

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265745号  
(P5265745)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.	F 1	
<b>C 0 7 K 14/435 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/435	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02	C
<b>A 6 1 K 39/35 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/35	
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	

請求項の数 12 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-216515 (P2011-216515)  
 (22) 出願日 平成23年9月30日(2011.9.30)  
 (62) 分割の表示 特願2001-541021 (P2001-541021)  
 の分割  
 原出願日 平成12年11月27日(2000.11.27)  
 (65) 公開番号 特開2012-87119 (P2012-87119A)  
 (43) 公開日 平成24年5月10日(2012.5.10)  
 審査請求日 平成23年9月30日(2011.9.30)  
 (31) 優先権主張番号 199 57 904.0  
 (32) 優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 591032596  
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ  
 ト ベシュレンクテル ハフツング  
 Merck Patent Gesell  
 schaft mit beschrae  
 nkter Haftung  
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ  
 ルムシュタット フランクフルター シュ  
 トラーセ 250  
 Frankfurter Str. 25  
 0, D-64293 Darmstadt  
 , Federal Republic o  
 f Germany  
 (74) 代理人 100123788  
 弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g E 反応性の低減した昆虫毒アレルゲンおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然アレルゲンと比較して I g E 反応性の低減した、細菌中で組換えにより調製され、蒸留水に可溶である、*Vesputula vulgaris* または *Vesputula germanicas* に由来する可溶性スズメバチ毒アレルゲン抗原 5 であって、

該抗原は、封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、

該封入体は、還元剤を加えることなく変性し、

該変性により得られた変性体を、還元剤を含まない酸性緩衝液を用いて透析することにより、可溶性単量体アレルゲンとし、および

蒸留水に対して更なる透析を行う、

工程により得られることを特徴とする、スズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 2】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項 1 に記載のスズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 3】

前記透析が pH 3 . 5 から 6 . 5 の間の緩衝液で行われる、請求項 1 または 2 に記載のスズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載のスズメバチ毒アレルゲン抗原 5、対応するアジュバント、および賦形剤を含む医薬組成物。

## 【請求項 5】

特定の免疫療法又は減感作療法のための、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のスズメバチ毒アレルギー抗原 5 の使用。

## 【請求項 6】

天然アレルギーに匹敵する I g E 反応性を有し、細菌中で組換えにより調製され、蒸留水に可溶である、Ves p u l a v u l g a r i s または Ves p u l a g e r m a n i c a s に由来する可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原 5 であって、

該抗原は、封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、

該封入体は、還元剤を加えることなく変性し、

該変性により得られた変性体を、システイン含有溶液を用いて透析することにより、可溶性単量体アレルギーとし、および

蒸留水に対して更なる透析を行う、

工程により得られることを特徴とする、スズメバチ毒アレルギー抗原 5。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載のスズメバチ毒アレルギー抗原 5 を使用して、該抗原に特異的に刺激される T 細胞をインビトロ ( i n v i t r o ) で検出する方法。

## 【請求項 8】

天然アレルギーと比較して I g E 反応性の低減した、蒸留水に可溶である Ves p u l a v u l g a r i s または Ves p u l a g e r m a n i c a s に由来する可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原 5 の調製方法であって、

アレルギータンパク質を封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、

得られた不溶凝集物を還元剤を加えることなく変性し、

該変性により得られた変性体を、酸性緩衝液を用いて透析することにより、可溶性単量体アレルギーとし、および

蒸留水を用いてさらなる透析を行う、

ことを特徴とする調製方法。

## 【請求項 9】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項 8 に記載の調製方法。

## 【請求項 10】

前記透析が、pH 3 . 5 から 6 . 5 の間の緩衝液で行われる、請求項 8 または 9 に記載の調製方法。

## 【請求項 11】

天然アレルギーに匹敵する I g E 反応性を有する、蒸留水に可溶である Ves p u l a v u l g a r i s または Ves p u l a g e r m a n i c a s に由来する可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原 5 の調製方法であって、

