

(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2005-503113

(P2005-503113A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C12N 15/09**  
**A61K 39/36**  
**A61P 27/14**  
**A61P 37/08**  
**C07K 1/14**

F 1

C 12 N 15/00  
A 61 K 39/36  
A 61 P 27/14  
A 61 P 37/08  
C 07 K 1/14

Z N A A  
A 61 K 39/36  
A 61 P 27/14  
A 61 P 37/08  
C 07 K 1/14

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 4  
4 B 0 6 5  
4 C 0 8 5  
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 119 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-562749 (P2002-562749)  
(86) (22) 出願日 平成14年2月4日 (2002.2.4)  
(85) 翻訳文提出日 平成15年8月1日 (2003.8.1)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/003346  
(87) 國際公開番号 WO2002/063012  
(87) 國際公開日 平成14年8月15日 (2002.8.15)  
(31) 優先権主張番号 60/266,686  
(32) 優先日 平成13年2月5日 (2001.2.5)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

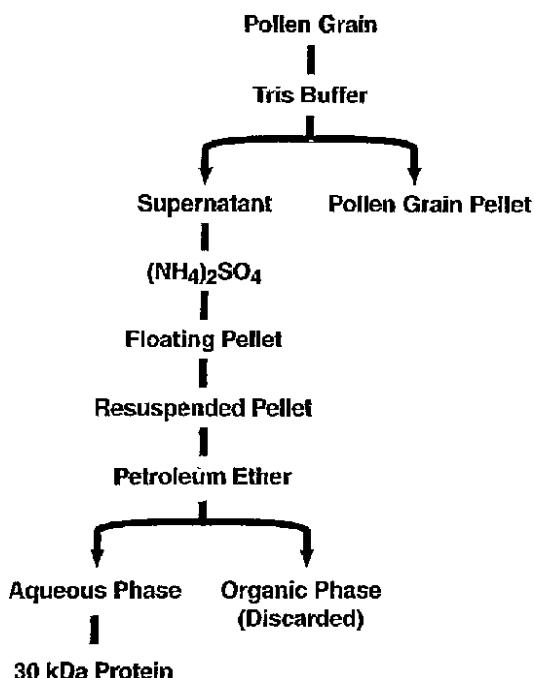
(71) 出願人 398051143  
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607-5200, オークランド, 12ティーエイチ フロア, フランクリン ストリート 1111  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔  
(74) 代理人 100118773  
弁理士 藤田 節  
(74) 代理人 100096183  
弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ブタクサアレルゲン

## (57) 【要約】

30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンをブタクサ花粉から精製した。ブタクサ感受性患者の血清を用いたIgE免疫プロットは、30kDaタンパク質が主要アレルゲンであることを示した。30kDaタンパク質はアレルギー試験および免疫療法計画において有用である。完全ブタクサ花粉から単離された30kDaジスルフィドタンパク質に加えて、8~10kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および30kDaブタクサ脱脂花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、ならびにこれらの断片、誘導体および相同体を記載する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を含んでなる単離されたタンパク質。

**【請求項 2】**

請求項1記載のタンパク質を含んでなる医薬組成物。

**【請求項 3】**

請求項1記載のタンパク質を含んでなる、花粉アレルギーを検出するための診断用組成物。

10

**【請求項 4】**

前記花粉がブタクサ花粉である、請求項3記載の診断用組成物。

**【請求項 5】**

哺乳動物における花粉アレルギーの治療方法であって、請求項1記載のタンパク質を医薬上有効な量で該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

**【請求項 6】**

前記花粉がブタクサ花粉である、請求項5記載の方法。

**【請求項 7】**

前記哺乳動物がヒトである、請求項5記載の方法。

**【請求項 8】**

花粉に感受性である哺乳動物における花粉過敏症の治療方法であって、請求項1記載のタンパク質を治療上有効な量で該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

