

(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2004-532813

(P2004-532813A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/16</b>	C O 7 K 16/16 Z N A	4 C O 8 5
<b>A61K 39/00</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 H O 4 5
<b>A61K 39/36</b>	A 6 1 K 39/36	
<b>A61K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 V	
<b>A61P 37/00</b>	A 6 1 P 37/00	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-555117 (P2002-555117)	(71) 出願人	502043547 ファルマシア・ダイアグノステイクス・ア ー・ペー
(86) (22) 出願日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		スウェーデン国、エス-751 82・ウ ブサラ
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月27日 (2003.6.27)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(86) 国際出願番号	PCT/SE2001/002908	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(87) 国際公開番号	W02002/053595	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(31) 優先権主張番号	0004892-6	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 第2群アレルギーに特異的な I g E - F a b および I g G 分子ならびにそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、第2群アレルギーに特異的な I g E - F a b および完全な I g G 分子、ならびにそれらの使用に関する。より正確には、本発明は、イネ科植物の花粉に特異的な I g E - F a b ( P h l p 2 ) および試薬、ならびにこれらを含むキットおよびワクチンに関する。本発明はまた、特に I 型アレルギーの診断および治療および防止のための、第2群特異的な I g E - F a b および完全な I g G 分子の使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2 A から 2 B に示すアミノ酸配列またはその本質的に相同な変異体を有する、第 2 群アレルゲンに特異的なヒト I g E の F a b。

## 【請求項 2】

配列番号 1 A から 1 B に示す核酸配列またはその本質的に相同な変異体によってコードされている、第 2 群アレルゲンに特異的なヒト I g E の F a b。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の I g E の F a b の可変領域を含む第 2 群アレルゲンに特異的なヒト I g G。

10

## 【請求項 4】

P h l p 2 に対する、請求項 1 もしくは 2 に記載の I g E - F a b または請求項 3 に記載の I g G。

## 【請求項 5】

組換え製造される、請求項 1 から 2 もしくは 4 のいずれかに記載の I g E - F a b または請求項 3 もしくは 4 に記載の I g G。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の I g E - F a b ならびに / または I g G、ならびに / または対応する完全な抗体、ならびに / または前記の F a b および / もしくは抗体の修飾体を含む、診断試薬。

20

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の試薬を含む診断キット。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の I g E - F a b ならびに / または I g G、ならびに / または対応する完全な抗体、ならびに / または前記の F a b および / もしくは抗体の修飾体を含む I 型アレルギーに対するワクチン。

## 【請求項 9】

I 型アレルギーの受動的免疫療法のための、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の P h l p 2 に特異的な I g E - F a b および / または I g G または請求項 8 に記載のワクチンの使用。

30

## 【請求項 10】

I 型アレルギーを診断するための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の P h l p 2 に特異的な I g E - F a b および / または I g G または請求項 6 に記載の試薬の使用。

## 【請求項 11】

環境アレルゲンを検出するための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の P h l p 2 に特異的な I g E - F a b および / または I g G の使用。

## 【請求項 12】

アレルゲン抽出物を標準化するための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の P h l p 2 に特異的な I g E - F a b および / または I g G の使用。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、第 2 群アレルゲンに特異的な I g E - F a b およびその使用に関する。より詳しくは、本発明は、イネ科植物の花粉に特異的な I g E - F a b ( P h l p 2 ) および試薬、ならびにこれらを含むキットおよびワクチンに関する。本発明はまた、特に I 型アレルギーの診断および治療および防止のための第 2 群特異的 I g E - F a b の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

約 5 億人が、それ自体は無害な抗原 ( すなわち、アレルゲン ) に対する I g E 抗体が形成

50

されることに基づく遺伝的に決定された過敏性疾患である I 型アレルギーに罹っている ( 1 )。I 型アレルギーの様々な症状 ( アレルギー性鼻炎、結膜炎およびアレルギー性喘息 ) は、主として、エフェクター細胞に結合した特異的な I g E 抗体が架橋すること、そして続いて生物学的媒介因子 ( 例えば、ヒスタミン、ロイコトリエン類 ) が放出されることによって引き起こされる ( 2 )。

#### 【 0 0 0 3 】

イネ科植物およびトウモロコシは世界中に分布して、容易に空気中に漂う多量の花粉をもたらしており、従って最も重要なアレルゲン源に属する。40%を越えるアレルギー患者がイネ科植物の花粉アレルゲンに対して敏感になっており、その第 2 群アレルゲンが、最も頻りに認識されるアレルゲンの 1 つである ( 3、4 )。第 2 群アレルゲンは、約 10 k D a から 11 k D a の分子量を有する高度に相同なタンパク質として多くのイネ科植物種の花粉に存在する。イネ科植物花粉アレルギー者の約 70% は、種々のイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来する第 2 群アレルゲンの配列的および構造的および免疫学的な類似性のために、様々な第 2 群アレルギーに対して敏感になっている ( 5 ~ 7 )。オオアワガエリに由来する組換え P h l p 2 が、天然アレルゲンの性質と同等である免疫学的に活性な組換えタンパク質として製造されている ( 6 )。さらに、r P h l p 2 の三次元構造が、最近、N M R 分析によって決定されており、免疫グロブリン様ドメインの構造的特徴に類似していることが見出された ( 8 )。

10

#### 【 0 0 0 4 】

I 型アレルギーに特異的な治療は、基本的には、能動的な予防接種および受動的な予防接種により行うことができる。特異的な免疫療法が、能動的なワクチン接種により行われ、アレルゲンに対する非応答性が誘導される。特異的免疫療法の免疫学的機構は、1911 年から成功的に実施されているが、完全には理解されていない ( 9、10 )。考えられる機構として、I g E アレルゲンの相互作用を妨げる I g G クラスの阻止抗体の誘導、T 細胞およびエフェクター細胞の応答の調節、ならびに寛容性の生成が議論されている ( 11 )。能動的なワクチン接種とは対照的に、受動的なワクチン接種は、保護的な免疫グロブリンの移入に基づいており、多くの感染性疾患 ( 例えば、肝炎 ) に対する日常的な処置である。I 型アレルギーの処置に対する「受動的な予防接種」の治療効率は、60 年以上前の古典的な実験によって明らかにされている。1935 年に、C o o k e および共同研究者らは、特異的免疫療法による処置に成功した患者から得られた血液を輸血することによる花粉症患者の治療を報告した ( 12 )。その数年後、L o v e l e s s は、C o o k e により報告された保護的な効果は、阻止抗体によることを明らかにした ( 13 )。なぜ阻止抗体が I 型アレルギーの受動的治療に有用であり得るかについてはいくつか議論されている。第 1 に、I g E は、容易に競合し得る免疫グロブリンの最も重要性のない豊富なクラスである。第 2 に、アレルギー反応は、阻止抗体または I g E アレルゲン相互作用の他の競合因子を容易に適用することができ、全身適用の必要性がない標的器官 ( 鼻、眼、肺、皮膚 ) において生じている。しかしながら、I 型アレルギーの処置のために「受動的な予防接種の概念」を適用するためには、アレルゲンの特徴づけおよび抗体技術の分野での進歩が必要である。

20

30

#### 【 発明の開示 】

40

#### 【 0 0 0 5 】

( 発明の要旨 )

本発明は、I 型アレルギーの診断および免疫療法に好適なヒト I g E - F a b を提供する。

#### 【 0 0 0 6 】

第 1 の態様において、本発明は、配列番号 2 A から 2 B に示すアミノ酸配列またはその本質的に相同な変異体を有する、第 2 群アレルゲン ( すなわち、種々のイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来する花粉アレルゲン ) に特異的なヒト I g E の F a b を提供する。

#### 【 0 0 0 7 】

第 2 の態様において、本発明は、配列番号 1 A から 1 B に示す核酸配列またはその本質的

50

に相同な変異体によってコードされる、第2群アレルゲンに特異的なヒトIgEのFabを提供する。例えば、遺伝コードの縮重によって生じた変異体。本発明はまた、上記IgE Fabの可変領域を含む、第2群アレルゲンに特異的なヒトIgGを提供する。好ましくは、本発明の完全なIg分子はIgG1サブタイプである。本発明者らは、知られているベクターシステムを使用して、本発明のIgE Fabの可変領域をヒトIgG1につないだ。驚くべきことに、これらの完全なIgG1抗体は、Phl p2により誘導される患者好塩基球の脱顆粒を強く抑制する。このことは、臨床適用に対するそれらの可能性を示している。

【0008】

本発明によるIgE - Fabおよび/または完全なIgは、Phl p2（すなわち、オオアワガエリ由来の花粉）に対するものであるが、いくつかの他の花粉アレルゲンと交差反応する。本発明によるIgE - Fabおよび/または完全なIgは組換え製造することができる。

10

【0009】

第3の態様において、本発明は、本発明によるIgE - Fabおよび/または完全なIgを含む診断試薬に関する。あるいは、試薬は、対応する完全な抗体、および/または前記のFabおよび/または抗体の修飾体を含む。

【0010】

第4の態様において、本発明は、上記に示された試薬を含む診断キットに関する。キットは、免疫アッセイを行うための任意の従来のキットであり得る。

20

【0011】

第5の態様において、本発明は、本発明によるIgE - Fabおよび/または完全なIgを含む、I型アレルギーに対するワクチンに関する。

【0012】

本発明によるPhl p2に特異的なIgE - Fabおよび/または完全なIgならびにワクチンの好ましい使用は、I型アレルギーの受動的免疫療法のためである。この使用は予防目的または治療目的であり得る。

【0013】

本発明によるPhl p2に特異的なIgE - Fabおよび/または完全なIgの別の使用は、I型アレルギーを診断するためである。

30

【0014】

本発明によるPhl p2に特異的なIgE - Fabおよび/または完全なIgのさらなる使用は、環境アレルゲンを検出するためである。

【0015】

さらに、本発明によるPhl p2に特異的なIgE - Fabおよび/または完全なIgのさらなる使用は、アレルゲン抽出物を標準化するためである。

【0016】

IgEアレルゲンとの相互作用を妨げるヒト起源の特異的な競合因子を得るために、本発明者らはコンビナトリアルライブラリー技術(14)を使用した。IgEコンビナトリアルライブラリーをイネ科植物花粉アレルギー患者のリンパ球から構築した(15)。本発明は、第2群イネ科植物花粉アレルゲンに対して特異性を有するヒトIgE Fabを提供する。本発明のヒトIgE Fabは、その定常領域を有しておらず、従って、エフェクター細胞を活性化して、生物学的に活性な媒介因子を放出させることができない。第2群アレルゲンにおけるIgE Fabの結合部位が、主要なオオアワガエリ花粉アレルゲン(Phl p2)の組換えフラグメントを使用してマッピングされ、そしてIgE Fabと、種々のイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来する第2群アレルゲンとの交差反応性が調べられた。さらに、Phl p2に特異的なIgE Fabは、第2群アレルゲンを含有する花粉を粒子プロットングによって確認するために有用である。ELISA競合実験によって、イネ科植物花粉アレルギー患者のIgE抗体のPhl p2に対する結合をIgE Fabが阻止する能力が分析された。環境アレルゲン負荷の検出、診断

40

50

用および治療用のアレルゲン抽出物の標準化、ならびにイネ科植物花粉アレルギーの受動的治療のために組換え第2群特異的 I g E F a b が有用であることが議論される。

(発明の詳細な説明)

【0017】

材料および方法

生物学的材料、患者血清および抗体

ハルガヤ、オートムギ、ギョウギシバ、ライグラス、ヨシ、ハナガグサ、ライムギ、コムギおよびトウモロコシの花粉は、A l l e r g o n ( V a l i n g e、スウェーデン)から購入した。血清は、病歴、皮膚針試験、R A S Tによって、そして記載(16)されるような組換えイネ科植物花粉アレルゲンとの試験によって特徴づけられたイネ科植物花粉アレルギー患者から集めた。非アレルギー者の血清が陰性コントロールとして含まれた。<sup>1 2 5</sup> Iで標識された抗ヒトI g E抗体(R A S T)をP h a r m a c i a ( P h a r m a c i a & U p j o h n D i a g n o s t i c s A B、U p p s a l a、スウェーデン)から得た。

10

【0018】

大腸菌株X L 1 - B l u eは、S t r a t a g e n e ( L a J o l l a、C A)から入手し、プラスミドp C o m b 3 ( 1 7)の改変体であるプラスミドp C o m b 3 HをC a r l o s F . B a r b a s ( S c r i p p s ; L a J o l l a、C A)から譲り受けた。アルカリホスファターゼ結合のヤギ抗ヒトF a b抗血清およびヤギ抗マウスF a b抗血清は、P i e r c e ( R o c k f o r d、I L)から購入した。

