エピトープとして明らかになったこと(表3、図8)が見出された。興味深いことに、これらおよび他のT細胞活性化領域は、鎖に対応するAmb a 1のC末

50

端領域に集まっている。したがって、これまでに公開された研究 (King et al. Arch. Biochem. Biophys. 212: 127-135, 1981) とは反対に、今回、集められたデータは、Amb a 1 の2つの鎖の免疫学的特性が異なることを示している。これらの発見が、大腸菌においてこれらの鎖を別々に生成させることの可能性、ならびにアレルギーの診断および免疫療法にとっての候補ワクチンとして利用する可能性を調査することに導いた。弱いIgE結合能を有するが、高い免疫原性(T細胞活性化)を有する鎖は、特異的な免疫療法にとっての最適のツールである。一方において、高いIgE反応性の鎖は、ブタクサ花粉アレルギーを診断するための候補物である。

【0122】

このために、鎖および鎖の生成に使用する正確な切断部位を決定するための実験が実施された。当該実験は、ブタクサ花粉からのAmb a 1の抽出および精製の間におけるAmb a 1に関して説明されている (King et al. Immunochem. 11: 83-92, 1974)。SDS-PAGEによる分子量の推定の他には、構造的なデータがAmb a 1鎖に関して公開されていない。精製された天然Amb a 1 (King et al. Immunochem. 11: 83-92, 1974を参照すればよい) は、Maldi-TOF質量分析によって分析され、かつAmb a 1の未処理の鎖および鎖に対応するバンドは、SDS-PAGE/電気プロットティング/クーマシー染色の後にエドマン分解にかけられた。このようにして、プロセッシングを受けた天然Amb a 1およびプロセッシングを受けていない天然のAmb a 1の正確な質量およびN末端配列を決定することが可能になった (図10~13、表4)。

【0123】

実施例3.1: N末端配列分析

天然Amb a 1は、15%のSDS-PAGEによって分離され、かつポリビニルジフルオライド(PVDF)膜(Millipore)上に電気プロットされた。Amb a 1およびその断片に対応するバンドが切り出され、かつ室温において1時間にわたって40%(容積/容積)のアセトニトリルおよび30%(容積/容積)のトリフルオロ酢酸の水溶液においてインキュベートすることによって、タンパク質が溶出された。サンプルは、真空乾燥され、水に再懸濁され、かつHP G1005Aシーケンシングシステム(Agilent Technologies)を用いて配列決定された。

【0124】

実施例3.2: マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析

シナピン酸およびウシ膵臓トリプシンの分子ピークが、カリブレーションに使用された。100mMのDTTを含む0.5μl(~0.7μl)の天然Amb a 1タンパク質溶液、および0.5μlのシナピン酸マトリクスが、50%(容積/容積)のアセトニトリルおよび0.1%(容積/容積)のトリフルオロ酢酸(TFA)の飽和溶液に溶解され、混合され、かつ標的スライド塗布された。サンプルは、Kompact MALDI-TOF IV質量分析器(Shimadzu)を用いて直線飛行モードにおいて分析された。

【0125】

実施例3.3: 結果

まとめると、データ(図10~13、表4)によって、Amb a 1の予測されるアミノ酸配列内の鎖および鎖の正確な位置づけを可能になりし、かついくつかのタンパク質分解段階がこれらの生成に関わることが示された。

(i) プロセッシングを受けていないAmb a 1のN末端配列は、17~20アミノ酸がタンパク質のN末端配列から除かれていることを示した。

(ii) 鎖は、138アミノ酸長であり、かつAmb a 1のN末端部分に対応する(成熟タンパク質(Amb a 1.1アイソフォームをテンプレートとして採用している)の18~155位のアミノ酸)。

(iii) 鎖は、207アミノ酸長であり、かつAmb a 1のC末端部分に対応す

10

20

30

40

50

る(成熟タンパク質(Amb a 1.1アイソフォームをテンプレートとして採用している)の165~371位のアミノ酸)。

(iv)9つのアミノ酸が、鎖のC末端と鎖のN末端との間から除去されている。

【0126】

図14は、Amb a 1の予測されるアミノ酸配列を、それらの配列上に位置づけられた推定の鎖および鎖とともに示す。

【0127】

【表10】

表4:天然Amb a 1の質量分析

	プロセッシングを受けていない Amb a 1		Amb a 1の α 鎖		Amb a 1の β 鎖	
	予測値	測定値	予測値	測定値	予測値	測定値
nAmb a 1		37,832.14		21,808.54 22,323.24		15,086.31
Amb a 1.1	37,864.43		21,999.50		15,017.04	
Amb a 1.2	38,625.71		22,425.10		15,268.56	
Amb a 1.3	38,255.30		22,036.77		15,286.49	
Amb a 1.4	38,008.93		21,953.62		15,130.29	
Amb a 2	39,392.56		22,921.76		15,638.88	

