

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-175891

(P2016-175891A)

(43) 公開日 平成28年10月6日(2016.10.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B065
<b>C12N 15/00 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNA	4C085
<b>C12N 1/21 (2006.01)</b>	C12N 1/21	4H045
<b>A61K 39/35 (2006.01)</b>	A61K 39/35	

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-29444 (P2016-29444)	(71) 出願人	506329801 ファディア・アクチボラグ
(22) 出願日	平成28年2月19日 (2016. 2. 19)		スウェーデン国 751 37 ウブサラ 、ボックス 6460
(62) 分割の表示	特願2013-506115 (P2013-506115) の分割	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
原出願日	平成23年4月26日 (2011. 4. 26)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	1050406-6	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(32) 優先日	平成22年4月23日 (2010. 4. 23)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100135415 弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のアレルゲン

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 哺乳動物からの新規のアレルゲン、及び、哺乳動物に対するアレルギーの診断および治療方法の提供。

【解決手段】 非還元条件下で15kDaの分子量を有するセクレトグロビンであり、一緒に連結した約5kDaの分子量を有する第一のペプチド鎖と約10kDaの分子量を有する第二のペプチド鎖とを含む単離されたウマアレルゲン、ならびに該ウマアレルゲンと共通の抗体に対するエピトープを有するそれらの変異体およびフラグメント。さらに診断及び治療におけるアレルゲンの使用、加えて該アレルゲンを含む診断キット及び医薬組成物。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非還元条件下で 15 kDa の分子量を有するセクレトグロビンであり、一緒に連結した、アミノ酸配列

ATCPAVATDIASFLLPDSLFLKQLIKYQAPPEAKDATM QVKQCINEISAGDRYIITETLGKIVLQCGA (配列番号 4)

を含み、5 kDa の分子量を有する第一のペプチド鎖と、アミノ酸配列

GSGCQLLEDVVEKTI TAELSPA EYVEAVQEFIPDEATEK

AAIQLKQCYLKQSNETLNDFRMTMMNSMYNSAYCALF (配列番号 5)

を含み、10 kDa の分子量を有する第二のペプチド鎖と

を含む単離されたウマアレルゲン、

または IgE 抗体に対する該ウマアレルゲンと共通のエピトープを有するそれらの変異体およびフラグメントであって、前記ウマアレルゲンと少なくとも 70% の配列同一性を有する変異体およびフラグメント。

## 【請求項 2】

ウマから精製された、または、組換え生産された、請求項 1 に記載のウマアレルゲン。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンをコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の核酸分子を含むベクター。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 6】

インビトロでの 1 型アレルギーの診断に使用するための請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン。

## 【請求項 7】

インビトロでの 1 型アレルギーの診断のための診断剤組成物を製造するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンの使用。

## 【請求項 8】

アレルゲン抽出物および / または少なくとも 1 種の精製したアレルゲン構成要素を含む組成物に、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンを添加する工程を含む、アレルゲン組成物の製造方法。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法によって得られるアレルゲン組成物。

## 【請求項 10】

インビトロでの 1 型アレルギーの検出を補助する方法であって、該方法は：

1 型アレルギーを有する疑いのある患者からの免疫グロブリンを含む体液サンプルを、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、請求項 14 に記載のアレルゲン組成物と接触させる工程、および、

サンプル中の、前記ウマアレルゲンに特異的に結合する IgE 抗体の存在を検出する工程、

を含み、ここで、このような前記ウマアレルゲンに特異的に結合する IgE 抗体が存在することは、1 型アレルギーであることを示す、上記方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、請求項 14 に記載の組成物を含む、請求項 10 に記載の方法を行うための診断キット。

## 【請求項 12】

1 型アレルギーの予防的または治療的処置に使用するための、請求項 1 または 2 のい

10

20

30

40

50

れか一項に記載のウマアレルゲン。

【請求項 1 3】

1 型アレルギーの予防的または治療的処置のための治療用組成物を製造するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンの使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、I g E 結合反応を排除するかまたは弱められるように改変された形態のウマアレルゲン、および、任意に医薬的に許容されるキャリアー、賦形剤、緩衝液および希釈剤の少なくとも 1 種を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギーの分野に関する。より具体的には、本発明は、哺乳動物からの新規のアレルゲンの同定、および、哺乳動物に対するアレルギーの診断および治療に関する。

【背景技術】

【0002】

先進工業国における人口のおよそ 20% が、様々な環境要因由来の抗原に曝露されると過剰反応（アレルギー性）を示すようになっている。このような即時のおよび / または遅延型の過敏症を誘発させる抗原は、アレルゲンとして知られている（Breiteneder et al. 1997）。このようなアレルゲンとしては、イネ科植物の産物、木、草類、動物の鱗屑、昆虫、食物、薬物および化学物質が挙げられる。アトピー性アレルギーに関与する抗体は、主として免疫グロブリン E アイソタイプ（I g E）に属する。I g E は、特異的な高親和性受容体 F c R I を介して好塩基球、肥満細胞および樹状細胞に結合する。アレルゲンに曝露されると、細胞表面にアレルゲン特異的な I g E 抗体と架橋を形成し、それによりヒスタミンやロイコトリエンなどの炎症性メディエータの放出が起こり、結果としてアレルギーの生理学的徴候が生じる（Akdis 2006）。

20

【0003】

アレルギーの診断テストは、アレルゲン源由来のタンパク質に特異性を有する患者からの I g E 抗体を検出することを含む。これらの試験には、典型的には、タンパク質の混合物を含むアレルゲン源からの水性抽出物が用いられる。ほとんどのアレルゲン源について、粗抽出物中に存在するアレルゲンタンパク質の一部しか同定および特徴付けがなされていない。患者における特異的な I g E 抗体を検出するための診断テストの手順は、患者由来の血清を用いたインビトロでのイムノアッセイを利用するか、または、患者の皮膚に特異的な抽出物を局所的に塗布することによって行われる皮膚プリックテスト（S P T）（Wainstein et al. 2007）によって行うことができる。

30

【0004】

近年、アレルゲン抽出物中の重要な様々なアレルゲンタンパク質が同定され特徴付けられている。これにより、これら個々のアレルギーを起こす構成要素それぞれに特異的な I g E 抗体の定量が可能になり、これは、しばしば構成要素分解診断法（component resolved diagnostics ; CRD）（Valenta et al. 1999）（Hiller et al. 2002）と称され、多くの場合、それにより過敏症の診断を改善することができる（Stumvoll et al. 2003）。また C R D の使用は、最適な免疫療法における処置の選択にも役立つことが示唆されている（Valenta et al. 2007）。さらに個々のアレルゲンは、抽出物にアレルゲン構成要素を加えることによって抽出物の診断感度を高めるのに用いられることもある。結論付けると、各アレルゲン源中の全ての重要なアレルゲンタンパク質を同定して特徴付けることは、上記の理由から非常に重要である。

40

【0005】

例えば抗ヒスタミンによってアレルギーの症状を軽減することとは別に、特異的な免疫療法を用いてより長期にわたる治癒的なアレルギー治療を行うことができる。病気を引き

50

起こすアレルゲン抽出物を、最も一般的には皮下または舌下のいずれかに塗布することにより、アレルゲンタンパク質に対する予防的な免疫反応の特異的な活性化が起る。正確なメカニズムは完全にはわかっていないが、このような免疫系の特異的な活性化は、その後同じアレルゲンに環境暴露された際のアレルギー症状を緩和する (Akdis et al. 2007)。一定の免疫療法のさらなる開発は、未精製の天然抽出物の代わりに、1種または数種の精製アレルゲンタンパク質を使用することである。このような免疫療法は、イネ科植物の花粉アレルギー患者には成功しており (Jutel et al. 2005)、さらに動物の鱗屑に対するアレルギーも治療することが示唆されている (Gronlund et al. 2009)。

【0006】

ウマ鱗屑は、一般的な呼吸器のアレルギーの原因になりつつあり (Liccardi et al. 2011)、このアレルギーは鼻炎、結膜炎、気管支炎症および喘息などの症状を示す。アレルギー感作の決定的な危険因子は、職業的にウマアレルゲンに曝露されることであるが (Tutluoglu et al. 2002)、学校などその他の場所でもかなりの濃度のアレルゲンを検出することができる (Kim et al. 2005)。ある研究では、ウマ鱗屑に対する I g E 感作は、喘息を発症させる高い危険と関連することが示された (Ronmark et al. 2003)。

【0007】

ウマの毛および鱗屑の抽出物はアレルゲンタンパク質の複雑な混合物を含んでおり、これまでに4種のウマアレルゲン: E q u c 1、E q u c 2、E q u c 3およびE q u c 4 / 5 が同定されている。最初の2種はいずれもリボカリタンパク質ファミリーに属するもので、それらの自然源から精製されているが (Dandeu et al. 1993; Goubran Botros et al. 1998)、E q u c 1のみが組換えタンパク質として発現されている (Gregoire et al. 1996)。E q u c 1のアミノ酸配列は、ネコアレルゲン F e l d 4 と 6 7 % 類似している (Smith et al. 2004)。E q u c 3はウマ血清アルブミンであり、これは、比較的保存されたタンパク質であり、他の哺乳動物アルブミンに対して広範な交差反応性を示す (Goubran Botros et al. 1996)。E q u c 4 / 5は、最初に精製され、ウマ鱗屑における I g E 結合タンパク質として報告されたものであるが (Goubran Botros et al. 1998; Goubran Botros et al. 2001)、ウマの汗のラセリン (latherin) と同定されたのは後になってからである (McDonald et al. 2009)。E q u c 1は、既知のウマアレルゲンのなかでも最も重要なものと言われており (Dandeu et al. 1993)、組換えタンパク質の I g E 抗体認識は、研究対象のウマアレルギーの被験者の 7 6 % で観察されている (Saarelainen et al. 2008)。精製した天然アレルゲンを用いた別の研究では、ウマアレルギー患者のうち 3 3 % しか E q u c 2 に感作されておらず、E q u c 4 / 5 には 2 3 % しか感作されていなかった (Goubran Botros et al. 1998)。いくつかの研究で、ウマ血清アルブミンへの I g E 結合の頻度を検討したところ、ウマアレルギーの被験者の最大 4 0 % において反応性が認められた (Spitzauer et al. 1993; Cabanas et al. 2000)。しかしながら、血清アルブミンに感作すると、それに伴い他のアレルゲン構成要素に対する I g E 抗体がより高濃度になることが多いことから、その特異的な臨床的関連性は不明確である。

【0008】

長い間、ウマ鱗屑アレルゲンの E q u c 1、E q u c 2、E q u c 3 および E q u c 4 / 5 が知られていたにもかかわらず、ウマ鱗屑に対する全 I g E 反応に対する各構成要素の寄与率の定量的な推定はなされていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Breiteneder, H., K. Hoffmann-Sommergruber, et al. (1997). "Recombinant allergens; basic and practical considerations." Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut - Bundesamt für Sera und Impfstoffe - Zu Frankfurt Am(91): 80-86.