20

**【請求項 9】**

前記花粉がブタクサ花粉である、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

前記哺乳動物がヒトである、請求項8記載の方法。

**【請求項 11】**

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸。

30

**【請求項 12】**

請求項11記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

**【請求項 13】**

請求項11記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

**【請求項 14】**

a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有する、という物理化学的および生物学的特性により特徴づけられる、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない単離された花粉アレルゲン。

40

**【請求項 15】**

前記花粉がブタクサ花粉である、請求項14記載のアレルゲン。

**【請求項 16】**

請求項14記載のアレルゲンを含んでなる医薬組成物。

**【請求項 17】**

有効成分としての請求項14記載のアレルゲンを診断上有効な量で含んでなる、アレルギー疾患を検出するための診断用組成物。

**【請求項 18】**

前記アレルゲンがブタクサ花粉である、請求項17記載の診断用組成物。

**【請求項 19】**

50

哺乳動物における花粉アレルギーの治療方法であって、請求項14記載のアレルゲンを医薬上有効な量で該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項 20】

前記哺乳動物がヒトである、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

前記花粉アレルギーがブタクサ花粉アレルギーである、請求項19記載の方法。

【請求項 22】

ブタクサ花粉アレルゲンAmbt 7の抗原断片と製薬上有効な担体とを含んでなる治療用組成物であって、該抗原断片が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、該抗原断片が該花粉アレルゲンのエピトープを少なくとも1つ含むことを特徴とする治療用組成物。

【請求項 23】

前記エピトープがT細胞エピトープである、請求項22記載の治療用組成物。

【請求項 24】

前記エピトープがB細胞エピトープである、請求項22記載の治療用組成物。

【請求項 25】

請求項22記載の治療用組成物を治療上有効な量で哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物における花粉過敏症の治療方法。

【請求項 26】

前記哺乳動物がヒトである、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

前記花粉過敏症がブタクサ花粉過敏症である、請求項25記載の方法。

【請求項 28】

ブタクサAmbt7花粉アレルゲンの多形変異体であるAmbt7花粉アレルゲンと製薬上許容される担体とを含んでなる治療用組成物であって、該多形変異体が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とする治療用組成物。

【請求項 29】

請求項28記載の治療用組成物を治療上有効な量で哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物における花粉過敏症の治療方法。

【請求項 30】

前記哺乳動物がヒトである、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

前記花粉過敏症がブタクサ花粉過敏症である、請求項29記載の方法。

【請求項 32】

1以上のタンパク質を含んでなる、Ambt7花粉アレルゲンを検出するためのキットであって、前記の1以上のタンパク質が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とするキット。

【請求項 33】

タンパク質検出成分を更に含む、請求項32記載のキット。

【請求項 34】

前記タンパク質検出成分が抗体を含む、請求項32記載のキット。

【請求項 35】

前記キットの使用に関する説明書を更に含む、請求項32記載のキット。

【請求項 36】

花粉アレルゲンの精製方法であって、

a) 該花粉を液体に懸濁させて花粉溶液を形成させ、

10

20

30

40

50

- b) 該花粉溶液を遠心分離して花粉タンパク質上清を得、
  - c) 該花粉タンパク質上清中のタンパク質を沈殿させてタンパク質沈殿物を形成させ、
  - d) 該タンパク質沈殿物をタンパク質沈殿バッファーに再懸濁させて再懸濁タンパク質混合物を形成させ、
  - e) 該再懸濁タンパク質混合物を有機溶媒中で抽出して水相および有機相を形成させ、
  - f) 該水相から該花粉アレルゲンを精製する、
- ことを含んでなる方法。

【請求項 3 7】

前記花粉溶液中のタンパク質を  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  で沈殿させる、請求項 36 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記有機溶媒が石油エーテルである、請求項 36 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記花粉アレルゲンをクロマトグラフィーまたは電気泳動法により前記水相から精製する、請求項 36 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記クロマトグラフィー法がゲル濾過またはアフィニティーコロマトグラフィーである、請求項 39 記載の方法。

【請求項 4 1】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 11 よりなる群から選ばれるアミノ酸配列 20 を含むタンパク質に特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 4 2】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 41 記載の抗体。