10

20

【0128】

(実施例4: Amb a 1.3の鎖および鎖の組み換え生成)

実施例4.1:天然のプロセッシングに従って設計された、Amb a 1.3の鎖および鎖の発現ベクターの構築および精製

プラスミドの構築および鎖の精製が実施例4.2に記載の通りに実施された。2つの鎖における差異は、図16に示されている。表5は、鎖および鎖の組み換え生成用の種々の構築物をまとめたものである。

【0129】

実施例4.2: Amb a 1.3の改変した鎖および鎖(バージョン1)の組み換え生成

本実験によって、改変された鎖の個別の生成が、全長のAmb a 1.3分子の生成よりもはるかに有効であることが証明された。鎖の生成収量は、1Lの発酵培養物につき約100mgであった。さらに、鎖および鎖の両方に関して大きな凝集体の形成は認められなかった(図18)。

【0130】

実施例4.2.1: プラスミド構築

改変した鎖にしたがって設計されたプライマーを用いた、もとのR2クローンからの100 μ lの標準的なPCRが実施された。PCR産物は、Wizard Gene clean up (Promega)を用いてアガロースゲルから溶出された。両方のプライマーセット(用および用)は、5'末端にNco I部位ならびに3'末端にストップコドンおよびXho Iを含んでいた。これらの酵素を用いてPCR断片およびベクターpHis parallel-2は、オーバーナイト、37において消化された。アガロースゲルからの溶出(Wizard Gene clean up、Promega)の後に、PCR断片は、T4 DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いて、標準的なライゲーション手順にしたがってベクターに連結された。連結反応は、電気穿孔法によって細菌株TG1(K12、D(lac-pro)、supE、thi、hsdD5/F'[traD36、proA+B+、lacIq、lacZDM15])を形質転換するために使用された。100 μ lの形質転換体をプレートに播いた後に、LB amp 寒天

30

40

50

プレートは、オーバーナイト、37 においてインキュベートされた。PCRコロニースクリーニングが使用されて、陽性のクローンを選択した(コロニーの少量がクローニングプライマーを用いた標準的なPCR用の鋳型として使用される)。選択されたクローンは、50mlのSB培養およびプラスミド精製に使用された。挿入物は、ABIシーケンシングキットを用いて配列決定された。正しい配列を有するプラスミドが使用されて、細菌株BL21およびRosetta-gami B(DE3)pLysS(Novagen)を形質転換した。予備的な実験によって、大腸菌株Rosetta-gami B(DE3)pLysSを用いればより高い発現レベルが実現されることが示された(図17)。

【0131】

実施例4.2.2: Amb a 1.3の改変した 鎖および 鎖(バージョン2)の発現および精製

新たに形質転換された細菌から得られた10~20のクローンは、0.5~0.7のOD₆₀₀までSBにおいて増殖され、それから0.4mMのIPTGを用いて誘導された。発現は、4~5時間にわたって実施され、それから培養物が遠心分離(5,000g)によってペレット化された。細菌のペレットが開始緩衝液(25mMのリン酸ナトリウムpH8.0、1MのNaCl)に再懸濁された。細胞は、3回の凍結融解(液体窒素における凍結および25 における融解)によって溶解された。懸濁物は、ライソザイム(5mg/ml)、Dnase(0.5μg/ml)を用いて処理され、かつ5分間にわたって超音波処理された。遠心分離(15,000g)の後に、ペレットは、尿素開始緩衝液(開始緩衝液+6Mの尿素+10mMのイミダゾール)に再懸濁された。遠心分離(15,000g)の後に、上清は、HisTrap Ni²⁺カラム(Amersham)にかけられた。溶出は、溶出緩衝液(尿素開始緩衝液+400mMのイミダゾール)を有する勾配によって実施された。画分がプールされ、かつ500mMのL-Arg pH8.5に対して3回透析された。その後に、タンパク質は、PBSに対して透析された。Amb a 1の精製された 鎖および 鎖(図18)は、IgE結合アッセイおよびT細胞増殖アッセイに使用された。

【0132】

実施例4.2.3: Amb a 1.3の改変した 鎖および 鎖(バージョン1)に対するT細胞応答

表3におけるT細胞エピトープの結果と比較した場合に、45/46(98%)の患者は、Amb a 1 鎖における1つ以上のエピトープを認識するだろう。したがって、Amb a 1の改変した 鎖および 鎖(バージョン1)に対するT細胞応答は、利用可能なAmb a 1反応性のTCL(n=6)およびTCC(n=2)を用いて、実施例2に記載のように増殖アッセイにおいて試験された。

【0133】

実施例4.3: 組み換え生成

天然にプロセシングを受けたAmb a 1にしたがって設計された 鎖および 鎖の生成は、非常に低い収量のためにあまり希望を与えるものではなかった。しかし、T細胞エピトープマッピング実験から得られたデータによって、1つの重要なエピトープが、ほとんどのT細胞反応性ドメイン(図16、アミノ酸178~189)を有する 鎖に含まれていないことが示された。したがって、新たな鎖はこのT細胞エピトープ(表5、図16)を含むように設計された。