【非特許文献2】Akdis, C. A. (2006). "Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease." Curr Opin Immunol 18(6): 718-726

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 3】Wainstein, B. K., A. Yee, et al. (2007). "Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children." *Pediatr Allergy Immunol* 18(3): 231-239
- 【非特許文献 4】Valenta, R., J. Lidholm, et al. (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." *Clinical and Experimental Allergy* 29(7): 896-904
- 【非特許文献 5】Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." *FASEB Journal* 16(3): 414-416
- 【非特許文献 6】Stumvoll, S., K. Westritschnig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(5): 974-979 10
- 【非特許文献 7】Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 826-830
- 【非特許文献 8】Akdis, M. and C. A. Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 780-791
- 【非特許文献 9】Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." *J Allergy Clin Immunol* 116(3): 608-613
- 【非特許文献 10】Gronlund, H., T. Saarne, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." *Int Arch Allergy Immunol* 151(4): 265-274 20
- 【非特許文献 11】Liccardi, G., G. D'Amato, et al. (2011). "Sensitization to Horse Allergens in Italy: A Multicentre Study in Urban Atopic Subjects without Occupational Exposure." *Int Arch Allergy Immunol* 155(4): 412-417
- 【非特許文献 12】Tutluoglu, B., S. Atis, et al. (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." *Clin Exp Allergy* 32(8): 1170-1173 3
- 【非特許文献 13】Kim, J. L., L. Elfman, et al. (2005). "Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment." *Indoor Air* 15(3): 170-182 30
- 【非特許文献 14】Ronmark, E., M. Perzanowski, et al. (2003). "Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies." *Pediatr Allergy Immunol* 14(2): 91-99
- 【非特許文献 15】Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.C1, the Horse Major Allergen." *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 621(1): 23-31
- 【非特許文献 16】Goubran Botros, H., J. Rabillon, et al. (1998). "Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* 710(1-2): 57-65. 40
- 【非特許文献 17】Gregoire, C., I. Rosinski-Chupin, et al. (1996). "cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily." *Journal of Biological Chemistry* 271(51): 32951-32959
- 【非特許文献 18】Smith, W., A. J. Butler, et al. (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." *Clinical & Experimental Allergy* 34(11): 1732-1738
- 【非特許文献 19】Goubran Botros, H., C. Gregoire, et al. (1996). "Cross-reactivity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short pe 50

ptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies.” Immunology 88(3): 340-347

【非特許文献 2 0】Goubran Botros, H., P. Poncet, et al. (2001). “Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens.” Eur J Biochem 268 (10): 3126-3136.

【非特許文献 2 1】McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). “Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva.” PLoS One 4(5): e5726

【非特許文献 2 2】Saarelainen, S., M. Rytkonen-Nissinen, et al. (2008). “Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity.” Clin Exp Allergy 38(2): 374-381

【非特許文献 2 3】Spitzauer, S., C. Schweiger, et al. (1993). “Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting.” International Archives of Allergy and Immunology 100: 60-67

【非特許文献 2 4】Cabanas, R., M. C. Lopez-Serrano, et al. (2000). “Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens.” Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 10(2): 71-77

【発明の概要】

【0010】

上述したように、うまく設計された特異的な IgE 抗体のための実験用イムノアッセイを用いれば、天然ウマ鱗屑抽出物を用いてウマへの感作のほとんどのケースを検出することができる。しかしながら、小型化された、または、実験用ではないイムノアッセイ、例えばアレルゲンマイクロアレイ、または、医師の診察室で行われる試験の場合、分析条件があまり好適ではないこと、抗体結合アレルゲン試薬の能力が低いこと、さらに天然アレルゲン抽出物は限定的な効力しか有さないことが組み合わさって、不十分な診断感度しか得られない可能性がある。他の動物上皮に対する特異的な IgE のイムノアッセイについても同様の状況が起こり得る。従って、動物上皮に対する特異的な IgE 抗体のための診断テストにおいて十分な感受性を達成するために、場合によっては純粋なアレルゲンタンパク質を使用することが必要である。

【0011】

このようなアレルゲンは、慣例的な診断テストにおいて感受性を高めるための試薬としてだけでなく、異なるタイプの構成要素分解診断法の適用においても有用であり得る (Valenta et al. 1999) (Hiller et al. 2002)。免疫療法における新規の試薬として、改善された非アナフィラキシー性を有する純粋なアレルゲンタンパク質またはフラグメントおよびそれらの変異体も使用される可能性がある (Valenta et al. 1999) (Cromwell et al. 2006) (Saarne et al. 2005); (Jutel et al. 2005); (Cromwell et al. 2006)。

【0012】

全ての既知のウマアレルゲン構成要素の精製および解析から、ウマ鱗屑抽出物に対して、個々のウマアレルゲン構成要素に対する反応を全て合計した値よりも有意に高い IgE 反応を示す数人の患者の血清が同定された。これらの血清は、これまで知られていなかったウマアレルゲン構成要素に対する IgE 結合反応性を有することが見出された。

【0013】

上述の血清を用いて、ウマ鱗屑から新しい主要アレルゲンを精製したところ、セクレトグロビンタンパク質ファミリーの一員と同定することができた。本明細書において E q u c 1 5 k と称される新規のウマタンパク質は、ジスルフィド架橋で一緒に結合した 1 つの 1 5 k D a のアミノ酸鎖と 1 つの 1 0 k D a のアミノ酸鎖からなる。2 種のポリペプチド鎖は別個の遺伝子によってコードされていることを考慮すると、この研究から、これまでウマゲノムの生物情報学的な研究では予測されなかったヘテロ二量体タンパク質の存在が示された。このアレルゲンは、あらゆる形態においてこれまでに知られていたウマアレルゲンとは異なっている。このアレルゲンは、既知のウマアレルゲンのパネルへの重要な追

加となり、ウマアレルギーの診断において有用であると予想される。

【0014】

一形態において、本発明は、非還元条件下でおよそ15 kDaに相当する電気泳動移動度（見かけの分子量）を示し、1個またはそれより多くのジスルフィド結合で一緒に連結した約5 kDaの分子量を有する第一のペプチド鎖と約10 kDaの分子量を有する第二のペプチド鎖とを含む、セクレトグロビンファミリーに属する単離されたウマアレルゲンのE q u c 1 5 kに関する。この本発明の形態はまた、E q u c 1 5 kと共通の抗体に関するエピトープを有するE q u c 1 5 kの変異体およびフラグメントも含み、ここでこのような変異体およびフラグメントは、このような抗体と少なくとも約50%まで交差反応する。このような変異体およびフラグメントとしては、例えば、同じ種由来の関連アレルゲンが挙げられる。以下で説明されるその他の本発明の形態においても、用語「E q u c 1 5 k」は、便宜上、このようなそれらの変異体およびフラグメントも含むものとして用いられる。

10

【0015】

その他の形態において、本発明は、最初に述べられた形態に係るアレルゲンをコードする単離された核酸に関し、加えて、核酸分子を含むベクター、および、このようなベクターを含む宿主細胞にも関する。このようなベクターを含む宿主細胞によって生産された組換えタンパク質またはペプチドは、用いられる宿主細胞に応じてグリコシル化されていてもよいし、またはグリコシル化されていなくてもよい。

20

【0016】

さらなる形態において、本発明は、I型アレルギーの診断のための組成物を製造するためのE q u c 1 5 kの使用に関する。

さらなる形態において、本発明は、E q u c 1 5 kで「スパイクされた」アレルゲン組成物に関する。このようなアレルゲン組成物は、E q u c 1 5 k含量がゼロか低いアレルゲン抽出物または精製もしくは組換えアレルゲン構成要素の混合物であってもよく、ここでE q u c 1 5 kは、自身のI g Eが組成物中の他のアレルゲン構成要素と結合しないか、または不十分にしか結合しないと予想される患者由来のI g Eと結合させるために添加される。またこの本発明の形態は、このような組成物を生産する方法にも関し、本方法は、例えばアレルゲン抽出物などのアレルゲン組成物（任意に他の構成要素でスパイクされていてもよい）、または、精製した天然または組換えアレルゲン構成要素の混合物にE q u c 1 5 kを添加する工程を含む。

30

【0017】

さらにその他の形態において、本発明は、患者においてI型アレルギーを診断するインビトロでの診断方法に関し、ここで体液サンプル、例えば患者からの血液または血清サンプルと、E q u c 1 5 kまたは前述の形態に係る組成物とを接触させることにより、患者のサンプルがE q u c 1 5 kに特異的に結合するI g E抗体を含むかどうかを決定することができる。このような診断方法は、当業界でよく知られているあらゆる方法で行うことができる。E q u c 1 5 kは、例えば従来の実験室レベルのイムノアッセイ、マイクロアレイ、または、ラテラルフロー分析においては、例えば固体支持体に固定されていてもよいし、または、流体相試薬として用いてもよい。

40

【0018】

その他の形態において、本発明は、前述の形態に係る方法を行うための診断キットに関する。

上述した形態において、野生型E q u c 1 5 k分子は、上述したように、以下で定義されるような、野生型タンパク質と共通の抗体に対するエピトープを有するE q u c 1 5 kの天然または人工のフラグメントまたは変異体で置き換えることができる。

【0019】

本発明はさらに、I型アレルギーの治療方法に関し、本方法は、以下で説明するように、このような治療が必要な患者に、E q u c 1 5 kまたは改変されたE q u c 1 5 kを投与することを含む。この本発明の形態はまた、例えば構成要素分解免疫療法（Valenta et

50

al. 2007) などの免疫療法における E q u c 1 5 k の使用にも関する。この形態の一実施態様において、E q u c 1 5 k は、その天然の形態で用いてもよいし、または、天然分子と類似した生化学的および免疫学的な特性を示す組換えの形態で用いてもよい。その他の実施態様において、E q u c 1 5 k は、治療された個体においてその I g E 抗体結合能力を排除 (abrogate) するかまたは弱める (attenuate) ために、同時に好ましくは I g G 反応を惹起できるようにするために化学的または遺伝学的に生成した改変された形態で用いてもよい。改変例としては、これらに限定されないが、分子の断片化、トランケーション、タンデム化もしくは凝集、内部セグメントの欠失、アミノ酸残基の置換、他の高分子構造または他方の低分子量化合物へのジスルフィド架橋または結合を壊すことによるドメインの再構成もしくは少なくとも部分的な三次構造の破壊が挙げられる。この形態のさら

10

#### 【0020】

上述した全ての本発明の形態において、E q u c 1 5 k タンパク質は、例えば尿、唾液またはその他の体液などのその自然源から精製してもよいし、または、例えばウマの毛髪または鱗屑などの組織から精製してもよい。また、上述したように、当業者によく知られた方法によって組換え DNA 技術によって生産してもよいし、または化学合成によって生産してもよい。

20

#### 【0021】

本発明はまた、1型アレルギーの予防的または治療的処置に使用するための E q u c 1 5 k にも関し、加えて診断でも使用するための E q u c 1 5 k にも関する。

#### 定義

ここで述べられるアレルギーを起こすウマタンパク質である E q u c 1 5 k は、セクレトグロビンタンパク質ファミリーに属しており、具体的には2個のヘテロ二量体サブユニットによって形成された四量体タンパク質を含む1つのサブファミリーに属する。ヘテロ二量体は、ジスルフィド架橋によって一緒に連結した異なる遺伝子から誘導された2つの鎖からなる (Klug et al. 2000)。ここで述べられるウマセクレトグロビンは、本明細書において E q u c 1 5 k と称される 1 5 k D a のヘテロ二量体であって、これは、それぞれ 5 ± 2 k D a のサブユニットと 1 0 ± 2 k D a のサブユニットとからなり、これらはそれぞれ、本発明の目的において 5 および 1 0 k D a サブユニットと称される。分子量の割り当ては、以下の実施例 4 で説明されてる SDS - P A G E で観察されたそれらの見かけの分子量に従う。当然ながら見かけの分子量は、例えば電気泳動による分離の媒体およびそれらの濃度、用いられる直線的または濃度勾配のある緩衝液などの分離条件に応じて変動すると予想される。また 1 0 k D a サブユニットには N - グリコシル化部位が含まれるが、グリカン構造にこのような部位が含まれると、見かけの分子量に影響を与える可能性がある。