20

【0019】

I g E F a bおよび軽鎖をコードするc D N Aの配列分析

P h l p 2に対して特異性を有する抗体フラグメントを発現する3つのファージクローンを、記載(15)されているようにr P h l p 2に対するパンニングによって単離した。3つのクローンはすべて、E L I S AによってP h l p 2特異的F a bの産生について、そして制限分析によって重鎖フラグメントおよび軽鎖をコードする正しいc D N Aの挿入について調べられ、その後、配列決定された。プラスミドD N Aは、Q i a g e n チップ(H i l d e n、ドイツ)を使用して組換え大腸菌X L - 1 B l u eから調製された。両方のD N A鎖を、プライマーウォーキング(18)によって、<sup>3 5</sup> S - d C T P ( D u P o n t N E N、S t e v e n a g e、英国)およびT 7ポリメラーゼ配列決定キット(P h a r m a c i a)を使用して配列決定した。配列決定用プライマーはM W G ( M W G A G - B i o t e c h、E b e r s b e r g、ドイツ)から得た。重鎖フラグメントおよび軽鎖のP h l p 2特異的なD N A配列は、V B a s e S e q u e n c e D i r e c t o r s ( T o m l i n s o nら、M R C C e n t r e f o r P r o t e i n E n g i n e e r i n g、C a m b r i d g e、英国)に寄託されている生殖系列配列と比較された。

30

【0020】

大腸菌におけるr P h l p 2特異的F a bの発現

r P h l p 2特異的F a bを発現するp C o m b 3 Hプラスミドを含有する大腸菌X L 1 - B l u e細胞を、50 μ g / m lのアンピシリンを含有するS B培地で、0.6 ~ 1のO. D. 600 nmまで37で増殖させた。1.5 mMのI P T Gによる誘導の後、細胞を32で4時間インキュベーションした。誘導後の大腸菌を4で20分間の5000 rpmでの遠心分離によって集め、上清をE L I S A分析のために-20で保存した。細胞を、1 mMのP M S Fを含有するP B Sに再懸濁し、ウルトラツラックス(I k a、S t a u f f e n、ドイツ)を用いてホモジネーションして、4で20分間、18,000 rpmで遠心分離した(抽出物)。抽出物を、記載(15)されるように、r P h l p 2の結合能力についてE L I S Aアッセイで試験した。

40

【0021】

ヒトI g E F a bの結合部位をマッピングするためのP h l p 2アレルゲンの組換えフラグメントの発現

50

- ガラクトシダーゼ融合の完全な P h l p 2 および様々な P h l p 2 フラグメントを発現するラムダ g t 1 1 ファージクローンを記載 ( 8 ) されるように作製した。大腸菌 Y 1 0 9 0 を、1 0 0 m g / l のアンピシリンを含有する L B 平板にコンフルエンスな生育層として平板培養した ( 1 9 ) 。1 0<sup>6</sup> プラーク形成単位を越える各ファージクローンを含有するファージ溶解物の 2 μ l 量を規定された順序で大腸菌生育層にドットして、プラークが見えるまで平板を 4 3 でインキュベーションした。組換えタンパク質の合成を、1 0 m M の I P T G に浸したニトロセルロースフィルター ( S c h l e i c h e r & S c h u e l l 、 D a s s e l 、 ドイツ ) をさらに 4 時間重ねることによって誘導した。I g E F a b と反応するクローンを免疫スクリーニングによって同定した。この目的のために、フィルターを、室温において、0 . 5 % ( w / v ) B S A を含有する T B S T で、5 分間にわたり 2 回、そして 3 0 分間にわたり 1 回洗浄し、その後、抗 P h l p 2 の F a b を含有する大腸菌抽出物とのプロービングを、そしてコントロール目的については空の p C o m b 3 H プラスミドで形質転換された大腸菌から得られた抽出物とのプロービングを 4 で一晩行った。洗浄後、F a b を、T B S T / 0 . 5 % ( w / v ) B S A で 1 : 5 0 0 0 希釈されたアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト F a b 抗血清を用いて検出した。

10

## 【 0 0 2 2 】

天然花粉抽出物の調製 ; 免疫プロットによる第 2 群アレルゲンの同定

それぞれのイネ科植物種およびトウモロコシ種の 1 0 0 m g の花粉を 5 m l の S D S サンプル緩衝液に別々に再懸濁して、ウルトラツラックス ( I K A 、 S t a u f f e n 、 ドイツ ) を用いて 1 分間ホモジネーションし、9 5 で 5 分間煮沸し、そして 1 4 5 0 0 r p m で 5 分間遠心分離して不溶物を除いた。その後、同じ量のタンパク質抽出物 ( 1 0 0 μ g / スロット ) を還元条件下での 1 4 % S D S - P A G E により分離して、クーマシーブリリアントブルーで染色するか、またはニトロセルロース ( S c h l e i c h e r & S c h u e l l ) にプロットした ( 2 0 ~ 2 2 ) 。

20

## 【 0 0 2 3 】

種々のイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来するプロットされた花粉抽出物を含有するニトロセルロースメンブランを、室温において、0 . 5 % ( w / v ) B S A を含有する T B S T で、5 分間にわたり 2 回、そして 3 0 分間にわたり 1 回ブロッキングし、その後、P h l p 2 特異的 I g E F a b を含有する細菌抽出物に 4 で一晩さらした。洗浄後、メンブランを、それぞれ、T B S T / 0 . 5 % ( w / v ) B S A で 1 : 5 0 0 0 希釈されたアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト F a b 抗血清とインキュベーションして、結合した F a b を検出した。

30

## 【 0 0 2 4 】

粒子プロット

ハルガヤ、オートムギ、ギョウギシバ、ライグラス、オオアワガエリ、ヨシ、ハナガグサ、ライムギ、コムギ、トウモロコシおよびカバノキ ( コントロール ) の花粉粒子を、爪楊枝を使用して、規定された順序でニトロセルロースメンブランに付けた。メンブランを、水に浸けた W h a t m a n 紙の上に半時間置き、アレルゲンを放出させた。放出されたタンパク質が、記載 ( 1 9 ) されるようにボンソー S ( B o e h r i n g e r 、 M a n n h e i m 、 ドイツ ) により検出された。第 2 群アレルゲンが、免疫プロットについて記載されているように、P h l p 2 特異的 I g E F a b により検出された。主要なカバノキ花粉アレルゲン ( B e t v 1 ) を放出する花粉粒子を同定するために、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウス F a b 抗血清 ( P i e r c e ) により検出される組換えマウス抗 B e t v 1 F a b が使用された。

40

## 【 0 0 2 5 】

I g E 競合実験

イネ科植物花粉アレルギー患者の I g E 抗体が P h l p 2 に結合することを阻害する P h l p 2 特異的 I g E F a b の能力を、免疫プロット競合実験によって調べた。等量のプロットされた r P h l p 2 ( 1 μ g / c m ) を含有するニトロセルロースのストリ

50

ップを、室温において、緩衝液A (0.5% (w/v) BSA、0.5% (v/v) ツイーン20および0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub>を含有する50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)で、5分間にわたり2回、そして30分間にわたり1回ブロッキングし、その後、Phl p2特異的IgE Fabを含有する細菌抽出物とのプレインキュベーションを、そしてコントロール目的については抗Phl p5のIgE Fabを含有する細菌抽出物とのプレインキュベーションを、(両方とも5μg/mlの濃度で)4で一晩行った。洗浄後、ストリップを、緩衝液Aで1:5希釈されたイネ科植物花粉アレルギー患者血清と4で一晩インキュベーションした。結合したIgE抗体を、125<sub>I</sub>で標識された抗ヒトIgE抗体(RAST、Pharmacia)を用いて検出し、結合したIgE抗体の量をガンマカウンター(1277Gammamaster、LKB、Wallac)でのガンマ計数によって定量した。すべての実験は二連として行われ、偏差は10%未満であり、結果は平均値を表す。IgE結合の阻害率が、競合するFabの存在下または非存在下で測定された平均cpm値から計算された。阻害率 =  $100 - \text{cpm Fab} \times 100 / \text{cpm コントロール}$ 。

10

## 【0026】

## 結果

結果が、添付された配列表および図面とともに下記において議論される。

## 【0027】

配列番号1。IgE FabのDNA配列比較。配列番号1Aは、クローン94の重鎖DNA配列と、クローン60およびクローン100の重鎖DNA配列とのアラインメントを示す。配列番号1Bは、3つの軽鎖cDNAの配列アラインメントを示す。XhoI部位およびScaI部位が斜体字で印刷される。骨格領域(FR1~FR4)および超可変領域(CDR1~CDR3)には印が付けられている。同一アミノ酸はダッシュにより示される。

20

## 【0028】

配列番号2。アミノ酸配列アラインメント。配列番号2Aは、3つのPhl p2特異的IgE Fab(クローン60、クローン94、クローン100)に由来する重鎖アミノ酸配列と、相同的なヒトIgMリウマトイド因子の重鎖のアミノ酸配列(アクセション番号: Y14936)とのアラインメントを示す。配列番号2Bは、IgE Fab由来の軽鎖と、抗Rh(D)抗体(AF044462)および2つのリウマトイド因子(S56199、S67059)に由来する3つの相同的軽鎖とのアミノ酸配列アラインメントを示す。骨格領域(FR1~FR4)および超可変領域(CDR1~CDR3)には印が付けられ、同一アミノ酸はダッシュにより示される。

30

## 【0029】

3つのPhl p2特異的IgE Fabは、種々の軽鎖で組み換えられている非常に関連する重鎖フラグメントを含有する: 自己抗体との配列相同性  
3つの重鎖フラグメント(クローン94、60、100)の骨格領域ならびに相補性決定領域は同じサイズであった。(配列番号1A)およびそれらのVH領域はVH4ファミリーのメンバー(例えば、アクセション番号: U71106; 23)と最大の類似性を示した。これらの3クローンの重鎖可変領域をコードするcDNAのアラインメントは、これらのクローンが数ヌクレオチドでのみ異なることを示している(クローン94対クローン60については342bpのうち27bp、8%; クローン94対クローン100については342bpのうち18bp、5%; クローン60対クローン100については342bpのうち9bp、3%)。ヌクレオチド交換は、骨格およびCDRを含む完全な可変領域全体に等しく分布していた(配列番号1A)。

40

## 【0030】

軽鎖cDNAの配列分析により、それらがカップファミリーに属することが明らかにされた。3つの軽鎖の配列比較により、重鎖間で認められるよりもはるかに大きい変化が示された(配列番号1B)。ヌクレオチド変化のほとんどがCDR1(9%から33%)およびCDR3(25%から33%)において認められた。

50

## 【0031】

3つの rPhl p2 特異的 IgE Fab クローンの重鎖フラグメントの可変領域の推定アミノ酸配列の比較が配列番号 2A に示す。クローン 60 およびクローン 100 は非常に類似している (95% の配列同一性) が、86% および 88% のよりゆるやかな配列同一性が、それぞれ、クローン 60 とクローン 94 との間およびクローン 94 とクローン 100 との間で認められた。少数のアミノ酸交換は、ときには保存的な交換ではなく、3つのクローンの骨格領域および相補性決定領域の全体に等しく分布していた (図 2A)。知られているヒト可変領域と比較し、驚くほどの配列類似性が、ヒト IgM リウマトイド因子 (アクセション番号: Y14936; 24) に対して見出された (図 2A)。IgE Fab およびリウマトイド因子の重鎖フラグメント間で配列および長さが完全に異なる CDR3 領域を除いて、比較するに値する配列同一性が、IgE Fab およびリウマトイド因子の4つの骨格領域のすべてについて、および CDR1 および CDR2 について見出された (配列番号 2A)。

10

## 【0032】

配列番号 2B は、3つのクローンの軽鎖の推定アミノ酸配列のアラインメントを示す。3つの軽鎖のアミノ酸配列は、かなりの配列変化を、特に CDR1 (27% から 46%) および CDR3 (56%) において示した。CDR2 領域は1つまたは2つのアミノ酸交換において異なるだけであり、そして骨格領域でもまた、少数のアミノ酸交換が認められるだけであった (FRW1 では 10% 未満、FRW2 では 14% 未満、FRW3 では 10% 未満) (配列番号 2B)。

20

## 【0033】

3つの IgE Fab に由来する軽鎖は、ヒト自己抗体、すなわち、ヒト抗 Rh (D) 抗体由来の自己抗体 (アクセション番号: AF044462; 25) および2つのヒトリウマトイド因子 (アクセション番号 S56199、同 S67059; 26、27) に由来する軽鎖との興味深いアミノ酸配列類似性を示した。

## 【0034】

IgE Fab の可変領域における体細胞変異は抗原により駆動される選択プロセスを示す

図 1A には、クローン 94 の重鎖フラグメントの可変領域の DNA 配列と、非常に関連する生殖系列配列 (アクセション番号: Z12365; V 遺伝子、FR1 ~ FR3; X97051; D 遺伝子、CDR3; X86355; J 遺伝子、CDR3 + FR4) (22 ~ 24) との比較が示される。合計で、本発明者らは 26 個のヌクレオチド交換を見出し、そのうちの 11% (10 / 93) が CDR において見出され、7% (16 / 243) が骨格領域において認められた。これらの変異のうち 5 つはサイレントであったが、18 個の変異はアミノ酸交換をもたらしていた。

30

## 【0035】

クローン 94 の軽鎖の可変領域 DNA 配列と、密接に関連する生殖系列配列 (アクセション番号: X93627; V 遺伝子、FR1 ~ CDR3; J00242; CDR3 + FR4; 25、26) との比較を図 1B に示す。本発明者らは 18 個のヌクレオチド交換を見出し、そのうちの 11% (9 / 81) が CDR に存在し、4% (9 / 228) が骨格領域に存在した。ほとんどの変異が CDR3 おいて見出された。