【0134】

実施例4.4: IgE結合

実施例3において示された通り、Amb a 1の天然にプロセシングを受けた 鎖および 鎖は、異なる免疫学的特性を有している。鎖が低いIgE反応性を示す一方において、鎖はAmb a 1のIgEエピトープのほとんどを含有している。したがって、精製された 鎖のIgE結合活性を試験するために、ブタクサアレルギー患者から得られた血清を用いてELISAが実施された。12人の患者からの結果によって、鎖が、

10

20

30

40

50

インビトロにおいて低い I g E 結合活性を示すこと / I g E 結合活性を示さないことが確かめられた (図 1 9) 。 実験は、鎖の生成および性質決定のために実施されている。

【 0 1 3 5 】

実施例 4 . 5 : T 細胞反応性

試験された 6 つの T C L のうち A m b a 1 に対する強い反応性を有する 2 つの T C L が 図 2 0 に示されている。鎖は、増殖の刺激に関して鎖よりもはるかに有効であった (A m b a 1 の応答の、82%および84%に対して38%および19%) 。この知見は、これらの 2 つの T C L のエピトープ認識パターンによって説明され得る (図 2 を参照すればよい) 。また、他の 2 つの T C L は、それらのエピトーププロファイルにしたがって鎖および / または鎖と反応した (図 2 1) 。

10

【 0 1 3 6 】

A m b a 1 - 内のエピトープに対して特異的な 2 つの T C C は、A m b a 1 . 3 ほどには強くない程度に鎖と反応するが、鎖とは反応しない。

【 0 1 3 7 】

【 表 1 1 】

表 5 . A m b a 1 . 3 鎖

A m b a 1 . 3 鎖		アミノ酸位置	長さ
天然にプロセシングされた	α	191 - 397	207 アミノ酸
	β	44 - 181	138 アミノ酸
天然のプロセシングに従って設計された	α	191 - 397	208 アミノ酸
	β	26 - 190	164 アミノ酸
改変された(バージョン1)	α	174 - 397	224 アミノ酸
	β	26 - 173	148 アミノ酸
改変された(バージョン2)	α	174 - 397	224 アミノ酸
	β	46 - 173	128 アミノ酸

20

【 0 1 3 8 】

(まとめ)

要約すると、A m b a 1 の関連する 2 6 の T 細胞活性化領域が、确实性に関する閾値として S I > 5 を選んで、同定された (図 8 および 2 2) 。

【 0 1 3 9 】

4 8 人の異なる患者から得られた T 細胞株によって認識された T 細胞エピトープの分析において、17 / 2 6 のエピトープが、A m b a 1 . 3 の C 末端領域 (鎖) に配置されている一方において、鎖が、患者の 1 0 ~ 3 0 % のみによって主に認識される少数の T 細胞エピトープを含有することが見出された (図 8 、 表 3) 。

【 0 1 4 0 】

しかし、50% を超える患者によって認識される、関連する / 免疫優勢な T 細胞エピトープ配列は、天然に生じる鎖 (鎖においてほんの部分的に代表される) に切断される。この重要な T 細胞活性化領域を網羅するために、本発明は、鎖の C 末端から鎖の N 末端までの 1 6 アミノ酸残基を加えることによる、鎖の改変 (改変したバージョン 1 ; 図 1 6 、 表 5) を含む。したがって、A m b a 1 . 3 鎖の改変 (バージョン 1) した構築物は、A m b a 1 の最も頻繁に認識される 3 つの T 細胞エピトープを含む (図 2 2) 。

40

【 0 1 4 1 】

ブタクサ花粉アレルギー用のワクチンとしての、A m b a 1 . 3 の鎖の全体 (改変したバージョン 1) の使用は、試験された患者 (n = 4 8) の 1 0 0 % を保護するだろう。

50

【0142】

ブタクサ花粉アレルギー患者のペプチド免疫療法に対する、本明細書において同定された3つの免疫優勢T細胞エピトープの組み合わせの使用は、患者の93%を保護するだろう。

GMIKSNDGPPIL (ペプチド52; 配列番号52)

GSSQIWIDHCSLSKS (ペプチド60~61; 配列番号137)

DKDLENGAIFVTS GSDPVLTPVQ (ペプチド107~111; 配列番号138)。

【0143】

以下の4つのペプチドの混合物は、患者の95.8%を保護するだろう。

GMIKSNDGPPIL (ペプチド52; 配列番号52)

GSSQIWIDHCSLSKS (ペプチド60~61; 配列番号137)

DKDLENGAIFVTS GSDPVLTPVQ (ペプチド107~111; 配列番号138)