30

#### 【0022】

5 k D a 鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列 A T C P A V A T D I A S F F L L P D S L F K L Q L I K Y Q A P P E A K D A T M Q V K Q C I N E I S A G D R Y I I T E T L G K I V L Q C G A (配列番号 4) を有し、理論上の分子量は、7 . 5 k D a である。

40

#### 【0023】

1 0 k D a 鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列 G S G C Q L L E D V V E K T I T A E L S P A E Y V E A V Q E F I P D E A T E K A A I Q L K Q C Y L K Q S N E T L N D F R T M M N S M Y N S A Y C A L F (配列番号 5) を有し、理論上の分子量は、8 . 4 k D a である。

#### 【0024】

特筆すべきことに、様々な哺乳動物種において構造的に関連するタンパク質が説明されているが、アレルゲンと定義されたタンパク質は、主要なネコアレルゲン F e l d 1 のわ

50

ずか1種である(登録番号P30438およびP30440)。

【0025】

E q u c 1 5 kの変異体およびフラグメントは、ヘテロ二量体における各鎖が少なくとも10個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも40個、さらにより好ましくは少なくとも50個または60個のアミノ酸残基の長さを有し、前記E q u c 1 5 kとの配列同一性が少なくとも50%、好ましくは60%より高い、70%、80%、90%または95%であるタンパク質またはペプチドを意味するものと解釈されるべきである。

【0026】

本発明の環境において、改変されたE q u c 1 5 kは、例えば上記で本発明の免疫療法の形態に関して例示されたように、その免疫学的な特性を変えるために化学的に改変された、または、遺伝子組換えされたE q u c 1 5 k変異体を意味するものとして解釈されるべきである。

10

【0027】

E q u c 1 5 kと共通の抗体に対するエピトープを有するE q u c 1 5 kの変異体およびフラグメントは、代表的なE q u c 1 5 kに感作した患者の血清サンプルからの抗体(例えばI g EまたはI g G抗体)との結合が、E q u c 1 5 kによって有意に阻害される可能性があるフラグメントおよび変異体と解釈されるべきである。このような阻害分析は、例えば、Mattsson et al. 2009(この開示は、参照により本明細書に組み入れられる)で説明されている方法に従って行ってもよい。

【0028】

低アレルギー性の改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントは、例えば以下に記載された実施例7に従ったプロトコールによって決定した場合に、代表的なE q u c 1 5 kに感作した患者の血清サンプルからのE q u c 1 5 k反応性I g E抗体と結合できない改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントであるか、または、例えば好塩基球のヒスタミン放出分析(Demoly et al. 2003; Ebo et al. 2004)などの細胞活性化分析によって決定した場合に、生物学的なアレルギー活性がないか、または極めて低い生物学的なアレルギー活性しか示さない改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントであると解釈されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0029】

【図1A】図1Aは、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によるウマ鱗屑タンパク質の分画化を示す。それに続く精製工程に用いられたピークAおよびBは矢印で指定した。

【図1B】図1Bは、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるn E q u c 1の精製を示す。ピークCおよびDは、それに続く精製工程に用いられた。

【図1C】図1Cは、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるn E q u c 2およびE q u c 4 / 5の精製を示す。ピークE、FおよびGは、それに続く精製工程に用いられた。

【図1D】図1Dは、陰イオン交換クロマトグラフィーによるn E q u c 2の精製を示す。ピークHおよびIは、それに続く解析に用いられた。

40

【図1E】図1Eは、精製したタンパク質のE q u c 1のAおよびBの形態、E q u c 2およびE q u c 4 / 5の14 k D aおよび19 k D aの形態のSDS - P A G E解析を示す。レーンMは、分子量マーカータンパク質を含み、分子量は左側に示した。

【図2A】図2Aは、35種のウマ鱗屑反応性血清を用いてn E q u c 1の2つのA型およびB型のI g E結合(それぞれピークCおよびピークD)を比較した図である。点線は、0.35 k U A / Lのカットオフレベルを示す。

【図2B】図2Bは、38種のウマ鱗屑反応性血清を用いてn E q u c 4 / 5の19 k D aおよび14 k D aの形態のI g E結合を比較した図である。点線は、0.35 k U A / Lのカットオフレベルを示す。

【図3A】図3は、新規のI g E結合タンパク質を検索するのに使用された分画の精製を

50

示す。A：陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画Aの精製。

【図3B】図3は、新規のIgE結合タンパク質を検索するのに使用された分画の精製を示す。B：疎水性相互作用クロマトグラフィーによる分画BおよびCの精製。

【図4A】図4は、15kDaのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。A：サイズ排除クロマトグラフィーによるウマ鱗屑抽出物の分画化。ピークAは、それに続く精製工程に用いられた。

【図4B】図4は、15kDaのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。B：疎水性相互作用クロマトグラフィーによるピークAの分画化である。ピークJは、図で指定された通りにプールされ、それに続く精製工程に用いられた。

【図4C】図4は、15kDaのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。C：陰イオン交換クロマトグラフィーによるピークJの分画化。ピークKおよびLは、それに続く解析および/またはさらなる精製工程に用いられた。

【図4D】図4は、15kDaのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。D：精製した15kDaのウマ鱗屑タンパク質の還元(Red)および非還元(Ox)サンプルのSDS-PAGE解析を示す。レーンMは、分子量マーカータンパク質を含み、分子量は左側に示した。

【図4E】図4は、15kDaのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。E：逆相クロマトグラフィーによるピークKの精製の精密化。ピークMは、その後の免疫学的な解析に用いられた。

【図5】図5は、nEquc15kの5kDaおよび10kDaのアミノ酸鎖の予想された配列を示す。N末端の配列解析によって同定されたアミノ酸を下線で示し、MS/MS解析によって同定されたアミノ酸を太字で示す。

【図6】図6は、免疫プロットングによって検出された、ウマアレルギー患者のうち2名(番号3および12)の血清中のnEquc15kに対するIgEの反応性を示す。最初の2つのストリップは全てのタンパク質の染色を示し、5および10kDaサブユニットならびに15kDaのタンパク質それぞれの位置を矢印で示した。右の4つのストリップは、Equc15kの還元(Red)および非還元(Ox)サンプルへのIgE結合を示す。

【図7】図7は、天然および組換えEquc15kのIgE反応性の相関を示す。0.35kUA/Lおよび0.1kUA/Lレベルを点線で示した。

【図8】図8は、25人のウマ鱗屑アレルギーの被験者の同齡集団における、ウマ鱗屑抽出物(HDE)、Equc1、nEquc2、nEquc3、nEquc4/5およびrEquc15kに対するIgE抗体のレベルを示す。0.1kUA/L未満の観察の数は、各構成要素ごとに括弧内に示した。点線は0.35kUA/Lレベルを示し、実線は0.1kUA/Lレベルを示す。水平のバーは、IgEの中央値のレベルを示す。

【図9】図9は、nEquc15kおよびrField1に対するIgE抗体結合を比較した図である。0.35kUA/Lおよび0.1kUA/Lレベルを点線で示した。

【図10】図10は、固定されたEquc1およびField1へのIgE結合を自己阻害および交差阻害する可溶性Equc15kおよびField1の能力を示す。ウマ鱗屑アレルギー患者からの血清(表3に従って標識された)またはウマ鱗屑で感作された被験者からの血清(A~Eと標識された)を用いた。

【発明を実施するための形態】

【0030】

#### 発明の詳細な説明

以下の実施例は、ウマからのセクレトグロビンの単離および使用によって本発明を説明するものである。これらの実施例は単なる説明であり、本発明を制限するものと解釈すべきではなく、本発明は添付の請求項の範囲によって定義される。

【0031】

#### 実施例1：ウマ鱗屑および血清からの既知のアレルゲンの精製および特徴付け

Equc1、Equc2およびEquc4/5を精製するための出発原料としてウマ鱗

10

20

30

40

50

屑を用い、一方でウマ血清から E q u c 3 を精製した。

【 0 0 3 2 】

20 mM の M O P S ( p H 7 . 6 )、0 . 5 M の N a C l ( M B S = M O P S - 緩衝食塩水 ) 中でウマ鱗屑 ( アレルゴン ( Allergon )、スウェーデン国バリング ( Valinge ) ) を抽出し、遠心分離で透明にし、0 . 4 5 μ m の混合型のセルロースエステルフィルター ( ミリポア ( Millipore )、米国マサチューセッツ州ビレリカ ) を通過させてろ過した。3 種全てのウマ鱗屑アレルゲンにとって第一の精製工程として、透明化した抽出物を、サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) のためにスーパーデックス ( Superdex™ ) 7 5 カラム ( X K 2 6 / 1 0 0、V<sub>t</sub> = 5 0 5 m L、G E ヘルスケア・ライフサイエンス ( G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s )、スウェーデン国ウブサラ ) に適用し、M B S を用いて流速 2 m L / 分で溶出した。

10

【 0 0 3 3 】

E q u c 1

E q u c 1 を精製するために、図 1 A におけるピーク A を 2 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> に調整し、20 mM トリス ( p H 8 . 0 ) 中の 2 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> で平衡化したフェニルセファロース ( P h e n y l S e p h a r o s e™ ) H P カラム ( H R 1 0 / 1 0、V<sub>t</sub> = 9 . 0 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス ) に適用した。2 M ~ 0 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> の直線的な N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> 濃度勾配で溶出させた。勾配の中央で E q u c 1 を含む 2 つのピーク ( 図 1 B におけるピーク C および D ) が溶出した。20 mM の M O P S ( p H 7 . 6 )、0 . 5 M の N a C l で平衡化したセファデックス ( S e p h a d e x™ ) G 2 5 ファインカラム ( X K 1 6 / 2 0、V<sub>t</sub> = 3 4 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス ) で各ピークを脱塩した後、それぞれの n E q u c 1 調製物をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) で、サンプルと 1 0 0 m M の -メルカプトエタノールを含む N u P A G E E L D S サンプル緩衝液 ( インビトロジェン ) とを 1 : 3 で混合することによって製造された還元サンプルの N u P A G E M E S 緩衝液系 ( 1 0 % N u P A G E ゲル、インビトロジェン ( I n v i t r o g e n )、米国カリフォルニア州カールスバッド ) を用いて処理した。見かけの分子量の指標として、マーク 1 2 ( M a r k 1 2™ ) 標準 ( インビトロジェン ) を用いた。いずれの n E q u c 1 調製物も S D S - P A G E での判断から純粋であることがわかった ( 図 1 E )。

20

【 0 0 3 4 】

説明されている通りに、ブルカー・ダルトニクス・オートフレックス ( A u t o f l e x ) 2 装置 ( ブルカー・ダルトニクス ( B r u k e r D a l t o n i c s )、ドイツ国ブレーメン ) でペプチドマスフィンガープリンティング ( P M F ) を行うことによってタンパク質調製物を明確に E q u c 1 と同定した ( M a t t s s o n e t a l . 2 0 0 9 )。