40

## 【0036】

Phl p2 の N 末端の 64 アミノ酸を含む組換えフラグメントは IgE Fab に対する結合部位を含有する

rPhl p2 特異的 IgE Fab に対する結合部位を決定するために、ニトロセルロースにドットされた完全な -gal 融合 rPhl p2 アレルゲン (96 アミノ酸)、最初の 64 アミノ酸部分 (1 ~ 64) を含む N 末端の rPhl p2 フラグメント、および 69 アミノ酸長の C 末端 rPhl p2 フラグメント (28 ~ 96 アミノ酸) を Fab にさらした (図 2A)。図 2B に、免疫グロブリンドメインに類似し、主にシート構造からなる完全な Phl p2 アレルゲンのリボン表示を示す。N 末端フラグメントおよび

50

C末端フラグメントがモデルに示されている(図2B)。これらの2つのフラグメントはI g E反応性ドメインとしてすでに同定されていたが、それよりも小さいフラグメントはI g E結合能を示さなかった(8)。クローン94について例示されるように、3つのP h l p 2特異的I g E F a bはすべて、完全なr P h l p 2(1)およびN末端のr P h l p 2フラグメント(2)を認識したが、C末端フラグメント(3)またはg t 1 1ファージのコントロールタンパク質(4)には結合しなかった(図2C)。空のp C o m b 3 Hプラスミドで形質転換された細菌から得られた細菌抽出物は、ドットされたタンパク質のいずれとも反応しなかった(図2C)。P h l p 2特異的I g E F a bと、以前に記載されたより小さいP h l p 2フラグメントとの非反応性(8)が認められた(データ示さず)。

#### 【0037】

抗P h l p 2のI g E F a bは、イネ科植物およびトウモロコシの7つの種に由来する天然の第2群アレルゲンと交差反応し、粒子プロットングによって第2群アレルゲン含有花粉を同定する

組換えヒトI g E F a bが種々のイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来する天然の第2群アレルゲンと交差反応するかどうかを調べるために、ニトロセルロースにプロットされた、いくつかのイネ科植物種およびトウモロコシ種に由来する天然花粉抽出物を試験した(図3)。I g E F a bは、ハルガヤ、ライグラス、ハナガグサ、ライムギおよびコムギにおいて第2群アレルゲンと強く反応した。弱い反応性がオートムギおよびヨシに関して認められただけであった。第2群アレルゲンを有しないこと、または低レベルの第2群アレルゲンを含有することが報告されている単子葉植物から得られた花粉抽出物との反応性は認められなかった(ギョウギシバ、トウモロコシ)(16)。

#### 【0038】

花粉アレルゲン負荷の環境測定が、現在、空気サンプリングおよび花粉形態学の分析によって行われている。本発明者らは、P h l p 2特異的F a bが、第2群アレルゲンを含有する花粉粒子を粒子プロットングによって免疫学的に同定するために使用できることを明らかにしている(図4)。10個の異なるイネ科植物種およびカバノキに由来する、メンブランに結合させた花粉粒子を、水和後、タンパク質を放出し、これらのタンパク質をボンソーSにより染色した(図4A)。P h l p 2特異的F a bにより、第2群アレルゲンを含有するイネ科植物花粉粒子だけが同定された(ハルガヤ、ライグラス、ハナガグサ、ライムギ、コムギおよびオートムギ)(図4B)。主要なカバノキ花粉アレルゲン(B e t v 1)に対する特異性を有するマウスF a bはカバノキ花粉のみと反応した。これにより、このアッセイの特異性が確認された(図4C)。

#### 【0039】

P h l p 2特異的I g E F a bはイネ科植物花粉アレルギー患者のI g E抗体のP h l p 2に対する結合を阻害する

表1には、P h l p 5特異的I g E F a b(コントロール)とのプレインキュベーションに対して、P h l p 2特異的I g E F a bとプレインキュベーションされたニトロセルロースプロットのr P h l p 2に対する、27名のイネ科植物花粉アレルギー患者から得られた血清のI g E結合の定量が示されている(表1)。14名の血清(52%)では、P h l p 2特異的I g E F a bとのプレインキュベーションにより、血清I g Eの結合が50%未満に低下した(表1)。10名の血清(38%)では、I g E結合の減少が30%から50%であり、残る3名の血清(10%)では、22%から29%のI g E結合の減少を達成することができた(表1)。52%の範囲におけるP h l p 2に対するI g E結合の平均阻害が、P h l p 2をP h l p 2特異的I g E F a bとプレインキュベーションしたときに達成された(表1)。

#### 【0040】

【表1】

10

20

30

40

表1. IgE Fabはアレルギー患者のIgEのPhl p2に対する結合を阻害する。27名のイネ科植物花粉アレルギー患者から得られた血清(#1~27)を、Phl p2特異的IgE Fab (A欄)またはコントロールタンパク質 (B欄)とプレインキュベーションされたニトロセルロースプロットのrPhl p2にさらした。結合したIgE抗体の量に対応するcpm値がA欄およびB欄に示される。第3欄には、IgE結合の阻害率が示される。IgE結合の平均阻害が第3欄の下に示される。

患者番号	cpm		減少率 (%)
	あり Phl p2特異的IgE Fabとの プレインキュベーション	なし との	
1	859.2	1389.4	38
2	406.5	2570.5	84
3	93.3	222.7	58
4	150.7	228.7	34
5	734.1	1222.8	40
6	895.5	4240	79
7	6482.3	17914.2	64
8	130.8	253.1	48
9	293.5	523.5	44
10	1508.4	4274.9	65
11	2238	4520.1	50
12	1088.5	1779.7	38
13	855.9	1423.7	40
14	194.6	313	38
15	252.4	1014.6	75
16	312.5	448.4	30
17	1350.3	3505.3	61
18	140.4	387.6	64
19	1343.3	3485.5	61
20	129	416.4	69
21	704.4	1161.7	39
22	122.5	173.5	29
23	1707.4	2360.6	28
24	600.6	2036.8	70
25	3495	4470.6	22
26	1128.9	3634.8	69
27	426.4	1323.2	68
平均 52			

10

20

30

50

## 【0041】

## 考察

本発明者らにより、非常に重要な環境アレルゲンの1つである主要オオアワガエリ花粉アレルゲン(Phl p2)に対して特異性を有する3つのヒトIgE抗体フラグメントの分子的および免疫学的な特徴づけが報告される。これらのIgE Fabは、イネ科植物花粉アレルギー患者のリンパ球から構築されたIgEコンビナトリアルライブラリーから、組換えPhl p2に対するパンニングによって単離された。配列分析により、3つの重鎖フラグメントはすべてがVH4ファミリーに属し、互いに密接に関連することが明らかにされた(23)。重鎖の変領域は、少数のアミノ酸配列変化が骨格領域および相補性決定領域の全体に等しく分布しているが、カッパ軽鎖は、関連性があまりなく、著しい配列変化をCDR1ドメインおよびCDR3ドメインにおいて示した。本発明者らは、主要なオオアワガエリ花粉アレルゲンに対して特異性を有するIgE Fabは、種々の軽鎖と組み換えられている同一の重鎖フラグメントからなることを既に以前に見出していた(15)。さらに、Phl p5特異的IgEの重鎖フラグメントは、異なる特異性を有する抗体に由来する軽鎖と組み換えることができるが、抗原特異性は保持されることが明らかにされている(15、LafferおよびValenta、未発表データ)。また、本発明者らの研究によれば、類似した重鎖フラグメントは、種々の軽鎖と組み換えること

ができるが、元のアレルゲンに対する特異性は保持されることが示される。本発明者らは、詳細には、本発明者らがコンビナトリアルライブラリー法によって単離したそのような重鎖および軽鎖の組合せが、ライブラリーの構築のために使用されたアレルギー患者において存在するという証拠を有していないが、後者の発見により、ある種のIgE抗体の特異性が重鎖によって決定され、そして軽鎖の無差別的な使用が、アレルゲン特異性を失うことなく可能であるという推測が裏づけられる。これに関連して、3つのIgE Fabのすべてが、Phl p 2のN末端の64アミノ酸を含む同じ組換えフラグメントに結合したことは注目される。

#### 【0042】

Phl p 2特異的IgE Fabの重鎖フラグメントならびに軽鎖と、ヒト自己抗体（リウマトイド因子、抗Rh(D)抗体）との密接な配列類似性は、Phl p 2の最近決定された三次元構造が、ヒトに存在する免疫グロブリン様ドメインとの予想外の類似性を示したという事実（8）の観点から、注目される。これまでのところ、本発明者らは、IgE Fabがヒトタンパク質と反応し得るという証拠を有していないが、様々なイネ科植物種およびトウモロコシ種から得られた花粉抽出物を用いて試験したとき、本発明者らは、第2群アレルゲンとの広範囲の交差反応性を見出した。従って、組換えPhl p 2特異的IgE Fabは、環境中の第2群アレルゲンの負荷量を測定するために使用することができ、従って、予防的処置のために有用であると考えられる。さらに、組換えPhl p 2特異的IgE Fabは、イネ科植物アレルギーの診断および処置のために現在使用されている天然アレルゲン抽出物における第2群アレルギーの測定および標準化のために使用することができる。Phl p 2特異的IgE FabがPhl p 2の主要なエピトープ含有ドメインと反応して、イネ科植物花粉アレルギー患者（n = 27）の完全なIgE抗体のPhl p 2に対する結合を強く阻害した（52%の平均阻害）という本発明者らの発見は、これらのFabの治療的可能性を示している。これらのFabがアトピーの標的器官における上皮細胞または抗原提示細胞に結合し得る場合、侵入するアレルゲンに対する安定した防御線を築くこと、そしておそらくはエフェクター細胞を活性化することなく、抗原提示細胞のタンパク質分解性区画内に直接Fabを差し向けることさえ可能になり得る。後者の方法は、タンパク質分解を介してアレルゲンを不活性化し得るだけでなく、予防的な粘膜免疫性の誘導のためにも有用であり得る。

#### 【0043】

#### 【表2】

10

20

30

## 参考文献

1. Kay, A.B. (1997). *Allergy and Allergic Diseases*, Blackwell Science, Oxford, U.K.
2. Segal, D.M., Taurog, J.D., and Metzger H. (1977). Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **42**, 457-467
3. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G. (1989). Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* **264**, 11181-11185.
4. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G (1989). Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: comparison with known Lol p I and Lol p II sequences. *Biochem.* **28**, 8665-8670. 10
5. Sidoli, A., Tamborini, E., Giuntini, I., Levi, S., Volonte, G., Painsi, C., DeLalla, C., Siccardi, A.G., Baralle, F.E., Galliani, S., et al. (1993). Cloning, expression and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* **268**, 21819-21825.
6. Dolecek, C., Vrtala, S., Laffer, S., Steinberger, P., Kraft, D., Scheiner, O., and Valenta, R. (1993). Molecular characterization of *Phl p* II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* **335**, 299-304 20
7. Roberts, A.M., Bevan, L.J., Flora, P.S., Jepson, I., and Walker, M.R. (1993). Nucleotide sequence of cDNA encoding the group II allergen of cocksfoot/orchard grass (*Dactylis glomerata*), *Dac g* II. *Allergy* **48**, 615-623.
8. De Marino, S., Castiglione Morelli, M.A., Fraternali, F., Tamborini, E., Musco, G., Vrtala, S., Dolecek, C., Arosio, P., Valenta, R., and Pastore, A. (1999). An immunoglobuline-like fold in a major plant allergen: The solution structure of *Phl p* 2 from timothy grass pollen. *Structure* **7**, 943-952 30
9. Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* **1**, 1572-1573

10. Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J., and the WHO panel members.(1998). Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 558-562.
11. Durham, and S.R., Till, S.J. (1998). Immunological changes associated with allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 157-164.
12. Cooke, R.A., Bernhard J.H., Hebal, S., and Stull, A. (1935). Serological evidence of immunity with co-existing sensitization in hay fever type of human allergy. *J. Exp. Med.* **62**, 733-750
13. Loveless, M.H. (1940). Immunological studies of pollinosis: I. The presence of 2 antibodies related to the same pollen-allergen in the serum of treated hay fever patients. *J. Immunol.* **38**, 25-50.
14. Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A. Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D., Benkovic, S.J., and Lerner R.A. (1989). generation of a large repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275-1281.
15. Steinberger, P., Kraft, D., and Valenta, R. (1996). Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. *J. Biol. Chem.* **271**, 10967-10972
16. Niederberger, V., Laffer, S., Fröschl, R., Kraft, D., Rumpold, H., Kapiotis, S., Valenta, R., and Spitzauer, S. (1998). IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 258-264
17. Barbas, C.F., III, Kang, A.S., Lerner, R.A., and Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7978-7982
18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
19. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

10

20

30

20. Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
21. Fling, S.P., and Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity Tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88
22. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354 10
23. Fais, F., Sellars, B., Ghiotto F., Yan, X.J., Dono, M., Allen, S.L., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S., Schulman, P., Schuster, M., Vinciguerra, V., Rai, K., Stevenson, F.K., Gregersen, P.K., Ferranini, M., and Chiarazzi, N. (1996). Examples of *in vivo* isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 1659-1666
24. Williams, D.G., Mayes, S.P., and Mageed R.A. (1999). Rheumatoid factors isotype switch and somatic mutation variants within rheumatoid arthritis synovium. *Immunol.* **98**, 123-136 20
25. Siegel, D.L., Chang, T.Y., Russell, S.L., and Bunya, V.Y. (1997). Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J. Immunol. Methods* **206**, 73-85
26. Ermel, R.W., Kenny, T.P., Chen, P.P., and Robbins, D.L. (1993). Molecular analysis of rheumatoid factors derived from rheumatoid synovium suggests an antigen-driven response in inflamed joints. *Arthritis Rheum.* **36**, 380-388 30
27. Martin, T., Crouzier, R., Blaison, G., Levallois, H., and Pasquali, J.L. (1993). A minor group of rheumatoid factors isolated from a patient with rheumatoid arthritis is derived from somatically mutated V $\kappa$ 1 genes further evidence that