AIKLTSSAGVLS CRP (ペプチド119~120; 配列番号139)。

【0144】

また、この最適なペプチドの組み合わせに対して、以下の頻繁に認識されるペプチドの追加が考えられ得る。

KNIIIHNIHNDVKVLP G (ペプチド46~48; 配列番号130)

GSTHV TISNCKF (ペプチド68; 配列番号68)

SAGMI PAEPGEA (ペプチド115; 配列番号115)。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】8Mの尿素におけるニッケルキレートクロマトグラフィー(NCC)を用いたrAmb a 1.3の精製を示す。

【図2】組み換えAmb a 1.3のIgEドットプロット分析を示す。

【図3】精製された天然のAmb a 1またはAmb a 1.3を用いて、異なる濃度において刺激したTCLを示す。

【図4】TCL増殖アッセイにおけるアレルゲン力価測定(天然アレルゲンと対比した複数の組み換えアレルゲン(rAmb a 1.3の異なるロット、ロットL1~L4))の例を示す。

【図5】ブタクサ抽出物およびrAmb a 1.3によってTCLにおいて誘導される類似のサイトカイン産生を示す。

【図6】天然のAmb a 1およびrAmb a 1.3によってTCLおよびTCCにおいて誘導される同等のサイトカイン産生を示す。

【図7】天然のAmb a 1またはrAmb a 1.3を用いて誘導されたTCLが類似のT細胞エピトープを認識することを示す。

【図8】Amb a 1.3の関連するT細胞活性化領域を示す。

【図9】精製nAmb a 1のIgE免疫プロットを示す。

【図10】SDS-PAGEおよびPVD F膜上への電気プロットの後における、精製された天然のAmb a 1のクーマシー染色を示す。

【図11】プロセッシングを受けていない天然のAmb a 1(nAmb a 1、図10を参照すればよい)のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

【図12】天然のAmb a 1(nAmb a 1、図10を参照すればよい)の鎖のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

【図13】天然のAmb a 1(nAmb a 1、図10を参照すればよい)の鎖のN末端配列およびAmb a 1アイソフォームの推測されるアミノ酸配列との整合を示す。

10

20

30

40

50

【図14】 Amb a 1 アイソフォームならびにそれらの鎖および鎖の推定されるアミノ酸配列を示す。

【図15】 Amb a 1 アイソフォームの配列整合を示す。

【図16】 Amb a 1.3 (R2クローン)の推定されるアミノ酸配列を示す。

【図17】 大腸菌株 BL21 および Rosetta-gami B(DE3) pLysS における、Amb a 1 の改変した鎖および鎖(バージョン1)の発現を示す。

【図18】 ニッケルカラム上における親和性精製後における、Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖(バージョン1)の SDS-PAGE およびクーマシー染色を示す。

【図19】 天然の Amb a 1 ならびに Amb a 1.3 の改変した鎖および鎖(バージョン1)のヒト IgE を用いた ELISA を示す。

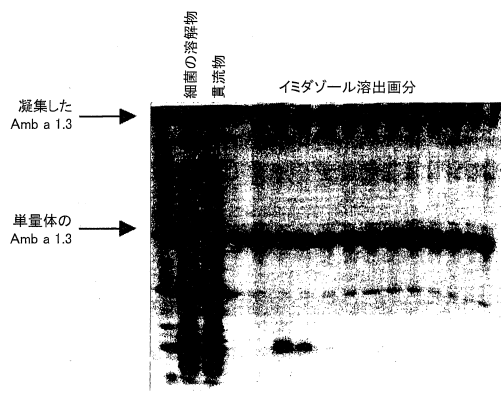
【図20】 mb a 1.3 の改変した鎖および鎖(バージョン1)を用いた Amb a 1 特異的 T C L の増殖を示す。

【図21】 全長の rAmb a 1.3、Amb a 1 の改変した鎖および鎖(バージョン1)を用いた、2つの Amb a 1 特異的 T C L の増殖応答を示す。