30

【 0 0 3 5 】

説明されている通りに、上記タンパク質の両方の形態をイムノ C A P ( I m m u n o C A P™ ) 固相に固定した ( M a r k n e l l D e W i t t e t a l . 2 0 0 2 )。

E q u c 2

E q u c 2 を精製するために、S E C からの第二のピーク ( 図 1 A におけるピーク B ) を 1 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> に調整し、疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) において 20 mM トリス ( p H 8 . 0 ) 中の 1 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> で平衡化したフェニルセファロース™ H P カラム ( H R 1 0 / 1 0、V<sub>t</sub> = 9 . 0 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス ) で処理した。同じ緩衝液中の 1 M ~ 0 M の N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> の直線的な N H<sub>4</sub> S O<sub>4</sub> 濃度勾配で溶出させた。分画 ( 図 1 C におけるピーク E ) を通過したフロー中に E q u c 2 が含まれており、これをプールして、20 mM のピストリスプロパン ( p H 8 . 5 ) で平衡化したセファデックス™ G 2 5 ファインカラム ( X K 2 6 / 2 0、V<sub>t</sub> = 9 0 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス ) で脱塩した。脱塩した E q u c 2 プールを最終的に 20 mM のピストリスプロパン ( p H 8 . 5 ) で平衡化した陰イオン交換カラムソース ( S o u r c e™ ) 1 5 Q ( H R 1 6 / 1 0、V<sub>t</sub> = 9 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス ) に適用した。同じ緩衝液中の 0 ~ 0 . 4 0 M の直線的な N a C l 濃度勾配で溶出させたところ

40

50

、タンパク質は3つのピークに分解し、これらはいずれも、SDS-PAGE解析で純粋な17kDaのバンドを示した。最も大きい2つのピークをN末端の配列解析（プロサイス（ProCise™）LC452、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）、米国カリフォルニア州フォスターシティ）で解析し、これらはいずれも配列DQDPQSEDTYを有しており、これらはE q u c 2 . 0 2 0 1と同定された（図1DピークHおよびI）。説明されている通りに、I g E結合反応性を評価するために、これらのピークをプールし、イムノCAP™固相に固定した（Marknell DeWitt et al. 2002）。

【0036】

E q u c 4 / 5

SECからの第二のピーク（図1AのピークB）を用いてE q u c 4 / 5の精製を行った。このプールを1MのNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>に調整し、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）において20mMトリス（pH8.0）中の1MのNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>で平衡化したフェニルセファロース™HPカラム（HR10/10, V<sub>t</sub> = 9.0mL, GEヘルスケアライフサイエンス）で処理した。同じ緩衝液中の1M~0MのNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>の直線的なNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>濃度勾配で溶出させた。E q u c 4 / 5タンパク質は、勾配の中央で2つの別個のピーク（図1CにおけるピークFおよびG）に溶出した。第一のピークのSDS-PAGE解析から14kDaのバンドとして移動するタンパク質が明らかになり、第二のピークは19kDaのバンドを含むことが明らかになった。その後、20mMのピストリスプロパン（pH8.5）で平衡化したセファデックス™G25ファインカラム（XK26/20, V<sub>t</sub> = 90mL, GEヘルスケアライフサイエンス）で脱塩した。いずれのタンパク質もSDS-PAGEにより純粋であることがわかった（図1E）。これら2種の調製物はいずれもN末端配列VGPLLGPSDAを示し、これは、ウマラセリンまたはE q u c 4 / 5と同定された。

10

20

【0037】

説明されている通りに、nE q u c 4 / 5の2つの形態を別々にイムノCAP™固相に固定した（Marknell DeWitt et al. 2002）。

E q u c 3

天然E q u c 3を、実質的に説明されている通りに、ブルー・セファロース（Blue Sepharose）FF、（GEヘルスケアライフサイエンス）を用いたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー（AIEC）およびSECによって、ウマ血清から精製した（van Eijk et al. 1999）。

30

40

【0038】

実施例2：ウマに感作された個体からの血清のパネルにおける個々のウマ鱗屑アレルゲン構成要素へのI g E結合レベルの評価

A型およびB型と名付けられたE q u c 1の2つの形態のI g E結合活性を、（社内の血清コレクションから得られた）ウマ鱗屑に感作された血清1セットを用いて評価した。図2Aで示されるように、E q u c 1の2つの形態は、同等のI g E結合活性を示した。従って以下の分析にはnE q u c 1Aで得られた値のみを用いた。ウマ鱗屑反応性血清の類似のセットを用いて、E q u c 4 / 5の2つの形態へのI g E抗体結合を比較したところ、図2Bで示されるように、それらは極めて類似していることがわかった。

【0039】

通常の実験用イムノCAP™試験（ファディア（Phadia）、スウェーデン国ウプサラ）を用いてウマ鱗屑抽出物および精製したウマアレルゲンへのI g E抗体結合を試験した。実験用イムノCAP™試験を上述のようにして調製した。ウマ鱗屑で感作された個体からの29種の血清のパネルを用いた。ウマ鱗屑抽出物、nE q u c 1、nE q u c 2、nE q u c 4 / 5に対するI g E反応の決定を行った。結果は表1に示したが、ここで患者A1~A29の血清中のHDEおよび構成要素および3種の構成要素の合計に対するI g E抗体濃度はkUA/Lで表示した。構成要素の割合は、構成要素の合計とウマ鱗屑抽出物との比率であり、パーセンテージで示した。

【0040】

50

ウマ鱗屑抽出物に対する I g E 結合のレベルが、個々の構成要素、例えば血清番号 A 1、A 2 1 および A 2 2 それぞれが占める可能性があるレベルよりも有意に高いレベルを有する多数の血清を同定した。この段階で評価されていない E q u c 3 反応性の可能性を別にしても、同定した血清は、新規のウマ鱗屑由来 I g E 結合タンパク質の検索に役立つ可能性がある。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 実施例 3：新規の I g E 結合反応性を有するウマ鱗屑からの分画の同定

前もって特徴付けられているウマ鱗屑アレルゲンを精製するプロセスの間に、これまでに知られていたウマアレルゲン以外のタンパク質を含む数種の分画が同定された。上記の実施例 2 で同定された血清を用いて I g E 結合活性を解析するために特に興味深い 3 種の分画を選択した。分画 A には、矢印で示された ( 図 3 A ) E q u c 2 の陰イオン交換による精製工程から得られた 1 0 k D a のバンド ( 還元 S D S - P A G E ) が含まれていた。それぞれ 1 3 k D a および 1 0 k D a のバンド ( 還元 S D S - P A G E ) を含む分画 B および C を E q u c 1 の H I C 精製工程から得て、これは図 3 B において矢印で示した。説明されている通りに、実験用イムノ C A P <sup>T M</sup> ( ファディア ) 試験を調製し ( Marknell D eWitt et al. 2002 )、これを血清解析に用いた。

10

#### 【 0 0 4 2 】

表 2 に結果をまとめたが、表 2 はさらに、以前のウマ鱗屑抽出物の決定と n E q u c 1、n E q u c 2 および n E q u c 4 / 5 の合計も含み、いずれも k U A / L として表示した。分画 C において最大 I g E 結合レベルが確認された。特筆すべきことに、血清 A 1 において、分画 C への I g E 結合レベルが、n E q u c 1、n E q u c 2 および n E q u c 4 / 5 への I g E 結合の合計よりもかなり高かった。この血清において、アルブミン I g E の反応性は 1 . 5 k U A / L しか示さなかった ( 示さず ) ことから、分画 C には新規のウマ鱗屑アレルゲンが含まれることが示唆される。

20

#### 【 0 0 4 3 】

##### 実施例 4：分画 C において優勢なタンパク質成分の精製および同定

##### 分画 C からのウマ鱗屑タンパク質の精製

分画 C に存在する 1 0 k D a のタンパク質をより高度に標的化した方法で精製するために、ウマ鱗屑抽出物を実施例 1 で説明されているようにして S E C で処理した。図で指定された通りに ( 図 4 A におけるピーク A )、S D S - P A G E 解析に従って E q u c 1 を含むピークをプールした。ピーク A の右側部分だけに 1 0 k D a バンドが含まれており、これをプールした。実施例 1 において E q u c 1 に関して説明されている通りに、このプールの 2 M の N H <sub>4</sub> S O <sub>4</sub> に調整し、H I C で処理した ( 図 4 B )。図 4 B におけるピーク J を 2 0 m M の トリス ( p H 8 . 0 ) で 1 : 3 に希釈し、同じ緩衝液で平衡化したソース <sup>T M</sup> 1 5 Q カラム ( P E 4 . 6 / 1 0 0 , V <sub>t</sub> = 1 . 7 m L ; G E ヘルスケアライフサイエンス ) に適用した。0 ~ 0 . 4 M の N a C l の直線的な濃度勾配で溶出させたところ、濃度勾配の中央において優勢なピーク、それに続いてより小さいピークが得られた ( 図 4 C におけるピーク K および L )。実施例 1 で説明されているように N u P A G E M E S 緩衝液系を用いて S D S - P A G E 解析を行ったが、ここでサンプルは、それぞれ還元および非還元条件に応じた 4 % -メルカプトエタノール含有または非含有の N u P A G E L D S 緩衝液で 1 : 3 に希釈することによってサンプルを調製した。両方のピークの S D S - P A G E 解析 ( 図 4 D ) から、非還元条件下でおよそ 1 5 k D a のバンドが出現した。サンプルを還元した際に、1 5 k D a のバンドが消失したが、同時におよそ 5 および 1 0 k D a の 2 つのバンドが現れたことから、非還元の 1 5 k D a のバンドは、1 個またはそれより多くのジスルフィド架橋で互いに連結した 5 k D a および 1 0 k D a のバンドを形成するポリペプチドで構成されていることが示唆される。両方のピークは同じタンパク質を含むように見えるが、大きいピーク ( K ) のみをさらなる生化学的解析で処理した。I g E 結合を研究ために、R P C 精製工程でサンプルを 0 . 0 6 5 % T F A の水溶液で平衡化したソース <sup>T M</sup> 5 R P C カラム ( S T 2 . 1 / 1 5 0 , V <sub>t</sub> = 0 . 5 2 m L ; G E ヘルスケアライフサイエンス ) に適用することにより精製を行った。0 . 0 5 % T F A

30

40

50

を含む90%アセトニトリルからなる緩衝液Bの0~70%の直線的な濃度勾配で溶出させた。濃度勾配の終わり付近でタンパク質が単一のピークで溶出した(図4EにおけるピークM)。

【0044】

セクレトグロビンとしての15kDaのウマ鱗屑タンパク質の同定

SDS-PAGEゲルから切り出し抽出した還元型5kDaおよび10kDaのタンパク質バンドをN末端の配列解析によって解析した。5kDaのバンドの解析から、アミノ酸配列ATxPAVATDIASFFLLPDSL(x:未解析の残基)が明らかになり、これは、「LppABに類似」と表示されたエクウス・カバルス(Equus caballus)の予測配列(Genbank登録番号XP\_001502544)(配列番号1)の残基22~41とマッチした。10kDaのバンドの解析から、配列GSgxQLLEDVVEKTITAELS(x:未解析の残基)が明らかになり、これは、「リポフィリンCL2に類似」と表示されたエクウス・カバルス由来の予測配列(GenBank登録番号XP\_001494564)(配列番号2)の残基19~38とマッチした。