- rheumatoid factors during autoimmune diseases undergo an antigen driven maturation. *Autoimmun.* **15**, 163-170
28. Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M. B., and Winter, G. (1992). The repertoire of human VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **227**, 776-798
29. Ravetch, J. V., Siebenlist, U., Karsmeyer, S., Waldmann, T., and Leder, P. (1981). Structure of human immunoglobulin mu locus: Characterization of embryonic and rearranged J+ D genes. *Cell* **27**, 583-591
30. Mattila, P.S., Schugk, J., Wu, H., and Makela, O. (1995). Extensive allelic sequence variation in the J region of the human immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2578-2582
31. Cox, J.P., Tomlinson, I.M., and Winter, G. (1994). A directory of human germline V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur. J. Immunol.* **24**, 827-836.
32. Hieter, P.A., Maizel, J. V. Jr., and Leder, P. (1982). Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes. *J. Biol. Chem.* **257**, 1516-1522

10

20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0044】

【図1A】クローン94の、密接に関連する生殖系列配列（アクセション番号が左端に印刷されている）との可変重鎖DNA配列の比較である。CDRおよびFRの位置が示されている。ヌクレオチドはアミノ酸コードのトリプレットでグループ化されており、同一ヌクレオチドはダッシュによって示されている。

【図1B】クローン94の、密接に関連する生殖系列配列（アクセション番号が左端に印刷されている）との可変軽鎖DNA配列の比較である。CDRおよびFRの位置が示されている。ヌクレオチドはアミノ酸コードのトリプレットでグループ化されており、同一ヌクレオチドはダッシュによって示されている。

30

【図2A】図2は、Ph1 p2アレルゲンにおけるPh1 p2特異的ヒトIgE Fabの結合部位のマッピングを示す。N末端の64アミノ酸およびC末端の69アミノ酸を含む組換えPh1 p2フラグメントの概略（図2A）。

【図2B】図2は、Ph1 p2アレルゲンにおけるPh1 p2特異的ヒトIgE Fabの結合部位のマッピングを示す。図2Bは、N末端フラグメントおよびC末端フラグメントが示されるPh1 p2アレルゲンの三次元構造のリボン表示を示す。

【図2C】図2は、Ph1 p2アレルゲンにおけるPh1 p2特異的ヒトIgE Fabの結合部位のマッピングを示す。図2Cは、完全なrPh1 p2(1)、N末端のPh1 p2由来フラグメント(2)、C末端のPh1 p2由来フラグメント(3)および-gal単独(4)を含有するニトロセルロースフィルターに対するクローン94由来のIgE Fabの結合を示す。コントロール目的のために、フィルターに結合したクローンは、空のプラスミド(pComb3H)で形質転換された細菌の抽出物にさらされた。

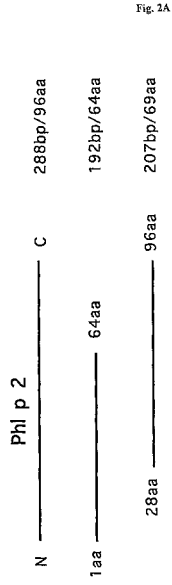
40

【図3】図3は、rPh1 p2特異的IgE Fabが、種々のイネ科植物に由来する天然の第2群アレルゲンと交差反応することを示す。rPh1 p2特異的IgE Fabが、ニトロセルロースにプロットされたイネ科植物花粉抽出物との反応性について試験された(Anto: ハルガヤ; Aves: オートムギ; Cyn d: ギョウギシバ;

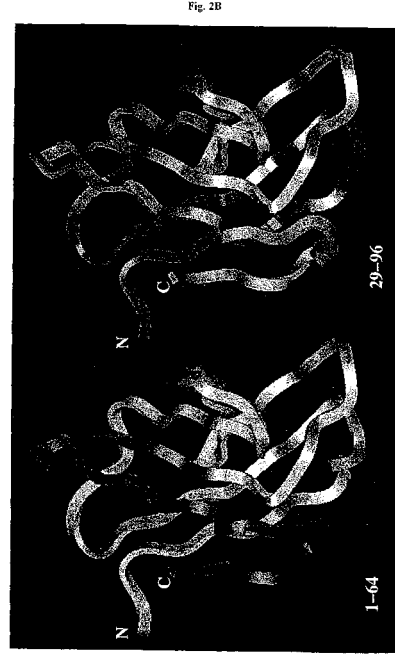
50



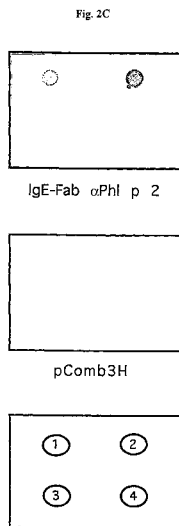
【 2 A 】



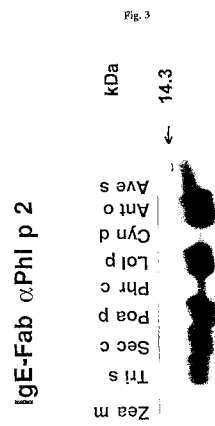
【 2 B 】



【 2 C 】

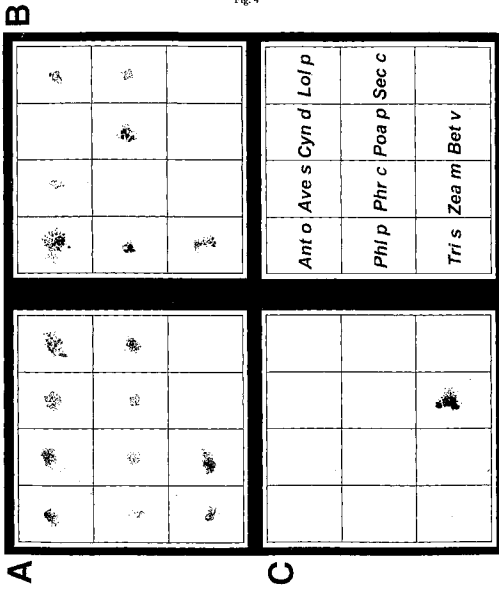


【 3 】



【 図 4 】

Fig. 4



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/053595 A1(51) International Patent Classification: C07K 16/16, (74) Agent: DR LUDWIG BRANN PATENTBYRÅ AB; Box  
A61K 39/395, 39/36, G01N 33/563, 33/564 1344, S-751 43 Uppsala (SE).(21) International Application Number: PCT/SE01/02908 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AT  
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,  
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE  
(utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:  
27 December 2001 (27.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
0004892-6 29 December 2000 (29.12.2000) SE(71) Applicant (for all designated States except US): PHAR-  
MACIA DIAGNOSTICS AB [SE/SE]; S-751 82 Uppsala (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FLICKER, Sabine [AT/AT]; Speichergasse 44/27, A-1160 Vienna (AT).  
STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Wilhelmstrasse 93/4/2, A-1160 Vienna (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Vienna (AT). VA-  
LENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/053595 A1

(54) Title: GROUP 2 ALLERGEN SPECIFIC IGE-FABS AND IGG MOLECULES AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to group 2 allergen specific IgE-Fabs and whole Ig molecules as well as use thereof. More precisely, the present invention relates to grass pollen specific IgE-Fabs (Phi p2) and reagents, kits and vaccines comprising these. The invention also relates to use of group 2 specific IgE-Fabs and whole Ig for, inter alia, diagnosis, therapy and prevention of type I allergy.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

1

## GROUP 2 ALLERGEN SPECIFIC IGE-FABS AND IGG MOLECULES AND USE THEREOF

**Field of the invention**

The present invention relates to group 2 allergen specific IgE-Fabs and use thereof. More precisely, the present invention relates to grass pollen specific IgE-Fabs (Phl p2) and reagents, kits and vaccines comprising these. The invention also relates to use of group 2 specific IgE-Fabs for, inter alia, diagnosis, therapy and prevention of type I allergy.

**Background of the invention**

Almost 500 million individuals suffer from Type I allergy, a genetically determined hypersensitivity disease which is based on the formation of IgE antibodies against *per se* harmless antigens (i. e., allergens) (1). The symptoms of Type allergy (allergic rhinitis, conjunctivitis and allergic asthma) are mainly caused by the crosslinking of effector-cell bound specific IgE antibodies and the consecutive release of biological mediators (e.g., histamine, leukotriens) (2).

Grasses and corn are distributed worldwide, produce large amounts of pollen which become easily airborne and therefore belong to the most important allergen sources. More than 40% of allergic patients are sensitized against grass pollen allergens of which group 2 allergens represent one of the most frequently recognized allergens (3, 4). Group 2 allergens occur in pollen of many grass species as highly homologous proteins with a molecular weight of approximately 10-11 kDa. Approximately 70% of grass pollen allergic people are cross-sensitized to group 2 allergens which is due to sequence, structural, and immunological similarities of group 2 allergens from different grass and corn species (5-7). Recombinant Phl p 2 from timothy grass has been produced as immunologically active recombinant protein which equals the properties of the natural allergen (8). Moreover the three dimensional

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

2

structure of rPhi p 2 has been recently determined by NMR analysis and was found to resemble structural features of an immunoglobulin-like domain (8).

Specific therapy of Type I allergy can be achieved in principle by active and passive vaccination. Active vaccination is achieved by specific immunotherapy in order to induce unresponsiveness towards allergens. Although successfully practised since 1911, the immunologically mechanisms of specific immunotherapy are not completely understood (9, 10). Induction of blocking antibodies of the IgG class which interfere with the IgE allergen interaction, modulation of T cell and effector cell responses and generation of tolerance are discussed as possible mechanisms (11). In contrast to active vaccination, passive vaccination is based on the transfer of protective immunoglobulins and represents a routine treatment for many infectious diseases (e.g., hepatitis). The therapeutical efficacy of "passive vaccination" for the treatment of Type I allergy has been demonstrated by classical experiments more than 60 years ago. In 1935 Cooke and colleagues reported cure of a hayfever patient by transfer of blood from a patient who had been successfully treated by specific immunotherapy (12). A few years later Loveless showed that the protective effects reported by Cooke are due to blocking antibodies (13). There are several arguments why blocking antibodies may be useful for passive therapy of Type I allergy. First, IgE is the least abundant class of immunoglobulins which could be easily competed. Second, allergic reactions occur in target organs (nose, eyes, lung, skin) where it would be easy to apply blocking antibodies or other competitors of the IgE-allergen interaction avoiding the need of systemic application. The application of the "passive vaccination concept" for treatment of Type I allergy requires however progress in the field of allergen characterization and antibody technology.

#### **Summary of the invention**

The present invention provides human IgE-Fabs suitable for diagnosis and immunotherapy of type I allergy.

WO 02/053595

PCT/SE01/02598

3

In a first aspect, the invention provides group 2 allergen (i.e. pollen allergen from different grass and corn species) specific human IgE Fabs having the amino acid sequences as shown in SEQ ID No 2A-B or essentially homologous variants thereof.

In a second aspect, the invention provides group 2 allergen specific human IgE Fabs encoded by the nucleic acid sequences as shown in SEQ ID No 1A-B or essentially homologous variants thereof. For example, variants caused by the degeneracy of the genetic code. The present invention also provides group 2 allergen specific human IgG comprising the variable regions of the above IgE Fabs. Preferably, the whole Ig molecules of the invention are of IgG1 subtype. The present inventors have grafted variable regions of the IgE Fabs of the invention onto human IgG1 using a known vector system. Surprisingly, these complete IgG1 antibodies strongly suppress Phl p2-induced degranulation of patients basophils which indicates their potential for clinical application.

The IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention are directed against Phl p 2, i.e. pollen from timothy grass but cross-react with several other pollen allergens.

The IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention may be recombinantly produced.

In a third aspect, the invention relates to a diagnostic reagent comprising the IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention. Alternatively the reagent comprises the corresponding complete antibodies, and/or modified versions of said Fabs and/or antibodies.

In a fourth aspect, the invention relates to a diagnostic kit comprising the reagent mentioned above. The kit may be any conventional kit for performing an immunoassay.

In a fifth aspect, the invention relates to a vaccine against type I allergy, comprising the IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

4

A preferred use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or whole Ig and the vaccine according to the invention is for passive immunotherapy of type I allergy. The use may be in preventive or therapeutic purpose.

Another use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention is for diagnosing of type I allergy.

A further use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention is for environmental allergen detection.

Yet a further use of f Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or whole Ig according to the invention is for standardization of allergen extracts.