【図22】 Amb a 1.3 における同定された関連する T 細胞活性化領域を示す。

10

【図1】



【図2】

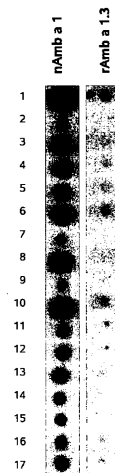
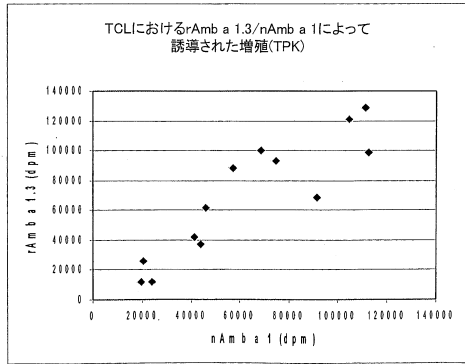
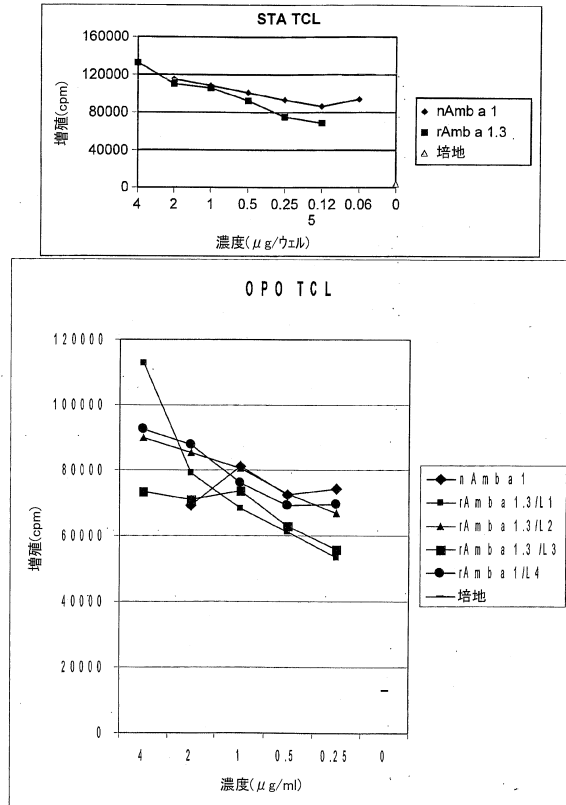