10

【0045】

溶液中でトリプシン消化した15kDaの精製タンパク質のMALDI-TOF質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な(p<0.05)マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、ペプチドのMS-MS解析m/z=2281およびm/z=1262.5によって、「LppABに類似」の予想された配列(エクウス・カバルス)(GenBank登録番号XP\_001502544)から配列QCINEISAGDRYIITETLGK(配列番号3)が同定された。

20

【0046】

ゲル中でトリプシン消化した5kDaフラグメントのMALDI-TOF質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な(p<0.05)マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、検出された5種の優勢なペプチドはいずれも、配列番号4の予想されたトリプシンフラグメントに相当するものであり、ここでm/z=903.47(残基28~35に相当)、m/z=1037.6(残基43~53に相当)、m/z=1262.6(残基43~53に相当)、m/z=2281.1(残基43~62に相当)およびm/z=2384.2(残基1~22に相当)であり、これらは合計で、配列番号4の予測のアミノ酸残基のうち50残基(72%)にあたる。

30

【0047】

ゲル中でトリプシン消化した10kDaのバンドのMALDI-TOF質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な(p<0.05)マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、検出された2種の優勢なペプチドは、m/z=1433.6およびm/z=2880.4を示し、これは、それぞれ配列番号5の残基1~13および14~39に相当するペプチドGSgCQLLEDVVEKおよびTITAE LSPA EYVEAVQEFIPDEATEKの質量と一致した。

40

【0048】

同定されたデータベースエントリー、XP\_001502544(配列番号6)およびXP\_001494564(配列番号7)両方のアミノ酸配列は、セクレトグロビンタンパク質ファミリーに特有の特徴を示した。従って、総合すると、これらの結果から、15kDaのウマ鱗屑タンパク質はセクレトグロビンであると同定された。以降、このタンパク質はEquc15kと称する。図5に、Equc15kの2種の鎖の前駆体配列の予測される全長配列を示し(5kDaフラグメント-配列番号6;10kDaフラグメント-配列番号7)、ここでN末端の配列解析によって同定されたアミノ酸を下線で示し、MS-MS解析によって同定されたアミノ酸を太字で示す。5kDaフラグメントの前駆体配列は、21個のアミノ酸のN末端シグナルペプチドを含み、10kDaフラグメントの前

50

駆体配列は、18個のアミノ酸のN末端シグナルペプチドを含む。特筆すべきことに、シグナルP (signalP) ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)) を用いた前駆体配列のシグナルペプチド予想から、5 kDa および 10 kDa 鎖の両方について実験的に得られた配列と同じ成熟配列が得られた。

【0049】

図4Dに記載のSDS-PAGE解析は、非還元条件下において、5および10kDaのアミノ酸鎖は1個またはそれより多くのジスルフィド架橋と一緒に保持されており、それによりヘテロ二量体タンパク質が形成されることを示す証拠となる。従って、この解析は、配列番号4をコードする遺伝子を、これまで知られていなかったヘテロ二量体のセクレトグロビンタンパク質を共に構成する配列番号5をコードする異なる遺伝子と結びつけるものである。

10

【0050】

#### 実施例5：免疫ブロット解析を用いたEquc15kへのIgE結合の評価

IgEのタンパク質への反応性がEquc15kのどのサブユニットに対するものなのかを決定するために、還元および非還元条件の両方を用いた免疫ブロット解析を行った。

【0051】

4~20% NuPAGEゲル(インビトロジェン)を用いたSDS-PAGEによって分離した精製Equc15kの還元および非還元サンプルで免疫ブロット解析を行い、ハイボンド(Hybrid)ECLニトロセルロースメンブレン(GEヘルスケアライフサイエンス)にエレクトロブロッティングした。ブロッキング緩衝液(50mMリン酸塩(pH7.4)、0.1%(体積/体積)トゥイーン(Tween<sup>TM</sup>)20、0.9%(質量/体積)NaCl、0.3%(質量/体積)デキストランT10)を用いてタンパク質ブロットを室温で1時間ブロッキングし、それぞれブロッキング緩衝液で1:4.8および1:13.5に希釈した患者3および12の血清と共に一晚インキュベートした。0.5%(体積/体積)トゥイーン-20を含む0.15MのNaCl溶液で洗浄した後に、メンブレンをブロッキング緩衝液中でHRPで標識した抗ヒトIgE抗体と共に3時間インキュベートし、洗浄した後、結合したIgEを、ECLアドバンス(ECL Advance)ウェスタンブロット検出キット(GEヘルスケアライフサイエンス)およびLAS400ミニCCDカメラ(フジフィルム(Fujifilm), 日本国東京)を用いて蛍光分析によって検出した。

20

30

【0052】

イムノCAP<sup>TM</sup>解析によれば、解析(患者番号3および12)で用いられた2種の血清はいずれもEquc15kに対して優勢な反応性を示した(以下の実施例7を参照)。いずれの血清も、還元型5kDaおよび10kDaサブユニットに相当する弱いバンドとして観察された、還元条件下で分離したEquc15kのサブユニットとは、弱い反応しか示さなかった(図6)。Equc15kの非還元型15kDaバンドに相当するバンドとは、非還元条件下でそれよりかなり強い反応性が観察された。この解析において、他のバンドに対して有意な反応性は観察されなかった。この免疫ブロット解析から、IgE結合反応性は、実際には、Equc15k標品の主要なタンパク質バンドに向けられることが実証された。

40

【0053】

#### 実施例6：組換えEquc15kの生産および免疫学的な特徴付け

##### 組換えEquc15kのクローニングおよび精製

5kDaおよび10kDaサブユニットのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)を3回含むリンカーペプチドをコードする配列とを組み合わせることによってEquc15k一本鎖の合成遺伝子を設計した。この合成遺伝子全長を、固定した金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によるタンパク質精製ができるようにC末端にヘキサヒスチジンタグを添加したベクターpET23a(+)(ノバジェン(Novagen), 米国ウィスコンシン州マディソン)のNdeIおよびXhoI部位にクローニングした。

50

## 【0054】

配列番号8に、組換えタンパク質全体のアミノ酸配列を示す。大腸菌 (*E. coli*) (DNA2.0, 米国カリフォルニア州メンローパーク) において最適なコドンを使用するために、ヌクレオチド配列を設計した。配列番号9に、組換えタンパク質全体をコードする核酸配列を示す。

## 【0055】

大腸菌株 BL21-AI (インビトロジェン) にプラスミドDNAコンストラクトを形質転換し、3リットルのバイオリクター (ベラーチ・バイオテック (Belach Biotechnik), スウェーデン国ソルナ) を用いて組換え E q u c 1 5 k 一本鎖タンパク質を生産した。

## 【0056】

組換え E q u c 1 5 k を精製するために、回収した細胞を 20 mM のトリス - H C l (pH 8.0) 中に再懸濁し、懸濁液をエマルシフレックス (Emulsiflex) C5 ホモジナイザー (アベスチン (Avestin), カナダ国オンタリオ州オタワ) に 10000 ~ 15000 k P a で通過させて溶解させた。懸濁液を遠心分離した後、ペレット化した封入体を 6 M 塩酸グアニジン、20 mM トリス (pH 8.0)、0.5 M の N a C l、5 mM のイミダゾールに溶解させ、0.45  $\mu$ m の混合型のセルロースフィルター (ミリポア) を通過させてろ過した。ろ過した上清を N i S O <sub>4</sub> を充填したキレート化セファロース F F カラム (G E ヘルスケアライフサイエンス) に入れた。6 M 尿素を含む 20 mM のトリス - H C l (pH 8.0)、0.15 M の N a C l、20 mM のイミダゾールを用いてカラムを洗浄し、続いて同じ緩衝液中の 6 M ~ 2 M 尿素の直線的な濃度勾配でその場で復元した。復元させた後、同じ緩衝液中の 20 ~ 500 mM のイミダゾールの直線的な濃度勾配によって組換えタンパク質を溶出させた。Q セファロース<sup>T M</sup> F F カラム (G E ヘルスケアライフサイエンス) を用いた 20 mM のトリス - H C l (pH 8.0) での A I E C によってさらなる組換えタンパク質の精製を行った。0 ~ 0.5 M の N a C l の直線的な濃度勾配を用いてタンパク質を溶出させ、S D S - P A G E の結果に従って分画をプールした。280 nm における吸光度から 1 mg / mL あたり 0.44 の吸光係数により計算して最終的な調製物のタンパク質濃度を決定した。

## 【0057】

組換え E q u c 1 5 k への I g E 結合の評価

組換え E q u c 1 5 k を実験用イムノCAP<sup>T M</sup> に固定し、説明されている通りに、36人のウマ鱗屑に感作された被験者の血清に対する I g E の反応性を決定した (Marknell DeWitt et al. 2002)。

## 【0058】

精製した天然 E q u c 1 5 k への I g E 結合と組換え E q u c 1 5 k への I g E 結合との間に優れた一致がみられたことから ( $r = 0.98$ ) (図7)、組換えタンパク質は免疫学的に活性であり、天然型タンパク質に構造的に類似していることが実証される。これらのデータから、同定されたゲノム配列情報から予測された E q u c 1 5 k の 5 k D a (配列番号4) および 10 k D a (配列番号5) フラグメントのアミノ酸配列は正しく、精製したウマ鱗屑アレルギー E q u c 1 5 k のアミノ酸配列を示すという強い証拠が示される。

## 【0059】

実施例7：ウマアレルギー患者の同齡集団における n E q u c 1、n E q u c 2、n E q u c 3、n E q u c 4 / 5 および E q u c 1 5 k への I g E 結合活性の評価

この研究には、スペイン ( $n = 20$ ) およびスウェーデン ( $n = 5$ ) からの 25人のウマアレルギーの被験者の血清が用いられた。全ての患者は、喘息、鼻結膜炎およびじんましんなどの症状、ならびにウマ鱗屑抽出物に対する皮膚プリックテスト陽性を有するウマアレルギーという医者の診断を受けていた。サンプルおよびデータが寄託されているバイオバンクに寄与する各センターにおける地域倫理委員会の承認の元に、全てのサンプルおよび臨床データを回収した。

10

20

30

40

50

## 【0060】

イムノCAP<sup>TM</sup>を用いて、25人のウマアレルギーの被験者における、ウマ鱗屑抽出物、nE q u c 1、nE q u c 2、nE q u c 3およびnE q u c 4 / 5およびrE q u c 1 5 kに特異的なI g E抗体のレベルを決定した(図8,表3)。表3に、全てのイムノCAP<sup>TM</sup>レベルをkU A / Lで示し、各患者の出身国はE S (スペイン)またはS E (スウェーデン)のように表示した。ウマに曝露された際に記録されたアレルギー症状は、鼻炎(r h i n)、喘息(a s t m)、じんましん(u r t)またはアナフィラキシー(a n a p h)である。