In order to obtain specific competitors of human origin which interfere with the IgE allergen interaction the inventors used the combinatorial library technique (14). An IgE combinatorial library was constructed from lymphocytes of a grass pollen allergic patient (15). The present invention provides human IgE Fabs with specificity for group 2 grass pollen allergens. The human IgE Fabs lack their constant region and therefore cannot activate effector cells to release biologically active mediators. The binding site of the IgE Fabs on group 2 allergens were mapped using recombinant fragments of the major timothy grass pollen allergen Phl p 2 and the crossreactivity of the IgE Fabs with group 2 allergens from different grass and corn species was investigated. Furthermore the Phl p 2-specific IgE Fabs are useful for the identification of group 2 allergen-containing pollen by particle blotting. By ELISA competition experiments, the ability of the IgE Fabs to block binding of grass pollen allergic patients IgE antibodies to Phl p 2 was analyzed. The usefulness of the recombinant group 2-specific IgE Fabs for the detection of environmental allergen loads, the standardization of diagnostic and therapeutic allergen extracts and for passive therapy of grass pollen allergy are discussed.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

5

**Detailed description of the invention****MATERIALS AND METHODS****Biological materials, patients sera, antibodies**

Pollen from sweet vernal grass, oat, Bermuda grass, rye grass, common reed, Kentucky Bluegrass, rye, wheat and maize were purchased from Allergon (Vålinge, Sweden). Sera were collected from grass pollen-allergic patients who were characterized by case history, skin prick testing, RAST, and by testing with recombinant grass pollen allergens as described (16). Sera from non allergic individuals were included as negative controls. <sup>125</sup>I-labeled anti-human IgE antibodies (RAST) were obtained from Pharmacia (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

*E. coli* strain XL1-Blue was obtained from Stratagene (La Jolla, CA), and plasmid pComb3H representing a modification of plasmid pComb3 (17) was kindly provided by Carlos F. Barbas, Scripps (LaJolla, CA). Alkaline phosphatase-coupled goat anti-human Fab and goat anti-mouse Fab antisera were purchased from Pierce (Rockford, IL).

**Sequence analysis of the cDNAs coding for IgE Fds and light chains**

Three phage clones expressing antibody fragments with specificity for Phl p 2 were isolated by panning to rPhl p 2 as described (15). All three clones were checked for the production of Phl p 2-specific Fabs by ELISA and for the correct insertion of cDNAs coding for the heavy chain fragments and the light chains by restriction analysis before sequencing. Plasmid DNA was prepared from recombinant *E. coli* XL-1 Blue using Qiagen tips (Hilden, Germany). Both DNA strands were sequenced using <sup>35</sup>S-dCTP (DuPont NEN, Stevenage, UK) and a T7 polymerase sequencing kit (Pharmacia) by primer walking (18). Sequencing primers were obtained from MWG (MWG AG- Biotech, Ebersberg, Germany). The Phl p 2-specific DNA sequences of the heavy chain fragments and the light chains were compared with the germline sequences deposited in the V Base Sequence Directors (Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK).

WO 02/053595

PCT/SE01/02598

6

**Expression of rPhl p 2-specific Fabs in *E.coli***

*E.coli* XL1-Blue cells containing the rPhl p 2-specific Fab expressing pComb3H plasmids were grown in SB medium containing 50 µg/ml ampicillin at 37 °C up to O.D. 600nm 0.6-1. After induction with 1.5 mM IPTG, cells were incubated for four hours at 32°C. Induced *E.coli* were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4 °C and supernatants were stored at -20 °C for ELISA analysis. Cells were resuspended in PBS containing 1 mM PMSF, homogenized with an ultraturrax (Ika, Stauffen, Germany) and centrifuged at 18,000 rpm for 20 min at 4 °C (extract). The extracts were tested in ELISA assays for their binding capacity to rPhl p 2 as described (15).

**Expression of recombinant fragments of the Phl p 2 allergen for mapping of the binding sites of the human IgE Fabs**

Lambda gt11 phage clones expressing β-galactosidase fused complete Phl p 2 and Phl p 2 fragments were generated as described (8). *E.coli* Y1090 were plated as confluent lawn onto LB plates containing 100mg/l ampicillin (19). Two µl aliquots of phage lysates containing > 10<sup>6</sup> plaque-forming units of each phage clone were dotted onto the *E. coli* lawn in defined order and plates were incubated at 43°C until plaques became visible. The synthesis of recombinant protein was induced by overlay with 10 mM IPTG-soaked nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) for additional 4 hours. The clones which reacted with the IgE Fabs were identified by immunoscreening. For this purpose filters were washed twice for 5 min and once for 30 min with TBST containing 0.5% w/v BSA at roomtemperature and then probed overnight with *E. coli* extracts containing anti-Phl p 2 Fab and, for control purposes, with extracts from *E. coli* transformed with the empty pComb 3H plasmid at 4 °C. After washing, the Fabs were detected with an alkaline phosphatase-coupled goat anti-human Fab antiserum diluted 1:5000 in TBST/0.5% w/v BSA.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

7

**Preparation of natural pollen extracts; identification of group 2 allergens by immunoblotting**

Hundred mg of pollen of each grass and corn species were resuspended separately in 5 ml SDS-sample buffer and homogenized with an ultraturrax (IKA, Stauffen, Germany) for 1 min, boiled for 5 min at 95 °C and centrifuged with 14500 rpm for 5 min to remove insoluble materials. Comparable amounts of protein extracts (100 µg/slot) were then separated by a 14% SDS-PAGE under reducing conditions, stained with Coomassie Brilliant Blue or blotted onto nitrocellulose (Schleicher & Schuell) (20-22).

Nitrocellulose membranes containing blotted pollen extracts from the different grass and corn species were blocked twice for 5 min and once for 30 min with TBST containing 0.5% w/v BSA at roomtemperature and then exposed overnight with bacterial extracts containing Phl p 2-specific IgE Fabs at 4 °C. After washing, membranes were incubated with an alkaline phosphatase-coupled goat anti-human Fab antiserum diluted 1:5000 in TBST/0.5% w/v BSA, respectively to detect bound Fabs.

**Particle blotting**

Pollen grains from sweet vernal grass, oat, Bermuda grass, rye grass, timothy grass, common reed, Kentucky Bluegrass, rye, wheat, maize and birch (control) were applied to a nitrocellulose membrane in defined order using toothpicks. Membrans were placed on water-soaked Whatman paper for half an hour to allow the release of allergens. Released proteins were detected with Ponceau S (Boehringer, Mannheim, Germany) as described (19). Group 2 allergens were detected with Phl p 2-specific IgE Fabsas described for the immunoblotting. For the identification of pollen grains releasing the major birch pollen allergen Bet v 1 a recombinant mouse anti-Bet v 1 Fab was used which was detected with an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse Fab antiserum (Pierce).

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

8

**IgE competition experiments**

The ability of Phl p 2-specific IgE Fabs to inhibit the binding of grass pollen allergic patients IgE antibodies to Phl p 2 was studied by immunoblot competition experiments. Nitrocellulose strips containing equal aliquots of blotted rPhl p 2 (1 µg/cm) were blocked twice for 5 min and once for 30 min in buffer A (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.5% w/v BSA, 0.5% v/v Tween 20 and 0.05% w/v NaN<sub>3</sub>) at roomtemperature and then preincubated overnight with bacterial extracts containing Phl p 2 specific IgE Fabs and, for control purposes, with bacterial extracts containing an anti-Phl p 5 IgE Fabs (both at a concentration 5 µg/ml) at 4 °C. After washing, strips were incubated overnight with sera from grass pollen allergic patients diluted 1: 5 in buffer A at 4°C. Bound IgE antibodies were detected with <sup>125</sup>I-labeled anti-human IgE antibodies (RAST, Pharmacia) and the amount of bound IgE antibodies was quantified by gamma-counting in a gamma counter (1277 Gammamaster, LKB, Wallac). All experiments were performed as duplicates with variations of less than 10% and results represent mean values. The percentage inhibition of IgE binding was calculated from the mean cpm value measured with or without addition of competing Fab. Percentage inhibition =  $100 - \frac{\text{cpm}_{\text{Fab}}}{\text{cpm}_{\text{control}}} \times 100$ .

**RESULTS**

The results will be discussed below in association with the accompanying sequence listing and drawings:

**SEQ ID NO 1.** DNA sequence comparison of the IgE Fabs. SEQ ID NO 1A shows the alignment of the clone 94 heavy chain DNA sequence with those of clones 60 and 100. SEQ ID NO 1B displays the sequence alignment of the three light chain cDNAs. The Xho I and the Sac I sites are printed in italics. Framework (FR1-FR4) and hypervariable (CDR1-CDR3) regions are labeled. Identical amino acids are indicated by dashes.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

9

**SEQ ID NO 2.** Amino acid sequence alignment. SEQ ID NO 2A shows the alignment of the heavy chain amino acid sequences derived from three Phl p 2-specific IgE Fabs (clones 80, 94, 100) and that of the heavy chain of a homologous human IgM rheumatoid factor (accession number: Y14936). SEQ ID NO 2B displays the amino acid sequence alignment of the IgE Fab-derived light chains and three homologous light chains from an anti-Rh (D) antibody (AF044462) and two rheumatoid factors (S56199, S67059). The framework (FR1-FR4) and hypervariable (CDR1-CDR3) regions are labeled and identical amino acids are indicated by dashes.

**Figure 1.** Comparison of the variable heavy chain (Fig. 1A) and light chain (Fig. 1B) DNA sequence of clone 94 with the closest related germline sequences (accession numbers are printed on the left margins). The positions of the CDRs and FRs are indicated. Nucleotides are grouped in aa-encoding triplets and identical nucleotides are displayed by dashes.

**Figure 2.** Mapping of the binding site of the Phl p 2-specific human IgE Fab on the Phl p 2 allergen. Overview of the recombinant Phl p 2 fragments comprising the N-terminal 64 amino acids and the C-terminal 69 amino acids (Figure 2A). Figure 2B shows a ribbon representation of the three-dimensional structure of the Phl p 2 allergen in which the N-terminal and C-terminal fragment has been indicated. Figure 2C: Binding of the clone 94-derived IgE Fab to nitrocellulose filters containing complete rPhl p 2 (1), the N-terminal (2), C-terminal (3) Phl p 2-derived fragments and  $\beta$ -gal alone (4). For control purposes, filter-bound clones were exposed to bacterial extracts from *E. coli* transformed with empty plasmid (pComb3H).

**Figure 3.** rPhl p 2-specific IgE-Fabs crossreact with natural group 2 allergens from different grasses. rPhl p 2-specific IgE Fabs were tested for reactivity with nitrocellulose-blotted grass pollen extracts (Ant o: sweet vernal grass; Ave s: oat; Cyn d: Bermuda grass; Lol p: rye grass; Phr c: common reed; Poa p: Kentucky Blue grass; Sec c: rye; Tri s: wheat; Zea m:

WO 02/053595

PCT/SE01/02598

10

maize, *Phl p*: timothy grass). The position of the 14.3 kDa marker is indicated with an arrow on the right margin.

**Figure 4.** Detection of pollen grains containing group 2 allergens by particle blotting. Pollen grains from ten different monocots (*Ant o*: sweet vernal grass; *Ave s*: oat; *Cyn d*: bermuda grass; *Lol p*: rye grass; *Phl p*: timothy grass; *Phr c*: common reed; *Poa p*: Kentucky Blue grass; *Sec c*: rye; *Tri s*: wheat; *Zea m*: maize) and birch (*Bet v*) were dotted to nitrocellulose. Released proteins were stained with Ponceau S (A). Group 2 allergens were detected with *Phl p* 2-specific IgE Fabs (B), the major birch pollen allergen, Bet v 1, with specific Fabs (C). **The three *Phl p* 2-specific IgE Fabs contain closely related heavy chain fragments which have recombined with different light chains: sequence homology with autoantibodies**

Framework as well as complementarity determining regions of the three heavy chain fragments (clones 94, 60, 100) were of equal size. (SEQ ID NO. 1A) and their VH regions showed the highest similarity with members of the VH4 family (e. g., accession number: U71106; 23). The alignment of the cDNAs coding for the heavy chain variable regions of the three clones shows that they differ only in few nucleotides (27 out of 342 bp, 8% for clone 94 versus clone 60; 18 out of 342 bp, 5% for clone 94 versus clone 100; 9 out of 342 bp, 3% for clone 60 versus clone 100). The nucleotide exchanges were equally distributed over the complete variable region including frameworks and CDRs (SEQ ID NO. 1A).

Sequence analysis of the light chain cDNAs revealed that they all belonged to the kappa family. The sequence comparison of the three light chains showed much greater variation than was observed among the heavy chains (SEQ ID NO. 1B). Most of the nucleotide exchanges were observed in the CDR1 (9%-33%) and in the CDR3 (25%-33%).

A comparison of the deduced amino acid sequences of the variable regions of the heavy chain fragments of the three *rPhl p* 2-specific IgE Fab clones is displayed in SEQ ID NO 2A. Clones 60 and 100 are very similar (95% sequence identity) whereas a more moderate sequence identity of 86% and 88% was observed between clones 60 and 94, and

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

11

between clones 94 and 100, respectively. The few amino acid exchanges were sometimes not conservative ones and equally distributed over the framework and complementarity determining regions of the three clones (Fig. 2A). When compared with known human variable regions a surprising sequence similarity was found to a human IgM rheumatoid factor (accession number: Y14936; 24) (Fig. 2A). With exception of the CDR3 region which was completely different in sequence and length between the heavy chain fragments of the IgE Fabs and the rheumatoid factor, a comparable sequence identity was found for CDR1 and CDR2 as well as for all 4 framework regions of the IgE Fabs and the rheumatoid factor (SEQ ID NO 2A).