Fig. 2

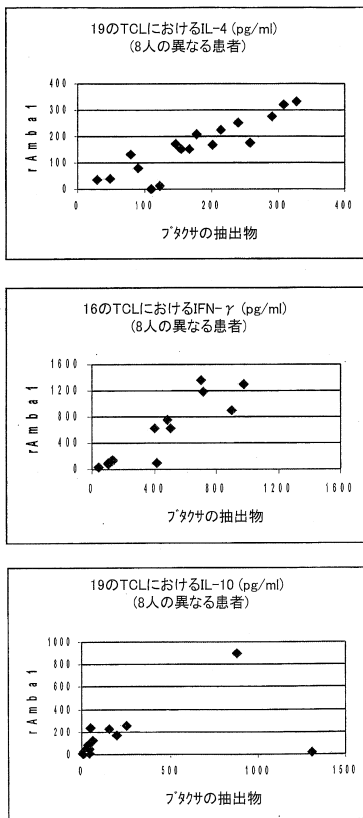
【 図 3 】



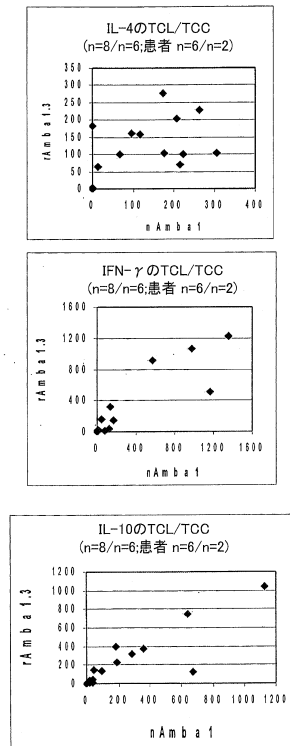
【 図 4 】



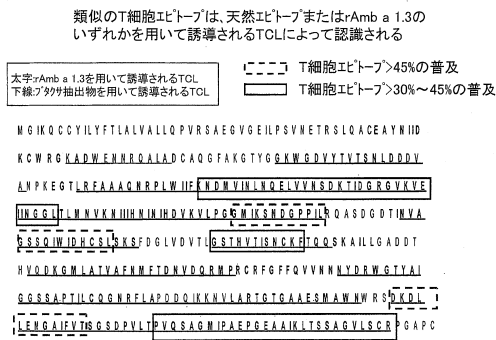
【 図 5 】



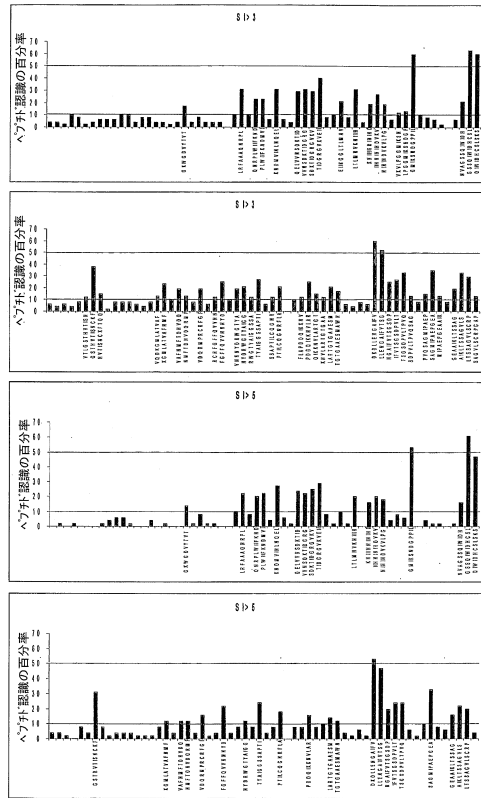
【 図 6 】



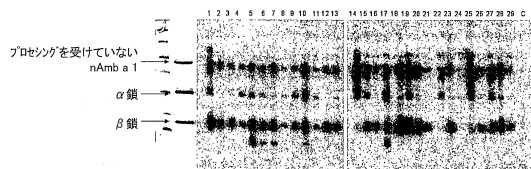
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



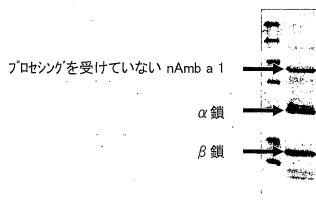
【 図 1 2 】

```

nAmb a 1 AFRGDDISTIGSSQ...
nAmb a 1 AFSAGSIIDAISSQ...
Amb a 1.1 AGSDGAIISIGSSQ...
Amb a 1.2 QSDGDTINVAGSSQ...
Amb a 1.3 QASDGTINVAGSSQ...
Amb a 1.4 XGSDGAIIGSSQ...
Amb a 2 HQSDGAIHVIGSSD...
  
```

Fig. 12

【 図 1 0 】



【 図 1 3 】

```

nAmb a 1 TSGAYNIIDGCRGKAD...
Amb a 1.1 ABDLQELP-VNSTR-LTSGAYNIIDGCRGKAD...
Amb a 1.2 ABDVEFLPSANSTRSLKACCAHNIIDKCRGKAD...
Amb a 1.3 AEGVGEILPSVNETR-SLQACEAYNIIDKCRGKAD...
Amb a 1.4 ABDLQILPSANSTR-SLTTCGTYNIIIDGCRGKAD...
Amb a 2 GRLGEEVDILPSPNDTRSL-GCAHNIIDKCRCKPD...
  
```

Fig. 13

【 図 1 1 】

```

nAmb a 1 TSGAYNIIDGCRGKAD...
Amb a 1.1 AZDLQELP-VNSTR-LTSGAYNIIDGCRGKAD...
Amb a 1.2 ABDVEFLPSANSTRSLKACCAHNIIDKCRGKAD...
Amb a 1.3 AEGVGEILPSVNETR-SLQACEAYNIIDKCRGKAD...
Amb a 1.4 ABDLQILPSANSTR-SLTTCGTYNIIIDGCRGKAD...
Amb a 2 GRLGEEVDILPSPNDTRSL-GCAHNIIDKCRCKPD...
  
```

Fig. 11

【 図 1 4 】

Amb a 1.1のアイフォーム(ジーンバンク受け入れ番号 M8058/M63116)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
AGTTLANGKNNVITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

Amb a 1.2のアイフォーム(ジーンバンク受け入れ番号 M80559/M62981)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
AGTTLANGKNNVITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

Amb a 1.3のアイフォーム(ジーンバンク受け入れ番号 C53240)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
AGTTLANGKNNVITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

Amb a 1.4のアイフォーム(ジーンバンク受け入れ番号 M80562)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TCGTYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
AKGTGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNMVMINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

Amb a 2のアイフォーム(ジーンバンク受け入れ番号 M80561)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TCGTYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
AKGTGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNMVMINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

【 図 1 6 】

a) 天然にプロセシングされた、推定されるAmb a 1.3のα鎖およびβ鎖

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

b) 天然のプロセシングに従って設計されたα鎖およびβ鎖

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

c) 変更されたα鎖およびβ鎖(バージョン1)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

d) 変更されたα鎖およびβ鎖(バージョン2)

MGIKHCCYLLYFTLALVLLQPVRSABDQELPVSNETRRLT TSGAYNIIDGCKWRGKADWENRQALADCAQGF
KGTVGGKWDVYVTSNLDLDDVANKPQKTLRFAAQNRPLWII FKNDMVINLQELVNSDKTIDGRGKVEII
NAGPAILNVMNVIITIHNIINHDVKNVPGGLIKBNDDPAAPR AGSDGDAISISGSSQIWIHDCSLSKSPDGLVDVTL
GSHVVTISNCKFTQSKAILLGGADDDTHVDKGMGLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFGFPQVNNVYDRWGTYAIGG
SSAPTLLCQGNRFLAPDDQIKKNVLRARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVOSAGMI PAEP
GAAIKLTSAGVLSGCPGAPC