【請求項 4 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 41 記載の抗体。

【請求項 4 4】

他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない花粉アレルゲンに特異的に結合する単離された抗体であって、該花粉アレルゲンが、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約 30,000 の分子量を有する、および e) アレルゲン活性を有する、という物理化学的および生物学的特性により特徴づけられることを特徴とする抗体。

【請求項 4 5】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 44 記載の抗体。

【請求項 4 6】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 44 記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ブタクサの花粉に由来するアレルゲン性タンパク質ならびにその断片、誘導体および相同体と、免疫学的にそれに関連したアレルゲン性タンパク質とに関する。より詳しくは、本発明は、完全ブタクサ花粉から単離された主要アレルゲン性 30kDa ジスルフィドタンパク質、8~10kDa 完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、30kDa 脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質ならびにそれらの断片、誘導体および相同体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

全人口の少なくとも 10% を占める遺伝的な素因を有する個体は、曝露された種々の環境源に由来する抗原に対して過剰感作（アレルギー）状態となる。即時型および / または遅延型過敏症を誘発しうる抗原はアレルゲンとして周知である。アナフィラキシーまたはアト

10

20

30

40

50

ピーは、枯草熱、喘息および蕁麻疹の症状を含み、即時型アレルギーの1つの形態である。それは、種々のアトピー性アレルゲン、例えば、草、木、雑草、動物の鱗屑、ダニ、昆虫、食物、薬物および化学物質により引き起こされうる。多数の個体はブタクサの花粉に對してアレルギー性である。実際、ブタクサは、米国の大部に於ける花粉関連アレルギーの主要原因である。

## 【0003】

しかし、これらのブタクサ罹患者の幾人かは、通常の試験ではアレルギー反応にして陽性を示さず、このことは、未だ同定されていないブタクサアレルゲンが存在しうることを示唆している。

## 【0004】

したがって、更なるブタクサアレルゲンを同定することが緊急に必要とされている。

## 【発明の開示】

## 【0005】

本発明において、いくつかのブタクサタンパク質は、従来技術のブタクサタンパク質抽出プロトコールによっては、かろうじて抽出されるに過ぎないことが見出された。しかし、抽出溶液の順序を逆にすることにより、すなわち、まず、水性バッファーを添加し、ついでこの画分をエーテルで抽出して干渉性脂質を除去することにより、これらのタンパク質は容易に抽出される。この方法により、本発明者らは、いくつかの新規ブタクサ花粉タンパク質を検出した。これらのタンパク質は、本発明においてはAmbt 7とも称される30kDaの完全花粉抽出物ジスルフィド糖タンパク質、8~10kDaの完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および30kDaの脱脂花粉抽出物ジスルフィドタンパク質を含む。Ambt 7は主要アレルゲンであるらしく、それは、ブタクサ感受性患者からのIgEに対して高い特異性を有し、ブタクサに対して感作されたイヌにおいて陽性の皮膚試験結果を示す。本発明は、本発明において「30 kDaブタクサ花粉タンパク質アレルゲン」および「Ambt 7」と称されるこの糖タンパク質の単離、精製および使用に関する。本発明は更に、8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質の単離、精製および使用に関する。

## 【0006】

本発明は、少なくとも1つの精製された30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、少なくとも1つの8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および少なくとも1つの30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、または少なくとも1つのその抗原断片もしくは誘導体もしくは相同体を提供する。本発明のもう1つの態様は、ブタクサ花粉由来、30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲン由来、8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質由来または30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質由来のアレルゲンの単離された抗原断片を提供する。

## 【0007】

本発明は更に、以下のペプチド配列を有する単離されたペプチドに関する：

1. L/I L/I SGISNTVYANPK (配列番号1)
2. PTSFN L/I ATK (配列番号2)
3. L/I YGLVQFNR (配列番号3)
4. FY L/I FSTK (配列番号4)
5. FYATEV L/I D L/I D (配列番号5)
6. LLDNLHQQTPPDGFR (配列番号6)
7. MYATEVLDLDGSK (配列番号7)
8. YSDGNFFGAGLDHQ (配列番号8)
9. LLNNMR (配列番号9)
10. VEASAE LR (配列番号10)
11. LLSGLSDTV (配列番号11)。