アレルギータンパク質を封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、

得られた不溶凝集物を還元剤を加えることなく変性し、

該変性により得られた変性体を、システイン含有溶液を用いて透析することにより、可溶性単量体アレルギーとし、および

蒸留水を用いてさらなる透析を行う、

ことを特徴とする調製方法。

## 【請求項 12】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項 11 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、製造方法の効率に応じて天然と同一または天然と反対の折りたたみ構造 (コンフォメーション) による分化が可能な組換え昆虫毒アレルギーおよびこれをターゲットとするその製造方法に関する。

## 【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【0002】

アレルギー患者、特に昆虫毒アレルギー患者の単一アレルゲン分化診断法(インビトロ(in vitro)またはインビボ(in vivo))では、天然分子に対応する折りたたみ形が用いられる。

## 【0003】

天然と反対の折りたたみ形は特定の免疫的治療のために副作用の少ない薬剤として用いることができる。したがってこれらの組換え折りたたみ変異体によれば天然品よりも安全な治療が行える。本発明の方法は生物工学的な製造が医薬品に必要な条件(GMP)下に行えるように設計されている。

## 【0004】

昆虫刺毒アレルギーは主としてスズメバチやミツバチによって引き起こされ、重大な全身症状あるいは場合によっては致命的なアナフィラキシーをもたらすこともある(Muller, U. R.: Insect stinging allergy, Gustav Fischer Verlag; 1990)。タイプ1のアレルギーを誘発する物質は、昆虫毒のタンパク質、糖タンパク質またはポリペプチドである。これらのアレルゲンは注入後、感作された人間においてマスト細胞表面に結合したIgE分子と反応する。このタイプのFcRI結合IgE分子がアレルゲンによって互いに架橋すると、結果としてエフェクター細胞の働きによりメディエーター(例えば、ヒスタミン、ロイコトリエン)やサイトカインが放出されこれらに対応した臨床症状が発生する。

## 【0005】

ペプチドであるメリチンに加え酵素のヒアルロニダーゼおよびホスホリパーゼA2がミツバチ毒のアレルゲン性成分として働く(Habermann, E., 1972, Science 177, 314-322)。スズメバチの場合も同様に、主要な酵素的に活性なアレルゲンはハチ毒におけるものと類似したヒアルロニダーゼ(Hoffmann, D. R., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 337-343)およびホスホリパーゼA1である。スズメバチ毒の最も重要な主要アレルゲンは抗原5であり、これは現在までのところ酵素活性は検出されていない(King他、1978, Biochemistry 17, 5165-5174)。これらのアレルゲンはすべて分子生物学的に同定されており、対応するcDNA分子はクローン化されている(特に、Fang他、1988, PNAS, 895-899; Soldatova他、1993, FEBS, 145-149; Kuchler他、1989, Eur. J. Biochem. 184, 249-254)。cDNA配列を利用するとアレルギーの診断および治療に用い得る組換えアレルゲンを製造することが可能である(ScheinerおよびKraft, 1995, Allergy 50, 384-391、非特許文献1)。

## 【0006】

本発明との関係では主要なアレルゲンである抗原5が特に重要である。なぜなら本発明はこの分子を例として用いているからである。これは約25kDaの大きさの非グリコシル化タンパク質である。一次配列は8つのシステイン残基を含むが、これは4個のジスルフィド架橋部があることを示すものである(Hoffman, D. R., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 707-716)。昆虫毒アレルギーを効果的に治療するための古典的アプローチは特定の免疫療法すなわち減感作療法である(Muller, U. R.: Insect stinging allergy, Gustav Fischer Verlag; 1990)。この方法では投与量を増大させつつ天然アレルゲン抽出物を患者に皮下注射する。