【 図 1 5 】

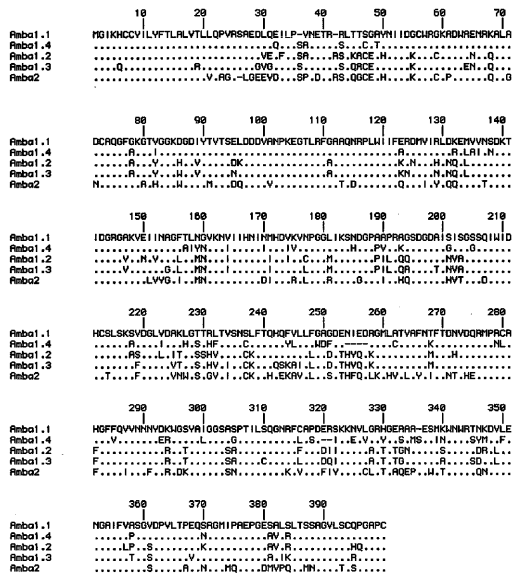
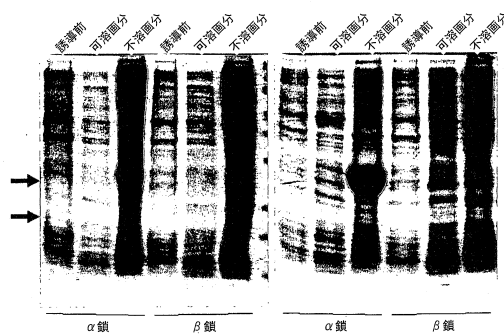


Fig. 15

【 図 1 6 】

【 図 1 7 】

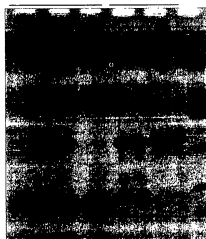
BL21 Rosetta-gami



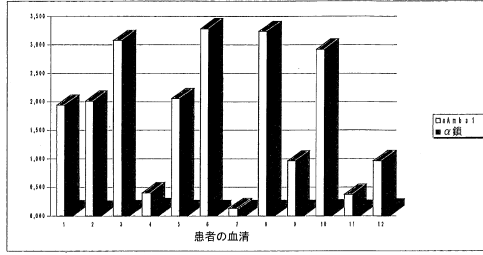
【 図 1 8 】

rAmb a 1.3

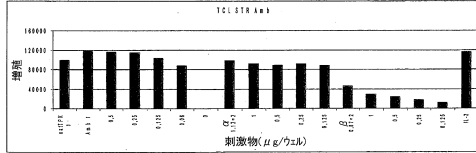
β鎖 α鎖 MWM



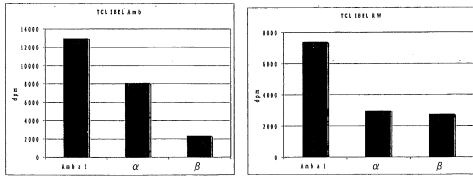
【図19】



【図20】



【図21】



【図22】

```

mgikqccyilyftlalvallqpvrSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYN
IIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGFAGKTYGGKMGDYYTTSNLDDDY
ANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIIFKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKV
EIIINGGLTLMNVKNIHNNIHDVVKVLPGGMIKSNDCPPILRQASDGD
TINVAGSSQIWIDHCSLSKSPDGLVDVTLGSTHVTISNCKFTQQSKAIL
LGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFRGFFQVNNNYDRWG
TYAIGGSSAPTILCQGNRFLAPDDQIKKNVLARTGTGAAESMAWNRSD
KDLENGAIFVTSGSDPVLTPVQSAGMIPAEPGEAAIKLTSSAGVLSR
PGAPC

```

mg...vrs - シグナルペプチド
AEG...DVK - β鎖
VLP...APC - α鎖

```

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYN
IIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGFAGKTYGGKMGDYYTTSNLDDDY
ANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIIFKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKV
EIIINGGLTLMNVKNIHNNIHDVVKVLPGGMIKSNDCPPILRQASDGD
TINVAGSSQIWIDHCSLSKSPDGLVDVTLGSTHVTISNCKFTQQSKAIL
LGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFRGFFQVNNNYDRWG
TYAIGGSSAPTILCQGNRFLAPDDQIKKNVLARTGTGAAESMAWNRSD
KDLENGAIFVTSGSDPVLTPVQSAGMIPAEPGEAAIKLTSSAGVLSR
PGAPC

```

小文字のペプチドは、10~20%の患者において陽性である
斜字体のペプチドは、21~30%の患者において陽性である
点線のペプチドは、31~40%の患者において陽性である
太字のペプチドは、50%を超える患者において陽性である