## 【0061】

試験した25人の血清のなかでも、12人(48%)がrE q u c 1 5 kに対して、16人(64%)がnE q u c 2に対して、19人(76%)がnE q u c 1に対して0.35kU A / L以上のI g E反応を示した。nE q u c 3およびnE q u c 4 / 5はいずれも、調査した被験者のなかでも、調査された血清のそれぞれわずか5人(20%)および7人(28%)しかI g E抗体との結合を示さなかったことから、主要ではないアレルギーのようである。25人の血清(16%)のうち4種が、もっぱらE q u c 1 5 kのみと反応した。全てのE q u c 1 5 k反応性を示す血清を平均すると、E q u c 1 5 kに対するI g E抗体の濃度は、ウマ鱗屑に対するI g E抗体の濃度の37%になった。それに相当するnE q u c 1に対するI g E抗体の相対濃度は、これらのアレルギーに特異的な反応性を示す血清において52%であり、それに対してnE q u c 2、nE q u c 3およびnE q u c 4 / 5については、相対濃度はそれぞれ35%、69%および9%であった。25人の血清中24種がウマ鱗屑抽出物に対するI g E抗体結合を示した。これら血清はいずれも、試験された5種それぞれのウマアレルギーのうち少なくとも1種への結合を示した。個々の構成要素に対するI g E結合レベルの合計は、ウマ鱗屑抽出物に対するI g E結合レベルと一致するか、または、それよりも高かった。

## 【0062】

実施例8：E q u c 1 5 k、および、ネコ由来のセクレトグロビン、主要なネコアレルギーゲンF e l d 1への個別の感作

E q u c 1 5 kはセクレトグロビタンパク質ファミリーに属することから、同じタンパク質ファミリーに属する主要なネコアレルギーゲンであるF e l d 1との免疫学的な関係を調査した。36人のウマ鱗屑に感作された被験者(実施例7で説明した25人のウマアレルギー患者を含む)の血清におけるF e l d 1に対するI g E結合のレベルを評価した。組換えE q u c 1 5に対するI g EレベルとrF e l d 1に対するI g Eレベルとの間に有意な相関( $r = 0.36$ )は観察されず(図9)、これは、E q u c 1 5 kに対するI g E抗体反応は、主としてE q u c 1 5 kおよびF e l d 1間の交差反応性の結果によるものではない(逆もまた同様)ことを示唆している。

## 【0063】

E q u c 1 5 kとF e l d 1との交差反応性の可能性をさらに調査するために、F e l d 1とE q u c 1 5 kの両方に対して有意なI g E抗体結合反応性を示す8人の血清を、固相上のrE q u c 1 5 kおよびrF e l d 1の両方、阻害剤として最終濃度100 $\mu$ g / m lの加えてnE q u c 1 5 kおよびrF e l d 1を用いて交差阻害に関して試験した(図10)。阻害コントロールとして、I g E希釈剤(ファディア)を用いた。二連での各阻害の測定値の平均を計算し、阻害の比率を、各阻害剤で抑制することができる希釈阻害剤を用いた結合の比率として計算した。これらの選択した血清において、F e l d 1による阻害は、固相上のF e l d 1に結合したときだけ達成が可能であった。同様に、E q u c 1 5 kを用いた阻害は固相上のE q u c 1 5 kにおいてのみ可能であったが、これは、これらの被験者において、これらの分子に対する感作は互いに独立して起こっており、交差反応性の結果ではないことを示す。しかしながら、これら2種のタンパク質間に弱い交差反応性の存在を完全に除外することはできない。

## 【0064】

10

20

30

40

【 表 1 】

番号	ウマ鱗屑	nEqu c 1 A	nEqu c 4/5	nEqu c 2	構成要素全部	構成要素の比率(%)
A1	44,25	4,39	0,18	0,63	5,21	12%
A2	17,08	7,96	0,83	1,40	10,20	60%
A3	136,97	58,75	14,99	30,51	104,24	76%
A4	11,57	1,82	0,14	0,13	2,09	18%
A5	10,43	6,47	0,20	0,54	7,21	69%
A6	12,86	2,34	0,12	4,96	7,42	58%
A7	9,19	5,60	1,15	1,12	7,87	86%
A8	7,26	3,37	0,17	2,07	5,60	77%
A9	11,34	4,69	1,11	1,90	7,70	68%
A10	33,75	3,65	0,26	20,01	23,92	71%
A11	7,39	1,09	5,34	0,85	7,28	99%
A12	42,79	26,87	1,06	6,34	34,27	80%
A13	0,45	0,06	0,07	0,26	0,39	87%
A14	36,70	13,32	4,25	9,41	26,98	74%
A15	16,94	3,73	0,11	2,78	6,63	39%
A16	1,01	3,05	0,07	0,10	3,22	319%
A17	4,97	1,36	0,42	2,03	3,81	77%
A18	13,40	6,10	0,15	0,91	7,16	53%
A19	7,14	2,36	0,08	0,10	2,54	36%
A20	5,20	0,24	0,50	0,20	0,94	18%
A21	32,75	16,16	0,24	0,87	17,27	53%
A22	13,46	3,49	0,15	0,74	4,38	33%
A23	15,28	5,09	0,16	4,30	9,55	62%
A24	198,77	130,15	94,19	87,00	311,33	157%
A25	42,70	11,66	7,05	13,30	32,01	75%
A26	6,55	3,23	0,36	1,77	5,36	82%
A27	27,61	8,55	0,24	5,86	14,65	53%
A28	8,43	4,85	0,14	0,13	5,11	61%
A29	27,12	12,81	0,67	3,29	16,77	62%

【 0 0 6 5 】

10

20

30

【表 2】

番号	分画A	分画B	分画C	ウマ鱗屑	構成要素全部
A1	0,16	3,54	17,82	<b>44,25</b>	5,21
A4	0,10	1,28	1,09	<b>11,57</b>	2,09
A6	0,00	4,94	6,80	<b>12,86</b>	7,42
A15	0,25	2,64	3,73	<b>16,94</b>	6,63
A18	0,06	4,01	6,06	<b>13,40</b>	7,16
A19	0,05	1,08	1,97	<b>7,14</b>	2,54
A20	0,00	1,93	1,67	<b>5,20</b>	0,94
A21	0,09	21,23	25,99	<b>32,75</b>	17,27
A22	0,05	8,45	11,75	<b>13,46</b>	4,38
A27	0,50	14,11	15,39	<b>27,61</b>	14,65

10

【 0 0 6 6 】

【表 3】

患者番号	症状	出身国	e3	nEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4/5	rEqu c 15k
1	Rhin	SE	1,55	0,06	0,21	0,12	0,30	1,31
2	Rhin, astm	SE	1,28	1,24	0,56	0,00	0,16	0,03
3	Rhin	ES	4,79	1,42	0,13	0,00	0,04	1,89
4	Rhin, astm	ES	5,87	4,96	2,32	0,07	0,53	0,16
5	Rhin, astm	ES	1,79	1,28	0,26	0,01	0,15	0,04
6	Rhin, astm	ES	8,74	5,41	5,56	0,00	0,34	0,02
7	Rhin, astm	ES	0,21	0,00	0,02	0,00	0,02	0,20
8	Rhin, astm	ES	4,55	1,41	2,02	0,00	0,53	0,86
9	Rhin	ES	0,55	0,00	0,01	0,00	0,02	0,63
10	Rhin, astm, urt, anaph	ES	17,31	6,20	2,67	11,90	3,11	6,07
11	Rhin	ES	16,62	1,30	15,15	5,04	0,86	0,10
12	Rhin, urt	ES	13,49	2,91	1,19	0,03	0,30	12,96
13	Rhin, astm, urt	SE	26,19	11,04	7,48	0,05	2,94	5,68
14	Rhin	SE	6,58	3,42	1,08	0,01	0,48	1,16
15	Rhin, astm	SE	7,01	0,03	0,04	0,04	0,20	7,45
16	Rhin	ES	6,78	5,77	0,95	9,43	0,28	0,02
17	Rhin	ES	28,73	21,92	5,89	33,75	1,19	0,24
18	Rhin, urt	ES	13,81	5,44	14,10	0,05	0,13	0,07
19	Rhin, astm	ES	5,18	0,06	0,08	0,06	0,18	5,81
20	Rhin, astm	ES	0,78	0,76	0,09	0,01	0,02	0,02
21	Rhin, astm	ES	1,96	1,63	0,58	0,01	0,16	0,04
22	Rhin, urt	ES	1,28	0,24	1,75	0,01	0,02	0,06
23	Rhin, astm	ES	6,94	2,49	0,30	0,00	0,10	1,36
24	Rhin, astm	ES	3,18	1,46	1,31	0,00	0,13	0,60
25	Rhin	ES	7,78	5,46	1,32	4,61	0,08	0,03

20

30

【 0 0 6 7 】

配列表

【 0 0 6 8 】

40

【表 4】

SEQUENCE LISTING

	<u>SEQ ID NO: 1</u>	
5	ATCPAVATDIASFFLLPDSL	
	<u>SEQ ID NO: 2</u>	10
	GSGCQLLEDVVEKTITAELS	
10	<u>SEQ ID NO: 3</u>	
	QCINEISAGDRYIITETLGK	
	<u>SEQ ID NO: 4</u>	
15	ATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKLQLIKYOAPPEAKDATMQVKQCINEIS	
	AGDRYIITETLGKIVLQCGA	20
	<u>SEQ ID NO: 5</u>	
20	GSGCQLLEDVVEKTITAELESPAEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQLKQCYLKQSNETLNDFRTM	
	MNSMYSAYCALF	
	<u>SEQ ID NO: 6</u>	
	MRLFLPVLLVTLALCCCEATNAATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKLQLIKYOAPPEAKDATMQV	
	KQCINEISAGDRYIITETLGKIVLQCGA	
25	<u>SEQ ID NO: 7</u>	30
	MKLVTVLMMLVAFPLYCYAGSGCQLLEDVVEKTITAELESPAEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQL	
	KQCYLKQSNETLNDFRTMMNSMYSAYCALF	
	<u>SEQ ID NO: 8</u>	
30	MATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKLQLIKYOAPPEAKDATMQVKQCINEIS	50
	AGDRYIITETLGKIVLQCGAGGGGSGGGGSGGGGSGSGCQLLEDVVEKTI	100
	TAELESPAEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQLKQCYLKQSNETLNDFRTMMNS	150
	MYSAYCALFLEHHHHH	168
	<u>SEQ ID NO: 9</u>	40
35	ATGGCCACGTGCCCTGCAGTCGCTACGGACATCGCATCGTTCTTCTTGCTGCC	
	GGACAGCCTGTTTAAGCTGCAACTGATCAAATATCAGGCTCCGCCGGAGGCCAAAGACGC	

## 【表 5】

GACCATGCAGGTTAAGCAGTGCATCAACGAGATTAGCGCGGGTGATCGCTATATCATTAC  
 CGAAACCCTGGGCAAGATTGTGTTGCAGTGCGGTGCCGGTGGCGGTGGTTCCGGCGGTGG  
 CGGCAGCGGTGGTGGTGGCAGCGGTAGCGGCTGTCAACTGCTGGAAGATGTTGTGGAGAA  
 AACGATTACCGCGGAGCTGAGCCCGGCTGAATATGTGAGGCGGTTTCAGGAGTTTATTCC  
 5 GGACGAGGCAACTGAAAAAGCAGCGATCCAAGCAGTGTACCTGAAACAAAGCAA  
 CGAAACCCTGAACGATTTTCGTACCATGATGAATAGCATGTACAATTCTGCGTACTGTGC  
 GCTGTTCCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