## 【0007】

しかしながら、この方法はアレルギー反応、場合によってはアナフィラキシーショックを起こすリスクを伴う。昆虫刺毒の減感作療法は特に強い反応が予想され得るため、治療は現在入院治療に限って行われる。

## 【0008】

組換え法により製造されたアレルゲンをを用いた治療の最適化は特に昆虫刺毒アレルギー

10

20

30

40

50

の場合に可能でありうる。組換え法により製造された高純度アレルゲンの、場合によっては患者の個人感作パターンに適合する、決められた多剤混合物（ScheinerおよびKraft、1995）を天然アレルゲン起源の抽出物に代えて用い得る。治療に不可欠なT細胞エピトープを損なうことなくIgEエピトープを削除した慎重に変異された組換えアレルゲン（Schramm他、1999、J. Immunol. 162、2406 - 2414、非特許文献2）によって、このタイプの組換えアレルゲンを用いたより安全な減感作療法をもたらし得る現実的な展望が得られる。

【0009】

大腸菌（E. coli）中の異種発現から、ほとんどの真核生物タンパク質は「天然の」コンフォメーションを取らず、取ったとしてもわずかであることが知られている。この不正確な折りたたみの結果、これらのタンパク質は多くの場合不溶性である。これは特にシステイン含有タンパク質において観察されている（Kuchler他、1989、Eur. J. Biochem. 184、249 - 254）。特に抗原5は細菌中での発現において天然のコンフォメーションをとらない不溶性凝集体を生じることが報告されている（Monsalve他、1999、Protein Express Purif. 16（3）：410 - 416）。このタイプの不溶性凝集体は診断や治療には用いることができない。

10

【0010】

大腸菌に不溶のタンパク質は研究目的では真核生物の発現システム（例えば酵母または昆虫細胞）でしばしば製造されている（Monsalve他、1999、Protein Express Purif. 16（3）：410 - 416；Soldatova他、1998、J. Allergy Clin Immunol 101：691 - 698）。しかし、真核生物発現システムの不利な点は、特にハイパーグリコシル化が起こり得る点（Grobe他、1999、Eur. J. Biochem 263：33 - 40）、タンパク質分解プロセスおよび収量が比較的少ない点（GloverおよびHames（編集）、1995、Expression Systems、IRL Press、Oxford - New York - Tokyo）である。したがってこのタイプのタンパク質は、通常、医薬的な診断および治療という意味ではアレルギー学的用法に適さない。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0011】

【非特許文献1】ScheinerおよびKraft、1995、Allergy 50、384 - 391

【非特許文献2】Schramm他、1999、J. Immunol. 162、2406 - 2414

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の方法による天然のコンフォメーションを有する生成物は、アレルギー疾患、特に昆虫刺毒のインビトロまたはインビボでの診断に有利に用いることができる。この天然と同一の折りたたみ形は確立された方法によりIgE抗体の検出に利用できる。

40

【0013】

一方、本発明により得られ、実質的にIgE反応性コンフォメーションを有さずまたは部分的にしか有しないものとして区別される変種は、特定の免疫療法製剤の低アレルギー性成分として用いることができる。これまでのおよび以下の記述において、「低アレルギー性」という用語は、本発明に従い、IgE反応性が低減したことによりアレルギー性が（天然アレルゲンと比較して）好ましくは5～95%、より好ましくは20～85%低減したまたはなくなっているという意味である。

【0014】

本発明は組換えアレルゲンがバクテリア（大腸菌）中で製造できる方法である。第1の

50

精製ステップは不溶性凝集タンパク質を相当に富化することによって行う。次いでこれらの不溶性凝集物を還元剤の添加なしに変性する。これに続く透析条件に応じて異なる折りたたみ形が得られる。これらの分子はモノマーで可溶性であることが重要である。第1の可溶性折りたたみ変種は天然アレルゲンに匹敵するIgE反応性を有し、したがって診断目的に用いることができる。このタイプの生成物はシステイン含有溶液を用いた透析により得られる。