SEQ ID NO. 2B shows the alignment of the deduced amino acid sequences of the light chains of the three clones. The amino acid sequences of the three light chains showed a considerable sequence variation, particularly in the CDR1 (27-46%) and in the CDR3 (56%). The CDR2 regions differed only in one or two aa exchanges and also in framework regions only few amino acid exchanges were noted (<10% in FRW1, <14% in FRW2, <10% in FRW3) (SEQ ID NO 2B).

The three IgE Fab-derived light chains showed an interesting amino acid sequence similarity with light chains from human autoantibodies, one from a human anti-Rh (D) antibody (accession number: AF044462; 25) and two human rheumatoid factors (accession numbers S56199; S67059; 26, 27).

**Somatic mutations in the variable regions of the IgE Fabs are indicative of an antigen-driven selection process**

Fig. 1A shows the comparison of the DNA sequence of the variable region of the clone 94 heavy chain fragment with the closest related germline sequences (accession number: Z12365: V-genes, FR1- FR3; X97051: D-genes, CDR3; X86355: J-genes, CDR3+FR4) (22-24). In total we found 26 nucleotide exchanges of which 11% (10/93) were found in the CDRs and 7% (16/243) were observed in the framework regions. Five of these mutations were silent whereas 18 mutations led to amino acid exchanges.

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

12

The comparison of the variable region DNA sequence of the clone 94 light chain with the most closely related germline sequences (accession number: X93627: V-genes, FR1-CDR3; J00242: CDR3+ FR4; 25, 26) is shown in Figure 1B. We found 18 nucleotide exchanges of which 11% (9/81) were located in the CDRs and 4% (9/228) occurred in the frame work regions. Most mutations were found in the CDR3.

**A recombinant fragment comprising the N-terminal 64 amino acids of Phl p 2 contains the binding site for the IgE Fabs**

In order to determine the binding site for the rPhl p 2-specific IgE Fabs, nitrocellulose-dotted complete  $\beta$ -gal-fused rPhl p 2 allergen (96 aa), a N-terminal rPhl p 2 fragment comprising the first 64 aa portion (1-64) and a 69 aa long C-terminal rPhl p 2 fragment (28-96 aa) were exposed to the Fabs (Fig. 2A). Fig. 2B shows a ribbon representation of the complete Phl p 2 allergen which is similar to an immunoglobulin domain and consists mainly of  $\beta$ -sheet structure. The N-terminal and C-terminal fragment have been indicated in the model (Fig. 2B). These two fragments were previously identified as IgE-reactive domains whereas smaller fragments did not show IgE binding capacity (8). As exemplified for clone 94, all three Phl p 2-specific IgE Fabs recognized the complete rPhl p 2 (1) and the N-terminal rPhl p 2 fragment (2) but did not bind to the C-terminal fragment (3) nor to  $\lambda$ gt 11 phage control proteins (4) (Fig. 2C). Bacterial extracts obtained from bacteria which were transformed with the empty pComb3H plasmid did not react with any of the dotted proteins (Fig. 2C). No reactivity of the Phl p 2-specific IgE Fabs with the smaller Phl p 2 fragments described previously (8) was observed (data not shown).

**Anti-Phl p 2 IgE Fabs crossreact with natural group 2 allergens from 7 grass and corn species and identify group 2 allergen-containing pollen by particle blotting**

In order to investigate whether the recombinant human IgE Fabs crossreacted with natural group 2 allergens from different grass and corn species, nitrocellulose-blotted natural pollen extracts from several grass and corn species were tested (Fig. 3). The IgE Fabs

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

13

reacted strongly with group 2 allergens in sweet vernal grass, rye grass, Kentucky Bluegrass, rye and wheat. Only weak reactivity was observed with oat and common reed. No reactivity was seen with pollen extracts from monocots reportedly lacking or containing low levels of group 2 allergens (Bermuda grass, maize) (16).

Environmental measurements of pollen allergen loads are currently performed by air sampling and analysis of pollen morphology. We demonstrate that Phl p 2-specific Fabs can be used for the immunological identification of pollen grains containing group 2 allergens by particle blotting (Fig. 4). Membran-bound pollen grains from ten different grass species and birch released proteins after hydration which were stained with Ponceau S (Fig. 4A). Phl p 2-specific Fabs identified exclusively grass pollen grains containing group 2 allergens (sweet vernal grass, rye grass, Kentucky Bluegrass, rye, wheat and oat) (Fig. 4B). A mouse Fab with specificity for the major birch pollen allergen, Bet v 1, reacted only with birch pollen confirming the specificity of the assay (Fig. 4C).

**Phl p 2-specific IgE Fabs inhibit binding of grass pollen allergic patients IgE antibodies to Phl p 2**

Table 1 displays the quantification of IgE binding of sera from 27 grass pollen allergic patients to nitrocellulose-blotted rPhl p 2 which was preincubated with Phl p 2-specific IgE Fabs versus preincubation with Phl p 5-specific IgE Fabs (control) (Table 1). In 14 sera (52%) preincubation with Phl p 2-specific IgE Fabs reduced serum IgE binding > 50% (Table 1). In 10 sera (38%) the decrease of IgE binding was between 30-50% and in the remaining 3 sera (10%) a reduction of IgE binding between 22-29% could be achieved (Table 1). An average inhibition of IgE binding to Phl p 2 in range of 52% was achieved when Phl p 2 was preincubated with Phl p 2-specific IgE Fabs (Table 1).

WO 02/053595

PCT/SE01/02598

14

**Table 1.** IgE Fabs inhibit the binding of allergic patients' IgE to rPhl p 2. Sera from 27 grass pollen allergic patients (#1-27) were exposed to nitrocellulose-blotted rPhl p 2 which has been preincubated with Phl p 2-specific IgE Fabs (column A) or with control proteins (column B). The cpm values corresponding to the amount of bound IgE antibodies are displayed in columns A and B. The third column shows the percentage of inhibition of IgE binding. The mean inhibition of IgE binding is displayed at the bottom of the third column.

Patient No.	cpm		% of reduction
	with preincubation with Phl p 2-specific Fab	without preincubation	
1	859.2	1389.4	38
2	406.5	2570.5	84
3	93.3	222.7	58
4	150.7	228.7	34
5	734.1	1222.8	40
6	895.5	4240	79
7	6482.3	17914.2	64
8	130.8	253.1	48
9	293.5	523.5	44
10	1508.4	4274.9	65
11	2238	4520.1	50
12	1088.5	1779.7	38
13	855.9	1423.7	40
14	194.6	313	38
15	252.4	1014.6	75
16	312.5	448.4	30
17	1350.3	3505.3	61
18	140.4	387.6	64
19	1343.3	3485.5	61
20	129	416.4	69
21	704.4	1161.7	39
22	122.5	173.5	29
23	1707.4	2360.6	28
24	600.6	2036.8	70
25	3495	4470.6	22
26	1128.9	3634.8	69
27	426.4	1323.2	68

mean: 52

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

15

**DISCUSSION**

The present inventors report the molecular and immunological characterization of three human IgE antibody fragments with specificity for one of the most important environmental allergens, the major timothy grass pollen allergen, Phl p 2. The IgE Fabs were isolated from an IgE combinatorial library which was constructed from lymphocytes of a grass pollen allergic patient via panning to recombinant Phl p 2. Sequence analysis revealed that all three heavy chain fragments belonged to the VH4 family and were closely related to each other (23). While in the heavy chain variable regions the few amino acid sequence variations were equally distributed over the framework and complementarity determining regions, the kappa light chains were less closely related and showed significant sequence variations in the CDR1 and CDR3 domains. We have already previously found that IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen consisted of identical heavy chain fragments which had recombined with different light chains (15). Furthermore it has been demonstrated that the Phl p 5-specific IgE heavy chain fragments can be recombined with light chains from antibodies with different specificity but retain antigen-specificity (15, Laffer and Valenta, unpublished data). Also our study indicates that similar heavy chain fragments can recombine with different light chains but retain specificity for the original allergen. Although we have no proof that exactly those heavy chain and light chain combinations which we isolated via the combinatorial library approach existed in the allergic patient used for construction of the library, the latter findings support the assumption that the specificity of certain IgE antibodies is dictated by the heavy chains and that promiscuous use of light chains is possible without losing allergen specificity. In this context it is of note that all three IgE Fabs bound to the same recombinant fragment comprising the N-terminal 64 amino acids of Phl p 2.

The close sequence similarity of the heavy chain fragments as well as of the light chains of the Phl p 2-specific IgE Fabs with human autoantibodies (rheumatoid factors, anti Rh (D) antibodies) is of note in view of the fact that the recently determined three dimensional structure of Phl p 2 exhibited an unexpected similarity with immunoglobulin-like

WO 02/053595

PCT/SE01/02598

16

domains occurring in man (8). So far we have no evidence that the IgE Fabs can react with human proteins but when tested with pollen extracts from a variety of grass and corn species we found extensive crossreactivity with group 2 allergens. The recombinant Phl p 2-specific IgE Fabs may therefore be used to determine loads of group 2 allergens in the environment and may thus be useful for preventive measures. Furthermore they may be used for the determination and standardization of group 2 allergens in natural allergen extracts currently used for diagnosis and treatment of grass pollen allergy. Our finding that Phl p 2-specific IgE Fabs reacted with a major epitope-containing domain of Phl p 2 and strongly (mean inhibition 52%) inhibited binding of grass pollen allergic patients (n=27) complete IgE antibodies to Phl p 2 indicates a therapeutic potential of the Fabs. If the Fabs can be attached to epithelial cells or antigen-presenting cells in the target organs of atopy it may even become possible to build up a stable defense line against intruding allergens and perhaps to target them directly into the proteolytic compartment of antigen presenting cells without activating effector cells. The latter approach may not only inactivate the allergen via proteolysis but may be also useful for the induction of a protective mucosal immunity.

## REFERENCES

1. Kay, A.B. (1997). *Allergy and Allergic Diseases*, Blackwell Science, Oxford, U.K.
2. Segal, D.M., Taurog, J.D., and Metzger H. (1977). Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **42**, 457-467
3. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G. (1989). Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* **264**, 11181-11185.
4. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G. (1989). Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: comparison with known Lol p I and Lol p II sequences. *Biochem.* **28**, 8665-8670.
5. Sidoli, A., Tamborini, E., Giuntini, I., Levi, S., Volonte, G., Painsi, C., DeLalla, C., Siccardi, A.G., Baralle, F.E., Galliani, S., et al. (1993). Cloning, expression and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* **268**, 21819-21825.
6. Dolecek, C., Vrtala, S., Laffer, S., Steinberger, P., Kraft, D., Scheiner, O., and Valenta, R. (1993). Molecular characterization of *Phi p II*, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* **335**, 299-304
7. Roberts, A.M., Bevan, L.J., Flora, P.S., Jepson, I., and Walker, M.R. (1993). Nucleotide sequence of cDNA encoding the group II allergen of cocksfoot/orchard grass (*Dactylis glomerata*), Dac g II. *Allergy* **48**, 615-623.
8. De Marino, S., Castiglione Morelli, M.A., Fraternali, F., Tamborini, E., Musco, G., Vrtala, S., Dolecek, C., Arosio, P., Valenta, R., and Pastore, A. (1999). An immunoglobuline-like fold in a major plant allergen: The solution structure of Phi p 2 from timothy grass pollen. *Structure* **7**, 943-952
9. Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* **1**, 1572-1573

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

10. Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J., and the WHO panel members.(1998). Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 558-562.
11. Durham, and S.R., Till, S.J. (1998). Immunological changes associated with allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 157-164.
12. Cooke, R.A., Bernhard J.H., Hebal, S., and Stull, A. (1935). Serological evidence of immunity with co-existing sensitization in hay fever type of human allergy. *J. Exp. Med.* **62**, 733-750
13. Loveless, M.H. (1940). Immunological studies of pollinosis: I. The presence of 2 antibodies related to the same pollen-allergen in the serum of treated hay fever patients. *J. Immunol.* **38**, 25-50.
14. Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A. Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D., Benkovic, S.J., and Lerner R.A. (1989). generation of a large repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275-1281.
15. Steinberger, P., Kraft, D., and Valenta, R. (1996). Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. *J. Biol. Chem.* **271**, 10967-10972
16. Niederberger, V., Laffer, S., Fröschl, R., Kraft, D., Rumpold, H., Kapiotis, S., Valenta, R., and Spitzauer, S. (1998). IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 258-264
17. Barbas, C.F., III, Kang, A.S., Lerner, R.A., and Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7978-7982
18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
19. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

20. Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
21. Fling, S.P., and Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity Tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88
22. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354
23. Fais, F., Sellars, B., Ghiotto F., Yan, X.J., Dono, M., Allen, S.L., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S., Schulman, P., Schuster, M., Vinciguerra, V., Rai, K., Stevenson, F.K., Gregersen, P.K., Ferranini, M., and Chiarazzi, N. (1996). Examples of *in vivo* isotype class switching in IgM+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 1659-1966
24. Williams, D.G., Mayes, S.P., and Mageed R.A. (1999). Rheumatoid factors isotype switch and somatic mutation variants within rheumatoid arthritis synovium. *Immunol.* **98**, 123-138
25. Siegel, D.L., Chang, T.Y., Russell, S.L., and Bunya, V.Y. (1997). Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J. Immunol. Methods* **206**, 73-85
26. Ermel, R.W., Kenny, T.P., Chen, P.P., and Robbins, D.L. (1993). Molecular analysis of rheumatoid factors derived from rheumatoid synovium suggests an antigen-driven response in inflamed joints. *Arthritis Rheum.* **36**, 380-388
27. Martin, T., Crouzier, R., Blaison, G., Levallois, H., and Pasquali, J.L. (1993). A minor group of rheumatoid factors isolated from a patient with rheumatoid arthritis is derived from somatically mutated V $\alpha$ :1 genes further evidence that

- rheumatoid factors during autoimmune diseases undergo an antigen driven maturation. *Autoimmun.* **15**, 163-170
28. Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M. B., and Winter, G. (1992). The repertoire of human VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **227**, 776-798
29. Ravetch, J. V., Siebenlist, U., Karsmeyer, S., Waldmann, T., and Leder, P. (1981). Structure of human immunoglobulin mu locus: Characterization of embryonic and rearranged J+ D genes. *Cell* **27**, 583-591
30. Mattila, P.S., Schugk, J., Wu, H., and Makela, O. (1995). Extensive allelic sequence variation in the J region of the human immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2578-2582
31. Cox, J.P., Tomlinson, I.M., and Winter, G. (1994). A directory of human germline V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur. J. Immunol.* **24**, 827-836.
32. Hieter, P.A., Maizel, J. V. Jr., and Leder, P. (1982). Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes. *J. Biol. Chem.* **257**, 1516-1522

WO 02/053595

21

PCT/SE01/02908

## CLAIMS

1. Group 2 allergen specific human IgE Fabs having the amino acid sequences as shown in SEQ ID No 2A-B or essentially homologous variants thereof.
2. Group 2 allergen specific human IgE Fabs encoded by the nucleic acid sequences as shown in SEQ ID No 1A-B or essentially homologous variants thereof.
3. Group 2 allergen specific human IgG comprising the variable regions of the IgE Fabs of claims 1 or 2.
4. IgE-Fabs according to claims 1 or 2 or IgG according to claim 3, which are directed against Phl p 2.
5. IgE-Fabs according to any of the claims 1-2 or 4 and IgG according to claims 3 or 4, which are recombinantly produced.
6. A diagnostic reagent comprising the IgE-Fabs and/or IgG according to any of the claims 1-5, and/or the corresponding complete antibodies, and/or modified versions of said Fabs and/or antibodies.
7. A diagnostic kit comprising the reagent according to claim 6.
8. A vaccine against type I allergy, comprising the IgE-Fabs and/or IgG according to any of the claims 1-5, and/or the corresponding complete antibodies, and/or modified versions of said Fabs and/or antibodies.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

22

PCT/SE01/02908

9. Use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or IgG according to any of the claims 1-5 or vaccine according to claim 8 for passive immunotherapy of type I allergy.

10. Use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or IgG according to any one of the claims 1-5 or reagent according to claim 6 for diagnosing of type I allergy.

11. Use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or IgG according to any one of the claims 1-5 for environmental allergen detection.

12. Use of Phl p 2-specific IgE-Fabs and/or IgG according to any one of the claims 1-5 for standardization of allergen extracts.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

1/7

Fig. 1A

```

94      TCT GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCG GCA CAG ACC CTG TCC CTC AGC TGC GGT GTC TCT GGC
Z12365  --G --- --T-- T-- --C-- A-- --T--
          FR1
94      GGC TCC ATC CCC AGT GGT GGT TAC TGG AGT   TGG ATC CGC CAA CAC CCA GGG AAG
Z12365  --A-- --A-- --C-- --G--
          FR2
          CDR1
94      GGC CTG GAG TGG AWT GGG   TAC ATC TAT CAC AGT GGG AAC ACC TAC AAC CCG TCC
Z12365  --- --T-- --G--
          CDR2
          FR3
94      CTC AAG AGT   CGA AAT GCC ATG TCG GTA GAC ACC TCT GAG AAC AAG TTC TCC CTG AGG
Z12365  --- G-- A-- --A-- --A-- C-- --C-- --A--
          FR4
94      CTG AAC TCT GTG ACT GCC GCG GAC ACC GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG
Z12365  --- -G- --- --A--
          CDR3
94      TTA GAT GGC TAC ACT TTG
X97051  AG- --- --A- -AC
          CDR4
94      GAC ATC   TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
X86355  --A- TA- --- --A--

```

WO 02/053595

PCT/SE01/02908

2/7

Fig. 1B

```

94      ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC
X93627  --C --- --A --- --A --- --C ---
          FR1
          TCT GTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC
          --A --- --C ---
94      CGG GCA AGT CAG AGA ATT AAC ACC TAT TTA AAT
X93627  --C --- --G- --- --G- ---
          CDR1
          CAG AGA ATT AAC ACC TAT TTA AAT
          --G- --- --G- ---
          FR2
          TGG TAT CAG CAT AAA CCA GGG
          --G- ---
94      AAA GGC CCT AAG CTC CTG ATC TAT
X93627  --- ---
          FR2
          GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT
          --- ---
          FR3
          GGC GTC
          --- ---
94      CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TAT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
X93627  --- --- --C --- --T ---
          FR3
          GGA TAT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
          --C --- --T ---
94      CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA AGT TAC TAC TGT
X93627  --A --- --C --- --C ---
          FR3
          TTT GCA AGT TAC TAC TGT
          --C --- --C ---
          CDR3
          CAA GAG AGT CTC AGT GCC TCG
          --- C--- TA--- A--- CT---
94      TAC ACT
J00242  --- ---
          CDR3
          TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA
          --- C--- --- ---

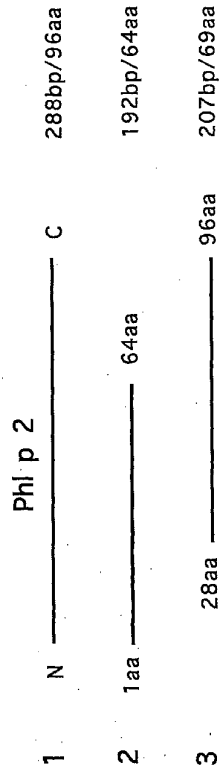
```

WO 02/053595

PCT/SE01/02595

3/7

Fig. 2A



WO 02/053595

PCT/SE01/02908

4/7  
Fig. 2B

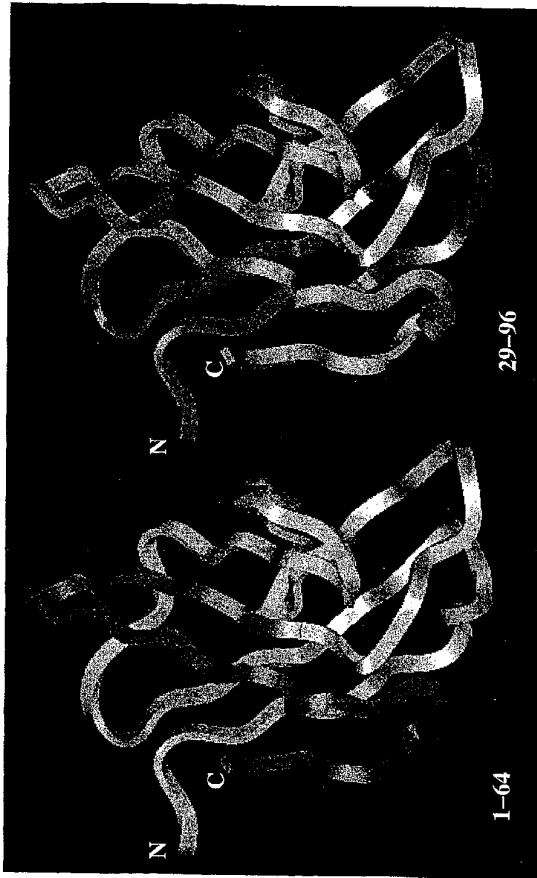
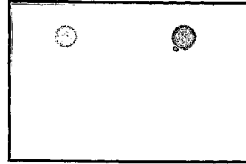
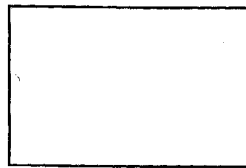


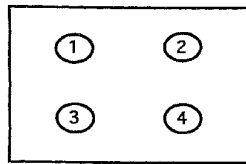
Fig. 2C



IgE-Fab  $\alpha$ Phl p 2



pComb3H

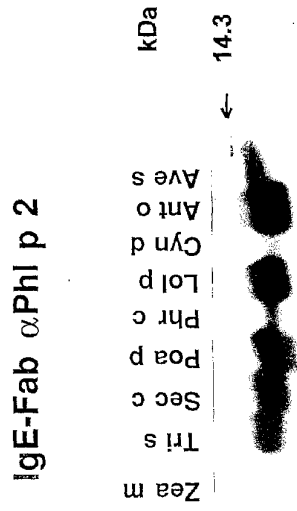


WO 02/053595

PCT/SE01/02908

6/7

Fig. 3

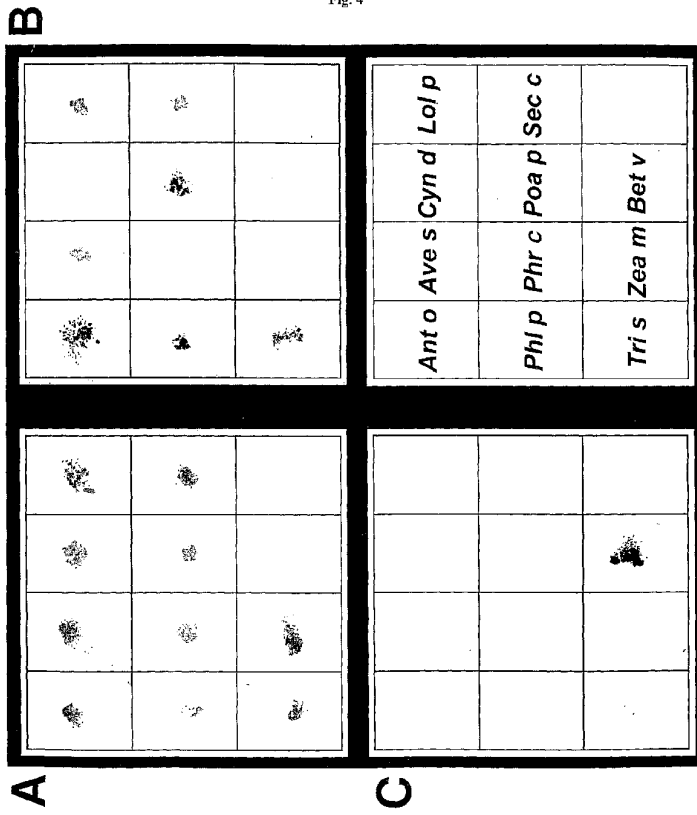


WO 02/053595

PCT/SE01/02908

7/7

Fig. 4



WO 02/053595

1/11

PCT/SE01/02908

## SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia Diagnostics AB

<120> Group 2 allergen specific IgE-fabs and use thereof

<130> P05367PC/UA

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Clone 94 heavy chain  
Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I  
Nucleotides 7-78 represent FR1  
Nucleotides 79-99 represent CDR1

<220>

<221> misc\_Feature

<223> Nucleotides 100-123 represent FR2  
Nucleotides 134-141 represent FR3  
Nucleotides 142-189 represent CDR2  
Nucleotides 190-285 represent FR3

<220>

<221> misc\_feature

<223> Nucleotides 286-309 represent CDR3  
Nucleotides 310-342 represent FR4

<400> 1  
ctcgagtctg gccaggact ggtgaagcct gcacagacc tgccctcag ctgctgctc 60  
tctggcggct ccattccgag tgggtggttac tactggagtt ggatccgcca acaccaggg 120

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

2/11

PCT/SE01/02908

```

aagggcctgg agtggattgg gtacatctat cacagtggga acacctacta caaccgctcc 180
ctcaagagtc gaattgccat gtcggttagac acgtctgaga acaagttctc cctgaggctg 240
aactctgtga ctgcccgga caccgctgtg tattactgtg cgaggttaga tggctacact 300
ttggacatct ggggccaggg aacctgggc accgtctcct ca 342

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 342

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

```

<223> Clone 60 heavy chain
      Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I
      Nucleotides 7-78 represent FR1
      Nucleotides 79-99 represent CDR1

```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

```

<223> Nucleotides 100-123 represent FR2
      Nucleotides 134-141 represent FR3
      Nucleotides 142-189 represent CDR2
      Nucleotides 190-285 represent FR3

```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

```

<223> Nucleotides 286-309 represent CDR3
      Nucleotides 310-342 represent FR4

```

&lt;400&gt; 2

```

ctcaggtctg gccaggact ggtgaagcct tcacagacce tgtccctcac ctgcactgtc 60
tctggtagct ccattccgag tgggtggtat tattggagtt gggcccgcca gcctccaggg 120
aagggcctgg agtggatcgg caacatctat cacagtggca acacctacta caaccgctcc 180
ctcaagagtc gaattaccat gtcagtagac acgtctaaga accacttctc cctgagactg 240
aactctgtga ctgcccgga caccgctgtc tattactgtg cgcggtcaga tgggtatata 300
ttggacaact ggggccaggg aacctgggc accgtctcct ca 342