10

10

## 【 0 0 7 0 】

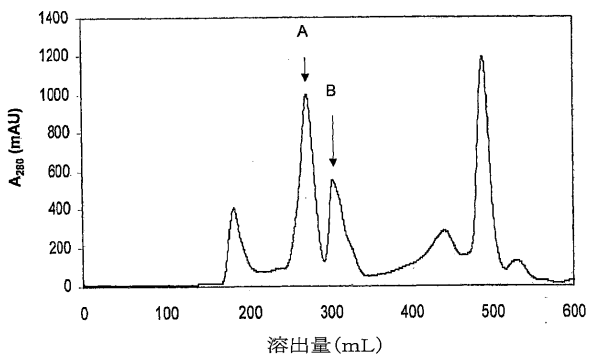
## 参考文献

- Akdis, C. A. (2006). "Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease." Curr Opin Immunol 18(6): 718-726.
- Akdis, M. and C. A. Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." J Allergy Clin Immunol 119(4): 780-791.
- Breiteneder, H., K. Hoffmann-Sommergruber, et al. (1997). "Recombinant allergens; basic and practical considerations." Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut - Bundesamt für Sera und Impfstoffe - Zu Frankfurt Am(91): 80-86. 20
- Cabanas, R., M. C. Lopez-Serrano, et al. (2000). "Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens." Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 10(2): 71-77.
- Cromwell, O., H. Fiebig, et al. (2006). "Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies." Immunol Allergy Clin North Am26(2): 261-281, vii.
- Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.C1, the Horse Major Allergen." Journal of Chromatography-Biomedical Applications 621(1): 23-31. 30
- Demoly, P., B. Lebel, et al. (2003). "Allergen-induced mediator release tests." Allergy58(7): 553-558.
- Ebo, D. G., M. M. Hagendorens, et al. (2004). "In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? [Review]." Clinical & Experimental Allergy 34(3): 332-339.
- Goubran Botros, H., C. Gregoire, et al. (1996). "Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies." Immunology 88(3): 340-347.
- Goubran Botros, H., P. Poncet, et al. (2001). "Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens." Eur J Biochem 268(10): 3126-3136. 40
- Goubran Botros, H., J. Rabillon, et al. (1998). "Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat." Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications 710(1-2): 57-65.
- Gregoire, C., I. Rosinski-Chupin, et al. (1996). "cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily." Journal of Biological Chemistry 271(51): 32951-32959.
- Gronlund, H., T. Saarne, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." Int Arch Allergy Immunol 151(4): 265-274. 50

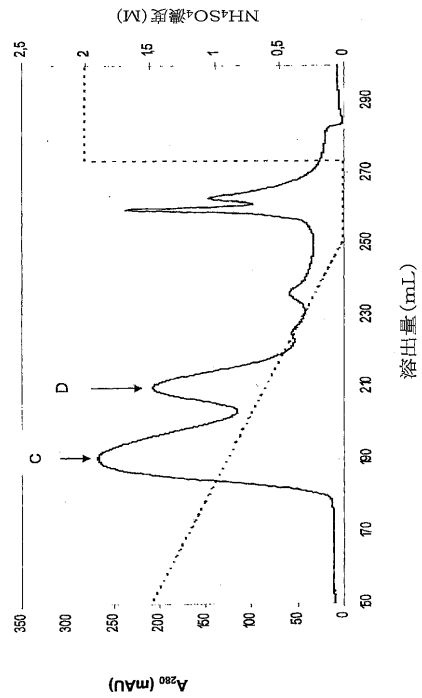
- Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." FASEB Journal 16(3): 414-416.
- Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." J Allergy Clin Immunol 116(3): 608-613.
- Kim, J. L., L. Elfman, et al. (2005). "Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment." Indoor Air 15(3): 170-182.
- Klug, J., H. M. Beier, et al. (2000). "Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report." Ann N Y Acad Sci 923: 348-354.
- Liccardi, G., G. D'Amato, et al. (2011). "Sensitization to Horse Allergens in Italy: A Multicentre Study in Urban Atopic Subjects without Occupational Exposure." Int Arch Allergy Immunol 155(4): 412-417. 10
- Marknell DeWitt, A., V. Niederberger, et al. (2002). "Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11." Clinical & Experimental Allergy 32(9): 1329-1340.
- Mattsson, L., T. Lundgren, et al. (2009). "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen." J Allergy Clin Immunol 123(2): 362-368.
- McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." PLoS One 4(5): e5726.
- Ronmark, E., M. Perzanowski, et al. (2003). "Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies." Pediatr Allergy Immunol 14(2): 91-99. 20
- Saarelainen, S., M. Rytönen-Nissinen, et al. (2008). "Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity." Clin Exp Allergy 38(2): 374-381.
- Saarne, T., L. Kaiser, et al. (2005). "Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1." Clin Exp Allergy 35(5): 657-663.
- Smith, W., A. J. Butler, et al. (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." Clinical & Experimental Allergy 34(11): 1732-1738. 30
- Spitzauer, S., C. Schweiger, et al. (1993). "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting." International Archives of Allergy and Immunology 100: 60-67.
- Stumvoll, S., K. Westritschnig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology 111(5): 974-979.
- Tutluoglu, B., S. Atis, et al. (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." Clin Exp Allergy 32(8): 1170-1173.
- Wainstein, B. K., A. Yee, et al. (2007). "Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children." Pediatr Allergy Immunol 18(3): 231-239. 40
- Valenta, R., J. Lidholm, et al. (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." Clinical and Experimental Allergy 29(7): 896-904.
- Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." J Allergy Clin Immunol 119(4): 826-830.
- Valenta, R., T. Twaroch, et al. (2007). "Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area." J Investig Allergol Clin Immunol 17 Suppl 1: 36-40.
- van Eijk, H. M., D. R. Rooyackers, et al. (1999). "Automated isolation of high- 50

purity plasma albumin for isotope ratio measurements." Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications 731(2): 199-205.