【0015】

他方の可溶性折りたたみ変異体は天然のアレルゲンとは構造が異なっており、IgE反応性が低いまたはないという点で区別される。この理由でこのタイプの変種はより容易に実施できるように改良された免疫療法に適している。このタイプの低アレルギー性生成物は、本発明に従い、酸性緩衝液により好ましくはpH3.5~6.5、より好ましくはpH4.0~5.5の範囲での透析で得ることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】実施例の方法のフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明はIgE反応性またはアレルゲン性が低減されたことを特徴とする組換え昆虫アレルゲンに関する。本発明によればこれらのタンパク質のアレルゲン性は天然のアレルゲンと比較して95%まで低減される。

20

【0018】

特に本発明は、対応する組換えスズメバチ昆虫アレルゲン、特に*Vesputalgaris*および*Vesputalgaris germanica*に由来するものに関する。

【0019】

本発明はさらに、細菌細胞中でアレルゲンタンパク質を封入体として不溶な状態で製造し、前記不溶凝集物を変性し、この変性生成物を透析によって別の折りたたみコンフォメーションを有する可溶性単量体アレルゲンに変換して単離することを特徴とする実質的に純粋な組換え昆虫毒アレルゲンを単離する方法に関する。この変性は好ましくは還元剤を添加せずに塩化グアニウムを用いて行われる。

【0020】

本発明は特に、前記の透析を緩衝液、好ましくは酸性緩衝液pH4.5~5.0の酢酸ナトリウム緩衝液を用いて行うアレルゲン性またはIgE反応性が低減された組換え昆虫毒アレルゲンの単離方法に関する。

30

【0021】

しかしながら、本発明はまた前記の透析をシステイン含有溶液を用いて行う、通常のアレルゲン性またはIgE反応性を有する組換え昆虫毒アレルゲンの単離方法にも関係する。

【0022】

本発明はまた上述のおよび下記の対応する方法によって得られる組換えスズメバチ毒アレルゲンに関する。

40

【0023】

本発明はさらにIgE反応性が低減されたまたは消失した対応する組換えアレルゲンおよび対応するアジュバントおよび賦形剤を含む医薬調剤に関する。

【0024】

最後に、本発明は上述のまたは下記の対応する方法によって得られる昆虫毒アレルゲンのインビボおよびインビトロでの昆虫刺毒アレルギー診断のための使用に関する。

【実施例】

【0025】

本発明の方法を以下さらに詳細に説明する。

【0026】

50

実施例として *Vesputula vulgaris* に由来するスズメバチ毒アレルゲン抗原 5 ( *Ves v 5* ) および *Vesputula germanica* に由来する抗原 5 ( *Ves g 5* ) を発現ベクター pSE420 にクローン化し、K12 細菌株 M15 pREP4 内に形質転換した。この方法のフローチャートを図 1 に示す。

【0027】

発現培養物の接種のために株の前培養を用いて組換えアレルゲンを製造する。発現は IPTG によって誘導され、シカンフラスコ中 LB 培地において 37 °C、酸素供給制限条件 ( 90 rpm / 分 ) で行う。5 時間発現させた後、細菌を遠心分離 ( 5000 × g、10 分、20 °C ) で回収する。細胞をリゾチーム添加 ( 10 μg / g、湿潤重量 ) により緩衝液 ( 50 mM tris / HCl、25 % ( w / v ) ショ糖、pH 8.0 ) に細胞を再分散させた後、細菌の消化を行う。続いて界面活性剤溶液 ( 0.2 M NaCl、1 % ( w / v ) DOC、1 % ( w / v ) Nonidet P40 ) を等量添加する。次いでこの界面活性剤溶液を超音波 ( 氷上 3 分間、130 ワット、0.5 秒パルス ) で処理する。発現生成物は主として不溶性凝集物 ( 封入体 ) のかたちで存在するため、これらが高密度であることから、遠心分離 ( 3000 × g ) により残りの部分 ( 細胞壁断片、リボゾームなど ) の大部分から分離することができる。界面活性剤を含む溶液 ( 1 % Triton X-100 ) による洗浄を 3 回連続することによりさらなる精製を行う。次いで、精製された封入体を変性緩衝液 ( 6 M 塩化グアジニウム、20 mM tris / HCl、pH 8.0 ) の添加および室温で 2 時間振盪することにより消化する。