【配列表】

0005719512000001.app

フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08
- (72) 発明者 ヤン - シュミッド, ベアトリス
オーストリア, アー - 1 0 9 0 ヴィエンナ, ローテンロヴェンガッセ 1 0 / 1 6
- (72) 発明者 ヴォプフナー, ニコール
オーストリア, アー - 5 0 2 0 ザルツブルグ, クノ - ブランドアワーシュトラッセ 1 2
- (72) 発明者 シュミット, ゲオルグ
オーストリア, アー - 5 0 2 0 ザルツブルグ, マウラヒェルシュトラッセ 1 0 / 5 7
- (72) 発明者 エブナー, クリストフ
オーストリア, アー - 2 3 4 5 ブルン アム ゲビルゲ, ハインリッヒ - アルプレヒトガッセ
1 9 / 1

審査官 高山 敏充

- (56) 参考文献 国際公開第 9 6 / 0 1 3 5 8 9 (W O , A 1)
特許第 3 2 2 0 4 5 1 (J P , B 2)

- (58) 調査した分野 (Int . Cl . , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 9
R E G I S T R Y (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q

专利名称(译)	肽衍生自豚草 (Ambrosia artemis cifolia) 的主要过敏原及其用途		
公开(公告)号	JP5719512B2	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	JP2009549373	申请日	2008-02-13
[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		
当前申请(专利权)人(译)	Biomai股份公司		
[标]发明人	フェレイラファチマ ポーレバーバラ ヤンシュミッドベアトリス ヴォプフナーニコール シュミットゲオルグ エブナークリストフ		
发明人	フェレイラ,ファチマ ポーレ,バーバラ ヤン-シュミッド,ベアトリス ヴォプフナー,ニコール シュミット,ゲオルグ エブナー,クリストフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/415 A61K39/36 A61P37/08 G01N33/53 C07K7/08		
CPC分类号	C07K14/415 G01N33/6893 G01N2800/24 A61K39/36		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/415 A61K39/36 A61P37/08 G01N33/53.Q C07K7/08		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	2007102260 2007-02-13 EP		
其他公开文献	JP2010518813A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自豚草花粉过敏原Amb a 1的6至50个氨基酸残基的肽，包含上述肽的药物制剂及其用途。

アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列	アミノ酸位置	ペプチド番号 (配列番号)	配列
25-36	1	SAEGVGEILPSV	205-216	61	QIWIHDCSLSKS
28-39	2	GVGEILPSVNET	208-219	62	IDHCSLSKSFQD
31-42	3	EILPSVNETRSL	211-222	63	CSLSKSFQDGLVD
34-45	4	PSVNETRSLQAC	214-225	64	SKSFQDGLVDVTL
37-48	5	NETRSLQACEAY	217-228	65	FQDGLVDVTLGST
40-51	6	RSLQACEAYNIL	220-231	66	LVDVTLGSTHVT
43-54	7	QACEAYNIIDKC	223-234	67	VTLGSTHVTISN
46-57	8	EAYNIIDKCWRG	226-237	68	GSTHVTISNCKF
49-60	9	NIIDKCWRGKAD	229-240	69	HVTISNCKFTQG
52-63	10	DKCWRGKADWEN	232-243	70	ISNCKFTQGSKA
55-66	11	WRGKADWENNRQ	235-246	71	CKFTQGSKAILL
58-69	12	KADWENNRQALA	238-249	72	TQGSKAILLGAD
61-72	13	WENNRQALADCA	241-252	73	SKAILLGADDTHT
64-75	14	NRQALADCAQGF	244-255	74	ILLGADDTHTVGD
67-78	15	ALADCAQGFQAK	247-258	75	GADDTHTVGDQGM
70-81	16	DCAQGFQAKGTG	250-261	76	DHTVGDQGMLAT
73-84	17	QGFQAKGTGGKW	253-264	77	VQDKGMLATVAF
76-87	18	AKGTGGKWGDV	256-267	78	KGMLATVAFNMF
79-90	19	TYGKKGWGVYTV	259-270	79	LATVAFNMFITDN
82-93	20	QKWGDVYTVTSN	262-273	80	VAFNMFITDNVGD
85-96	21	GDVYTVTSNLLD	265-276	81	NMFITDNVQDRMP
88-99	22	YTVTSNLLDDVA	268-279	82	ITDNVQDRMPRCR
91-102	23	TSNLLDDVANPK	271-282	83	VDRMPRCRFFGF
94-105	24	LDDVANPKKGT	274-285	84	RMPRCRFFGFQV
97-108	25	DVANPKKGLRF	277-288	85	RCRFFGFQVNNN
100-111	26	NPKEGLRFAAA	280-291	86	FGFFQVNNNNYD
103-114	27	EGTLRFAAAGNR	283-294	87	FQVNNNNYDRWG
106-117	28	LRFAAAGNRPLW	286-297	88	VNNNNYDRWGTYA
109-120	29	AAAGNRPLWIF	289-300	89	NYDRWGTYAIGG
112-123	30	QNRPLWIFKND	292-303	90	RWGTYAIGGSSA
115-126	31	PLWIFKNDMVI	295-306	91	TYAIGGSSAPTI