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 342

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

3/11

PCT/SE01/02908

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Clone 100 heavy chain  
 Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I  
 Nucleotides 7-78 represent FR1  
 Nucleotides 79-99 represent CDR1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Nucleotides 100-123 represent FR2  
 Nucleotides 134-141 represent FR3  
 Nucleotides 142-189 represent CDR2  
 Nucleotides 190-285 represent FR3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Nucleotides 286-309 represent CDR3  
 Nucleotides 310-342 represent FR4

<400> 3  
 CTCGAGTCTG GCCCAGGACT GGTGAAGCCT TCACAGACC TGTCCCTCAC CTGCAGTGC 60  
 TCTGGTGGCT CCATCCG CAG TGGTGGTTAT TACTGGAGTT GGATCCGCCA GCCTCCAGGG 120  
 AAGGGCCTGG AGTGGATCGG GTACATCTAT CACAGTGGCA ACACCTACTA CAACCCGTCC 180  
 CTCGAAGAGTC GAGTTACCAT GTCAGTAGAC ACGTCTAAGA ACCACTTCTC CCTGAGGCTG 240  
 AGCTCTGTGA CTGCCGCGGA CACGGCCGTG TATTACTGTG CGAGGTCAGA TGGGTACTACT 300  
 TTGGACAAC TGGGCCAGGG AACCCGTGTC ACCGTCTCCT CA 342

<210> 4  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Clone 94 light chain  
 Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I  
 Nucleotides 7-63 represent FR1  
 Nucleotides 64-96 represent CDR1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

4/11

PCT/SE01/02908

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

<223> Nucleotides 97-141 represent FR2  
Nucleotides 142-162 represent CDR2  
Nucleotides 163-238 represent FR3  
Nucleotides 259-285 represent CDR3

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Nucleotides 286-318 represent FR4

```
<400> 4
gagctcactc agtctccatc ctccctgtct gcatctgtgg gagacagagt caccatcagt    60
tgccgggcaa gtcagagaat taacacctat ttaaattggt atcagcataa accagggaaa    120
gccctaagc tcttgatcta tgctgcatcc agtttgcaa gtgggtccc atcaaggttc    180
agtggcagtg gatatgggac agacttcaact ctcaccatca gcagtctgca gcctgaagat    240
tttgcaagtt actactgtca agagagtctc agtgctcctg acacttttgg ccaggggacc    300
aaggtagaga tcaaacga                                     318
```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

<223> Clone 60 light chain  
Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I  
Nucleotides 7-63 represent FR1  
Nucleotides 64-96 represent CDR1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

<223> Nucleotides 97-141 represent FR2  
Nucleotides 142-162 represent CDR2  
Nucleotides 163-258 represent FR3  
Nucleotides 259-285 represent CDR3

&lt;220&gt;

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

5/11

PCT/SE01/02908

```

<221> misc_feature
<223> Nucleotides 286-318 represent FR4

<400> 5
gagctcacc agtctccatc ctccctgtct gcctctgtag gagacagagt caccatcact 60
tgccggggcac gtcagagtat tagcacctat ttaaattggt atcagcagaa accggggaag 120
gccctaagc tcctgatctg gagtgcattc aatttgcaa gtgggtccc atcaggttc 180
agtggcagtg gatctgggac agagttcact ctcacatca gcaatctgca acctgaagac 240
tttgaagtt actactgtca acagagttac actaccttat ataccttcgg ccctgggacc 300
aaactggaga tcaaacga 318

<210> 6
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Clone 100 light chain
Nucleotides 1-6 represent restriction sites for Xho I and Sac I
Nucleotides 7-63 represent FR1
Nucleotides 64-96 represent CDR1

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotides 97-141 represent FR2
Nucleotides 142-162 represent CDR2
Nucleotides 163-258 represent FR3
Nucleotides 259-285 represent CDR3

<220>
<221> misc_feature
<223> Nucleotides 286-318 represent FR4

<400> 6
gagctcacgc agtctccatc ttccgtgtct gcatctgtag gagacagagt caccataact 60
tgtcggggcga gtcaggggat tagcagttgg ttagcctggt atcagcagaa accagggaaa 120
gccctaagc tcctgatcta ttctgatccc agtttgcaa gtgggtccc gtaagggttc 180
agcggcagtg gatctgggac agatttcagt ctcacatca gcagcctgca gcctgaagat 240

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

6/11

PCT/SE01/02908

tctgcaactt actattgtca acaggctaac agtttcccggt acacttttgg ccaggggacc 300  
 aaggtggaaa tcaaacga 318

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 94 heavy chain  
 Amino acids 1-26 represent FR1  
 Amino acids 27-33 represent CDR1  
 Amino acids 34-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-63 represent CDR2  
 Amino acids 64-95 represent FR3  
 Amino acids 96-103 represent CDR3  
 Amino acids 104-114 represent FR4

&lt;400&gt; 7

Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Gln Thr Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly Gly Tyr Trp  
 20 25 30

Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr  
 35 40 45

Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg  
 50 55 60

Ile Ala Met Ser Val Asp Thr Ser Glu Asn Lys Phe Ser Leu Arg Leu  
 65 70 75 80

Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu  
 85 90 95

Asp Gly Tyr Thr Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

7/11

PCT/SE01/02908

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 60 heavy chain  
 Amino acids 1-26 represent FR1  
 Amino acids 27-33 represent CDR1  
 Amino acids 34-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-63 represent CDR2  
 Amino acids 64-95 represent FR3  
 Amino acids 96-103 represent CDR3  
 Amino acids 104-114 represent FR4

&lt;400&gt; 8

Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp  
 20 25 30

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

Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg  
 50 55 60

Ile Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu Arg Leu  
 65 70 75 80

Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser  
 85 90 95

Asp Gly Tyr Thr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

8/11

PCT/SE01/02908

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 100 heavy chain  
 Amino acids 1-26 represent FR1  
 Amino acids 27-33 represent CDR1  
 Amino acids 34-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-63 represent CDR2  
 Amino acids 64-95 represent FR3  
 Amino acids 96-103 represent CDR3  
 Amino acids 104-114 represent FR4

&lt;400&gt; 9

Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp  
 20 25 30

Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn  
 35 40 45

Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg  
 50 55 60

Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu Arg Leu  
 65 70 75 80

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser  
 85 90 95

Asp Gly Tyr Thr Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 106

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

9/11

PCT/SE01/02908

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 94 light chain  
 Amino acids 1-21 represent FR1  
 Amino acids 22-32 represent CDR1  
 Amino acids 33-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-54 represent CDR2  
 Amino acids 55-86 represent FR3  
 Amino acids 87-95 represent CDR3  
 Amino acids 96-104 represent FR4

&lt;400&gt; 10

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

Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Tyr Leu Asn  
 20 25 30

Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala  
 35 40 45

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 65 70 75 80

Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Glu Ser Leu Ser Ala Ser Tyr Thr Phe  
 85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

10/11

PCT/SE01/02908

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 60 light chain  
 Amino acids 1-21 represent FR1  
 Amino acids 22-32 represent CDR1  
 Amino acids 33-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-54 represent CDR2  
 Amino acids 55-86 represent FR3  
 Amino acids 87-95 represent CDR3  
 Amino acids 96-104 represent FR4

&lt;400&gt; 11

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

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Asn  
 20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Trp Ser  
 35 40 45

Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp  
 65 70 75 80

Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Leu Tyr Thr Phe  
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Clone 100 light chain  
 Amino acids 1-21 represent FR1  
 Amino acids 22-32 represent CDR1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/053595

11/11

PCT/SE01/02908

Amino acids 33-47 represent FR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> Amino acids 48-54 represent CDR2  
 Amino acids 55-86 represent FR3  
 Amino acids 87-95 represent CDR3  
 Amino acids 96-104 represent FR4

&lt;400&gt; 12

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

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 01/02908
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 16/16, A61K 39/395, A61K 39/36, G01N 33/563, G01N 33/564 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)		
IPC7: C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, MPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM.ABS.DATA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Int. Arch Allergy Immunol, Volume 113, 1997, Peter Steinberger et al: "Expression in Escherichia coli of Human IgE Antibody Fragments with Specificity for Major Timothy Grass Pollen Allergens Using the Combinatorial Library Approach, pages 258-259, page 259, column 2 --	1-2,4-12
X	Allergy Copenhagen, Volume 53, 1998: Suppl. 43, No FC078, Sabine Flicker et al: "Isolation and Characterization of recombinant human IgE antibody fragments (Fabs) with specificity for the major timothy grass pollen allergen Phi p 2", page 113, abstract --	1-2,4-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" documents 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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12 April 2002	17-04-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer: TERESE PERSSON/BS Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/IS &amp; P16 (revised sheet) / July 1998

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 01/02908

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Immunology, Volume 89, 1996, Suppl. 1, page 30, No C26, Sabine Flicker et al: "Expression in Escherichia coli and purification of Antibody Fragments (FABs) with specificity for major pollen allergens" --	1-2,4-12
X	Immunology, Volume 89, 1996, Suppl. 1, page 30, No C27, Rudolf Valenta et al: "Mapping for the IgE and IgG binding sites of the major timoth grass pollenallergen phl 2 p 2 by gene fragmentation"	1-2,4-12
A	--	3
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 271, No. 18, May 1996, Peter Steinberger: "Construction of a Combinatorial IgE Library from an Allergic Patient", pages 10967-10972 --	1-12
A	The Journal of Immunology, Volume 165, 2000, Sabine Flicker et al: "A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 5: Molecular, Immunological, and Structural Characterization of the Epitope-Containing Domain 1" pages 3849-3859 --	1-12
A	BIOSIS, Accession Number PREV200100249490, Rossi Renato et al: "Measurement of IgE and IgG4 antibodies against purified grass pollen allergens (Phl p1, Phl p2, Phl p5 and Bet v 2) and natural extracts after short-term grass immunotherapy", Allergology International, Volume 50, No. 1, pp. 81-88 -- -----	3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE01/02908

<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-2 (partially) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see next sheet
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> 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.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE01/02908

Present claims 1-2 relate to an extremely large number of possible group 2 allergen specific human IgE Fabs, due to the wording "or essentially homologous variants thereof". Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the IgE Fabs. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been focused on the aminoacid sequences in SEQ. ID. Nos 2A-B, the corresponding nucleic acid sequences SEQ. ID. Nos 1A-B and variants thereof with essentially the same features as these sequences.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established will not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Q

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

(72) 発明者 フリツカー, ザビーネ

オーストリア国、アー - 1 1 6 0 ・ ウイーン、スベツクバツカーガツセ・ 4 4 / 2 / 7

(72) 発明者 シュタインベルガー, ピーター

オーストリア国、アー - 1 1 6 0 ・ ウイーン、ビルヘルミネンシュトラッセ・ 9 3 / 1 4 / 1 2

(72) 発明者 クラフト, デイトリツヒ

オーストリア国、アー - 1 1 7 0 ・ ウイーン、レーベンバーク・ 1 / 1 8 / 1

(72) 発明者 バレンタ, ルドルフ

オーストリア国、アー - 2 6 0 4 ・ テレジアンフェルト、ベートーベンシュトラッセ 1 8 番

F ターム(参考) 4C085 AA03 AA08 AA33 AA34 BB04 CC22 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	对第2组过敏原特异的IgE-Fab和IgG分子及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004532813A</a>	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2002555117	申请日	2001-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	关阿尔玛乳木果诊断TAKES阿为主		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚-诊断任务则是基于		
[标]发明人	フリツカーザビーネ シュタインベルガーピーター クラフトデイトリツヒ バレンタルドルフ		
发明人	フリツカー, ザビーネ シュタインベルガー, ピーター クラフト, デイトリツヒ バレンタ, ルドルフ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/36 A61K39/395 A61P37/00 A61P37/08 C07K16/16 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 A61K2039/505 C07K16/16 C07K2317/55 G01N33/6857		
FI分类号	C07K16/16.ZNA A61K39/00.H A61K39/36 A61K39/395.V A61P37/00 A61P37/08 G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/AA33 4C085/AA34 4C085/BB04 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	0004892 2000-12-29 SE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及对第2组过敏原特异的IgE-Fab和完整IgG分子及其用途。更确切地说, 本发明涉及IgE-Fab ( Phl p 2 ) 和对禾本科植物花粉特异的试剂, 以及含有它们的试剂盒和疫苗。本发明还涉及第2组特异性IgE-Fab和完整IgG分子的用途, 特别是用于诊断和治疗和预防I型变态反应。

(P20)  
(43) 公表日 平成16年10月28日(

(61) Int. Cl. 7	FI	テーマコード
<b>C07K 16/16</b>	C07K 16/16 ZNA	4C085
<b>A61K 39/00</b>	A61K 39/00 H	4H045
<b>A61K 39/36</b>	A61K 39/36	
<b>A61K 39/395</b>	A61K 39/395 V	
<b>A61P 37/00</b>	A61P 37/00	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 64 頁) 頁		

(21) 出願番号	特願2002-555117 (P2002-555117)	(71) 出願人	502043547 ファルマシア・ダイアグノステ ー・ベー
(86) (22) 出願日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月27日 (2003.6.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/SE2001/002908		
(87) 国際公開番号	W02002/053595		
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	0004892-6	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 肇夫
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明