10

【0028】

IgE 反応性折りたたみ形を得るためには、変性バッチを透析チューブ ( 消化限界 12 ~ 14 kDa ) に導入し、室温で攪拌しながら 12 時間、システイン溶液 ( 5 mM システイン ) の 100 倍量に対して透析する。その後システインを除くためにこれを蒸留水に対して透析する。

20

【0029】

IgE 反応性が低減されたコンフォメーションを得るためには最初の透析を 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 ( pH 5.0 ) に対して行う。ここでも蒸留水に対してさらなる透析を行う。除去後水溶性アレルゲンを遠心分離により沈殿凝集物から分離する。上清は所望の可溶性組換えアレルゲンを含む。酢酸ナトリウム緩衝液の代わりに 3.5 ~ 6.5、好ましくは 4.0 ~ 5.5 の緩衝能を有する他の酸性緩衝液を用いることも可能である。このタイプの緩衝系の例は文献に適宜記載されている。

30

【0030】

いずれの方法でも沈殿した組換えアレルゲン生成物は同様なスキームに従ってさらに変性、処理することができる。これにより収量が顕著に増加する。

【0031】

透析ステップ後生成物の純度は 95 % である。塩基性昆虫毒アレルゲンのさらなる精製ステップは、例えば、Source S ( ドイツ国フライブルク所在のファルマシア ( Pharmacia ) ) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィおよびゲルろ過により行う。ゲルろ過は高分子量および低分子量の微量の不純物除去に加えて脱塩にも有効である。

40

【0032】

生成物の品質管理は以下の特徴に基づいて行う。これは抗原 5 に対して表にまとめてある。表中 n 抗原は天然抗原の意味である。

【0033】

【表 1】

性質	天然 IgE 反応性を有する折りたたみ体	IgE 反応性が低減された折りたたみ体
SDS-PAGE（非還元条件）における装置分子量	25 kDa	26～27 kDa
Source S 中の溶離のための塩濃度	320 mM NaCl	400 mM NaCl
プロテアーゼ V8 による開裂	15 kDa 断片+ペプチド	ペプチド< 10 kDa
抗原 5 特異的モノクローナル抗体	8E3、1E11 による検出	8E3 によってのみ検出可能
アレルギー患者から得た血清による IgE 反応頻度	> 95%	< 10%
アレルゲン性反応効力	n 抗原 5 に類似	>10 × n 抗原 5 未満

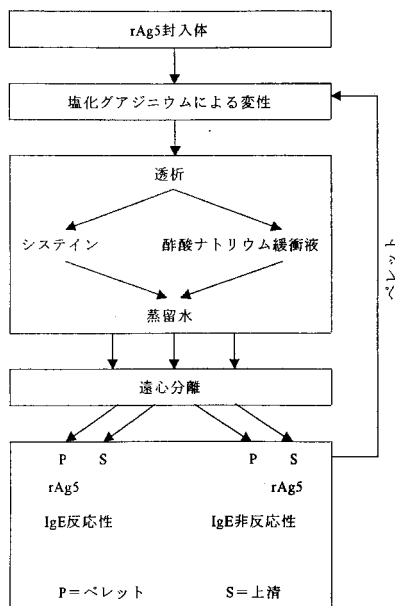
10

## 【 0 0 3 4 】

本発明による方法はすべての種類の昆虫毒アレルゲンに適している。用いた精製技術および組換えクローンおよびクローン発現技術は当業者に公知であり利用可能なものであって、さらに同様の公知の方法で置き換えることができる。