## 【0008】

10

20

30

40

50

本発明は、30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンの精製方法に関する。本発明は更に、8~10kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質の精製方法および30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質の精製方法に関する。

【0009】

1つの実施形態においては、本発明は、図2Bに記載の精製スキームに関する。

【0010】

本発明は更に、30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲン、8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質またはそれらの少なくとも1つの抗原断片またはその誘導体もしくは相同体をコードする精製された核酸配列、あるいは該核酸配列の機能的等価体を提供する。特に、本発明は更に、配列番号1~11に記載のペプチドをコードする精製された核酸配列を提供する。本発明はまた、少なくとも1つの30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、1つの8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質および1つの30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質または少なくとも1つのその抗原断片またはその誘導体もしくは相同体をコードする精製された核酸配列あるいは該核酸配列の機能的等価体を含んでなる発現ベクターを提供する。本発明は更に、本発明の核酸配列によりコードされるタンパク質またはペプチドを発現するよう形質転換された宿主細胞を提供する。

【0011】

本発明の更にもう1つの態様は、ブタクサ花粉に感受性の個体に投与すると、ブタクサ花粉に対する該個体のアレルギー応答が軽減される、修飾されたブタクサ花粉タンパク質アレルゲンを提供する。好ましくは、該ブタクサ花粉アレルゲンは、修飾された30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲン、修飾された8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質もしくは修飾された30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、またはそれらの誘導体もしくは相同体である。本発明はまた、ブタクサ花粉に感受性の個体に投与すると、ブタクサ花粉に対する該個体のアレルギー応答が軽減される、ブタクサ花粉タンパク質アレルゲンの修飾断片を少なくとも1つ提供する。好ましくは、該ブタクサ花粉タンパク質アレルゲンは、30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質または30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物タンパク質であり、あるいは30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲン、8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質もしくは30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物タンパク質またはそれらの断片もしくは誘導体に免疫学的に関連した抗原断片も、本発明により提供される。該ブタクサ花粉タンパク質アレルゲンは、一般には、医薬組成物の形態である。

【0012】

本発明の更にもう1つの態様においては、非天然（すなわち、組換え又は化学合成）30kDaブタクサ花粉タンパク質ファミリーメンバーまたはそれらの誘導体もしくは相同体を提供し、あるいは1以上の30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、1以上の8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質もしくは1以上の30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物タンパク質ファミリーメンバーまたはそれらの誘導体もしくは相同体に対する抗体と免疫学的に交差反応性の非天然アレルゲン性タンパク質を提供する。本発明はまた、精製された天然30kDaブタクサ完全花粉ジスルフィドタンパク質アレルゲン、精製された天然8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンもしくは精製された天然30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンまたはそれらの少なくとも1つの断片もしくは誘導体もしくは相同体を提供する。

【0013】

非天然30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、非天然8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質または非天然30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質およびそれらに由来する断片または一部分（ペプチド）は、ブタクサ

10

20

30

40

50

花粉に対するアレルギー反応を診断、治療および予防する方法において使用することができる。精製された天然30kDaブタクサ完全花粉抽出物タンパク質、精製された天然8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質または精製された天然30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物タンパク質およびそれらの断片、相同体または誘導体も、ブタクサ花粉に対するアレルギー反応を診断、治療および予防する方法において有用である。

【0014】

本発明の更にもう1つの態様は、非天然30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、非天然8~10kDa完全ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質もしくは非天然30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物ジスルフィドタンパク質またはその誘導体もしくは相同体に対する抗体、および精製された天然30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、精製された天然8~10kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパクもしくは精製された天然30kDa脱脂ブタクサ花粉抽出物タンパク質またはそれらの誘導体もしくは相同体に対して誘導された抗体に関する。 10

【0015】

本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれるアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質に関する。