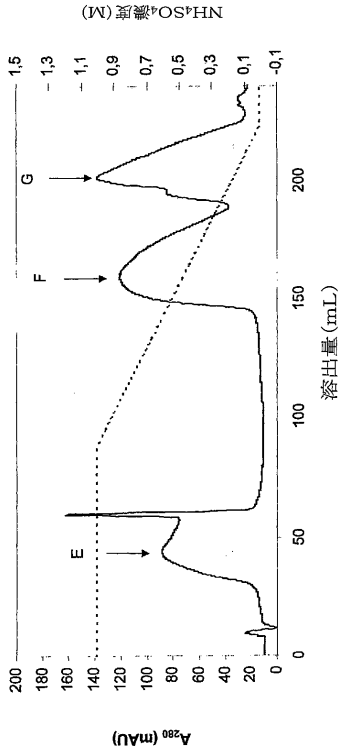
【 図 1 A 】



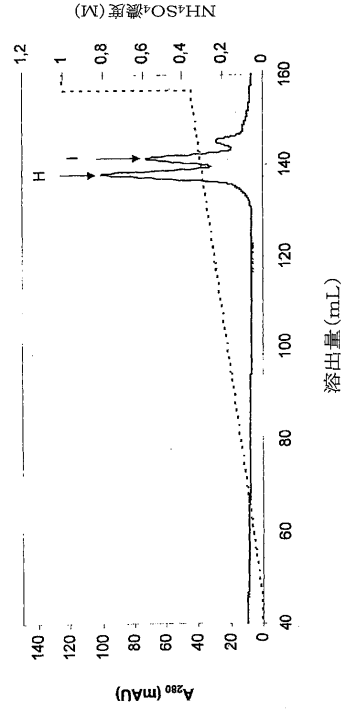
【 図 1 B 】



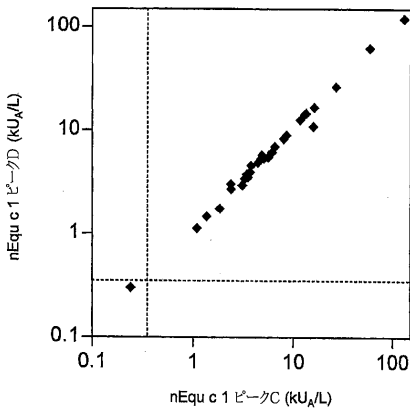
【 図 1 C 】



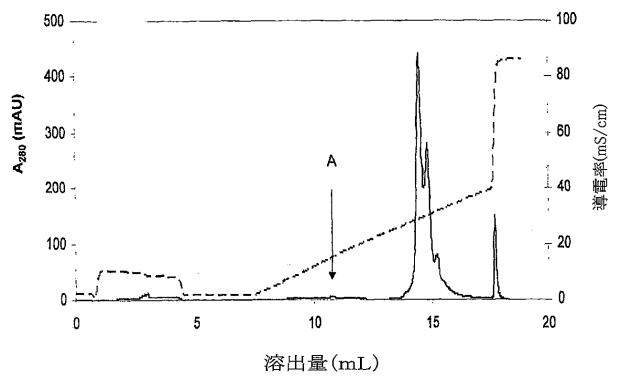
【 図 1 D 】



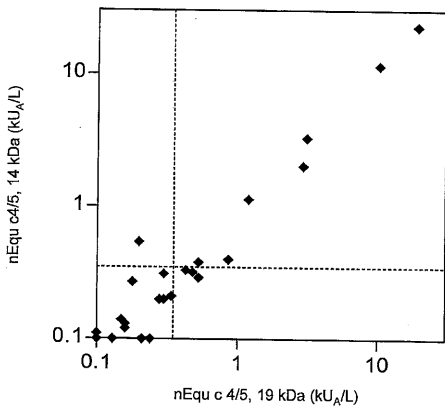
【 図 2 A 】



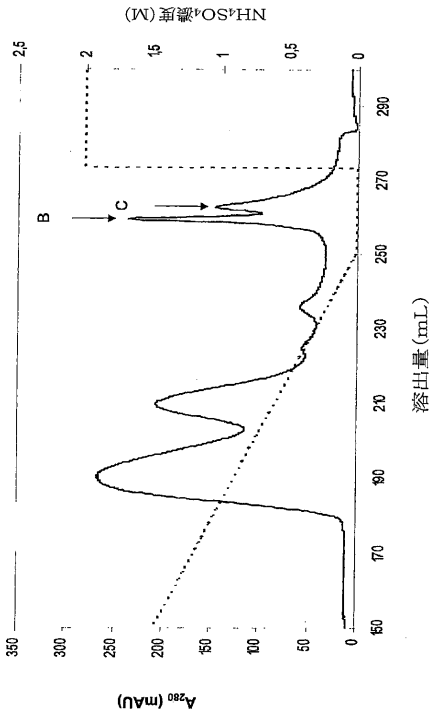
【 図 3 A 】



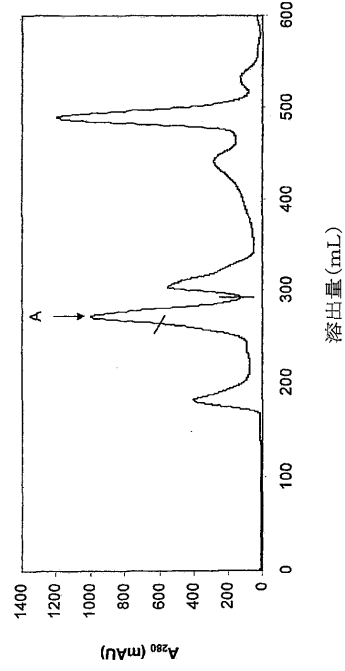
【 図 2 B 】



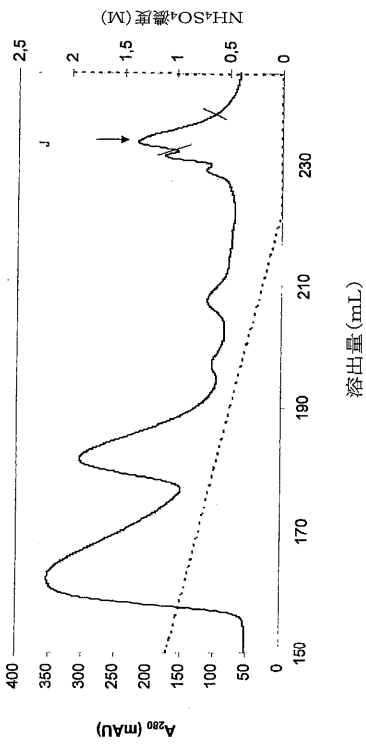
【図 3 B】



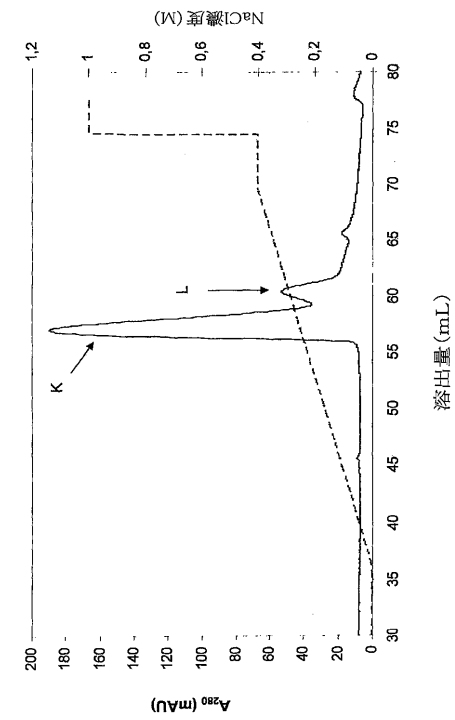
【図 4 A】



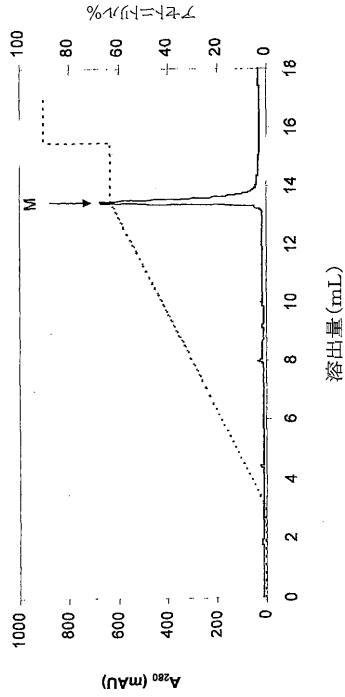
【図 4 B】



【図 4 C】



【 図 4 E 】



【 図 5 】

Equ c 15k - 5 kDa フラグメント

予測の全長前駆配列:

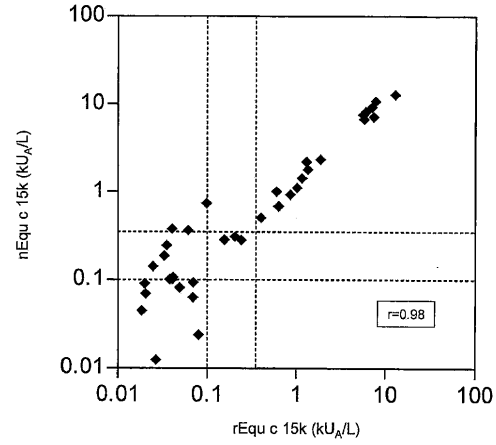
MRLFLPVLLVTLALCCCEETNAATCPAVATDIASFFLLPDSLFKLQLIKYQAPPEAKDA  
 TMQVKQCINEISAGDRYIITETLGGKIVLQCGA

Equ c 15k - 10 kDa フラグメント

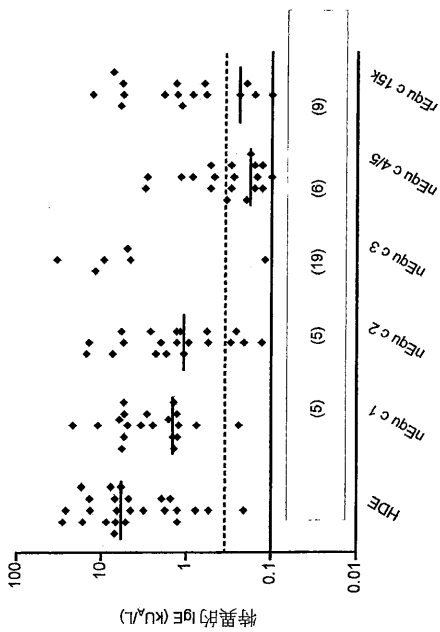
予測の全長前駆配列:

MKLVTVLMLVAFPPLYCYAGSGCQLLEDVVEKTTITAELESPAEVVEAVQEFIPDEATEK  
 AAIQLKQCYLKQSNETLNDFRMTMMNSMYNSAYCALF

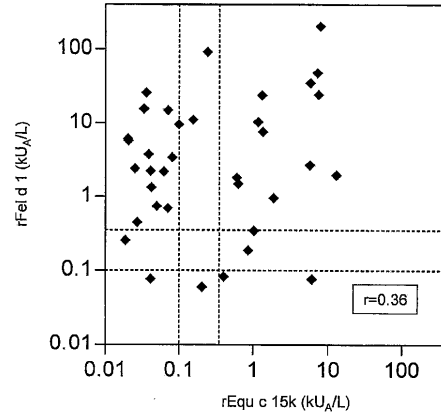
【 図 7 】



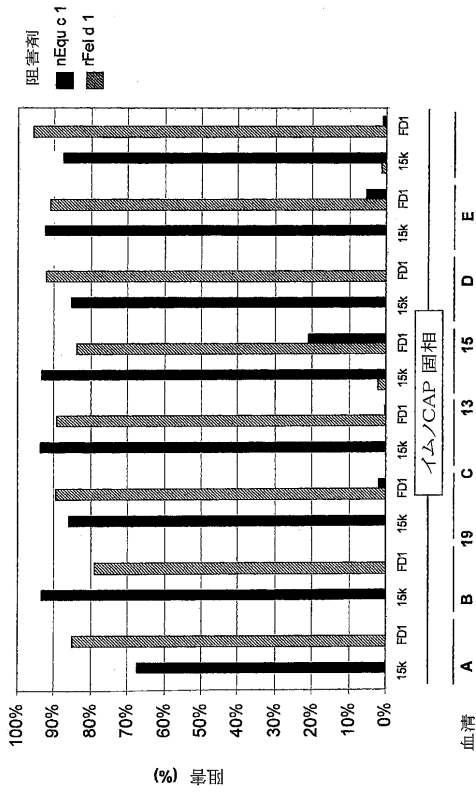
【 図 8 】



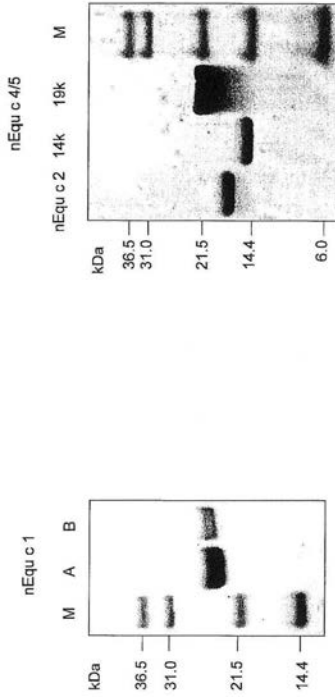
【 図 9 】



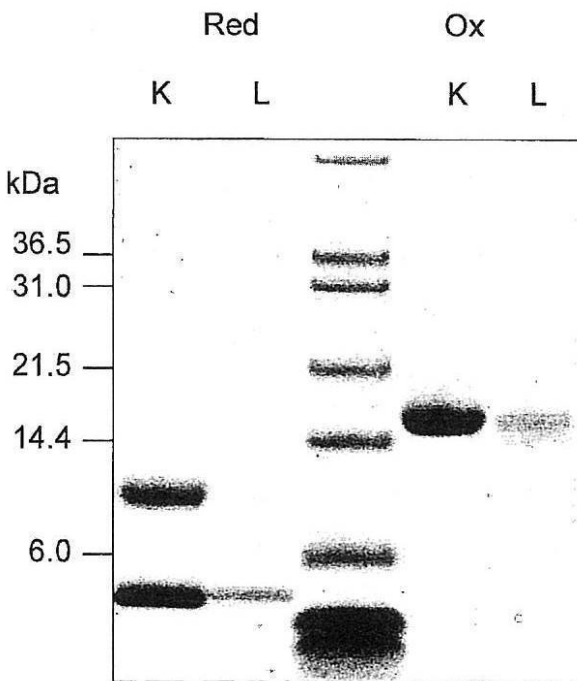
【 図 1 0 】



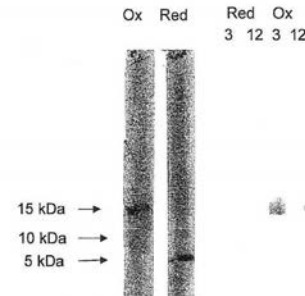
【 図 1 E 】



【 図 4 D 】



【 図 6 】



【配列表】

2016175891000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Q
G 0 1 N	33/564 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/564	Z
		G 0 1 N	33/531	A

(72)発明者 マットソン,ラルス  
スウェーデン国 7 5 7 5 4 ウプサラ,ゴットランドスレサン 1 4 6

(72)発明者 リドホルム,ヨナス  
スウェーデン国 7 4 1 4 2 クニヴスタ,ビヨルクナースヴェーイエン 9

(72)発明者 ルンドグレン,トーマス  
スウェーデン国 7 5 2 6 0 ウプサラ,ステンハグスヴェーイエン 1 0 2

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 CA01 CA05 DA06 EA04 GA11 HA08 HA09 HA19  
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA46  
4C085 AA03 BB03 CC04 DD31 DD62 EE01  
4H045 AA11 AA30 CA40 CA42 DA86 EA50 FA34 FA74 GA23 GA25  
GA26 HA05

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016175891A5</a>	公开(公告)日	2016-12-22
申请号	JP2016029444	申请日	2016-02-19
申请(专利权)人(译)	Phadia - Akuchiboragu		
[标]发明人	マツソンラルス リドホルムヨナス ルンドグレントーマス		
发明人	マツソン,ラルス リドホルム,ヨナス ルンドグレン,トーマス		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/09 C12N15/00 C12N1/21 A61K39/35 A61P37/08 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/531		
CPC分类号	A61K39/35 A61P37/08 C07K14/47 G01N33/6854 G01N2800/24 A61K2039/577		
FI分类号	C07K14/47 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C12N1/21 A61K39/35 A61P37/08 G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/564.Z G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA19 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BB03 4C085/CC04 4C085/DD31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA25 4H045/GA26 4H045/HA05		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中滨 明子		
优先权	1050406 2010-04-23 SE		
其他公开文献	JP2016175891A JP6280578B2		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供来自哺乳动物的新的变应原，以及诊断和治疗对哺乳动物过敏的方法。解决方案：孤立的马变应原是在非还原条件下具有15kDa分子量的分泌球蛋白，并且包含第一肽链其具有约5kDa的分子量和具有约10kDa的分子量的第二肽链，其连接在一起。还公开了与马变应原共享抗体表位的变体和片段。还公开了变应原在诊断和治疗中的用途以及含有变应原的诊断试剂盒和药物组合物。选择的附图：无