【図 1】

方法のフローチャート  
rAg5 = 組換え抗原 5



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 5/0783	(2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 L
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(74)代理人 100127454

弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 サック、 ローラント

ドイツ連邦共和国 2 2 3 0 3 ハンブルク ミューレンカンブ 1 9

(72)発明者 クロムヴェル、 オリヴァー

ドイツ連邦共和国 2 1 4 6 5 ヴェントルフ ロエンスヘーエ 2

(72)発明者 フィービク、 ヘルマット

ドイツ連邦共和国 2 1 4 9 3 シュヴァルツェンベク ベッカーヴェーク 1 0

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 特表2 0 0 4 - 5 2 5 6 0 1 ( J P , A )

J. Immunol. , 1 9 9 5 年 , 154 , p.577-84

Protein Expr. Purif. , 1 9 9 9 年 8 月 , 16(3) , p.410-6

J. Allergy Clin. immunol. , 1 9 9 8 年 , 101 , p.691-8

岡田雅人、宮崎香編、「無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノート 上 抽出と分離精製」, 1 9 9 6 年 9 月 1 0 日 , p.139-145

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 4 / 4 3 5

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S ( S T N )

P u b M e d

专利名称(译)	具有降低的IgE反应性的昆虫毒液过敏原及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5265745B2</a>	公开(公告)日	2013-08-14
申请号	JP2011216515	申请日	2011-09-30
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	サックローラント クロムヴェルオリヴァー フィービクヘルマツト		
发明人	サック、ローラント クロムヴェル、オリヴァー フィービク、ヘルマツト		
IPC分类号	C07K14/435 C12Q1/02 C12P21/02 A61K39/35 A61P37/02 A61P37/08 C12N5/0783 C12N15/09 G01N33/53 A61K39/00 C07K14/00 C12P21/00		
CPC分类号	A61K39/00 C07K14/43563 C07K14/43568		
FI分类号	C07K14/435 C12Q1/02 C12P21/02.C A61K39/35 A61P37/02 A61P37/08 C12N5/00.202.L C12N15/00. A C12N15/12 C12N5/0783		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR33 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR75 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS33 4B064/AG30 4B064 /BJ12 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE08 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BD01 4B065 /BD16 4B065/CA24 4B065/CA46 4C085/AA02 4C085/AA08 4C085/BB03 4C085/CC24 4C085/DD02 4C085/DD41 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/CA51 4H045/DA83 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA01		
代理人(译)	宫崎昭雄 绪方明		
审查员(译)	神谷正夫		
优先权	19957904 1999-12-01 DE		
其他公开文献	JP2012087119A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：根据生产方法的效率，提供可以通过天然相同或自然反向折叠（构象）区分的重组昆虫毒物过敏原。解决方案：提供一种IgE反应性或变应原性降低的重组昆虫过敏原，其包含可溶性黄蜂毒过敏原抗原5，其中抗原在细菌细胞中以不溶形式表达为包涵体，包涵体通过细菌重组制备。通过在不添加还原剂的情况下变性并通过使用含半胱氨酸的溶液透析变性体，过敏原是具有与天然过敏原相当的IgE反应性的黄蜂毒过敏原抗原5。

性質	天然 IgE 反応性を有する折りたたみ体	IgE 反応性が低減された折りたたみ体
SDS-PAGE (非還元条件) における装置分子量	25 kDa	26~27 kDa
Source S 中の溶解のための塩濃度	320 mM NaCl	400 mM NaCl
プロテアーゼ V8 による開裂	15 kDa 断片+ペプチド	ペプチド<10 kDa
抗原 5 特異的モノクローナル抗体	8E3、1E11 による検出	8E3 によってのみ検出可能
アレルギー患者から得た血清による IgE 反応頻度	>95%	<10%
アレルギー反応効力	n 抗原 5 に類似	>10 × n 抗原 5 未満