【0016】

本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれるアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質を含む医薬組成物に関する。該医薬組成物は、該タンパク質の治療的有効量を哺乳動物に投与することによる哺乳動物における花粉アレルギーの治療方法において使用することができる。該医薬組成物は、該タンパク質の治療的有効量を哺乳動物に投与することによる哺乳動物における花粉過敏症の治療方法においても使用することができる。該哺乳動物はヒトでありうる。 20

【0017】

本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれるアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質を含んでなる、花粉アレルギーを検出するための診断用組成物に関する。 30

【0018】

本発明においては、該花粉は任意の起源のものでありうる。1つの実施形態においては、該花粉は、クルミ、ライグラスおよびブタクサの花粉から選ばれる。

【0019】

本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸に関する。本発明の核酸は発現ベクター中に存在しうる。該発現ベクターは宿主細胞中に存在しうる。

【0020】

本発明は更に、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有するという物理化学的および生物学的特性により特徴づけられる、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない単離された花粉アレルゲンに関する。該アレルゲンは任意の起源に由来しうる。好みしい実施形態においては、該アレルゲンはクルミ、ライグラスおよびブタクサの花粉に由来しうる。 40

【0021】

本発明は更に、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有するという物理化学 50

的および生物学的特性により特徴づけられる、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない花粉アレルゲンを含有する医薬組成物に関する。該アレルゲンは任意の起源に由来しうる。好ましい実施形態においては、該アレルゲンはクルミ、ライグラスおよびブタクサの花粉から選択されうる。

【0022】

本発明は更に、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有するという物理化学的および生物学的特性により特徴づけられる、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない花粉アレルゲンの診断的に有効な量を有効成分として含むアレルギー疾患を検出するための診断用組成物に関する。該アレルゲンは任意の起源に由来しうる。好ましい実施形態においては、該アレルゲンはクルミ、ライグラスおよびブタクサの花粉から選択されうる。

【0023】

本発明は更に、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有するという物理化学的および生物学的特性により特徴づけられる、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない花粉アレルゲンの医薬上有効な量を哺乳動物（好ましくはヒト）に投与することによる、哺乳動物における花粉アレルギーの治療方法に関する。

【0024】

本発明は更に、ライグラス花粉アレルゲンAmbt7の単離された抗原断片を含有する治療用組成物に関する。ここで、該抗原断片は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれる1以上のアミノ酸配列を含み、該抗原断片は該花粉アレルゲンのエピトープを少なくとも1つ有する。該治療用組成物は、一般には、製薬上有効な担体を含む。

【0025】

前記エピトープはT細胞エピトープまたはB細胞エピトープでありうる。

【0026】

治療用組成物は、ライグラスの花粉に対する過敏症を治療するために哺乳動物（例えば、ヒト）に投与することができる。

【0027】

本発明は更に、ライグラスAmbt7花粉アレルゲンの多形変異体であるAmbt7花粉アレルゲンを含有する治療用組成物に関する。ここで、該多形変異体は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する。該治療用組成物は、製薬上許容される担体を含みうる。

【0028】

該治療用組成物は、ライグラスの花粉に対する過敏症の治療方法において、哺乳動物に投与することができる。

【0029】

本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11から選ばれるアミノ酸配列を有する1以上の単離されたタンパク質を含む、Ambt7花粉アレルゲンを検出するためのキットに関する。該キットは更に、抗体のようなタンパク質検出成分を含みうる。また、該キットは更に、該キットの使用に関する説明書を含みうる。

【0030】

本発明は更に、a) 花粉を液体に懸濁させて花粉溶液を形成させ、b) 該花粉溶液を遠心分離して花粉タンパク質上清を得、c) 該花粉タンパク質上清中のタンパク質を沈殿させてタンパク質沈殿物を形成させ、d) 該タンパク質沈殿物をタンパク質沈殿バッファーに再

10

20

30

40

50

懸濁させて再懸濁タンパク質混合物を形成させ、e) 該再懸濁タンパク質混合物を有機溶媒中で抽出して水相および有機相を形成させ、f) 該水相から該花粉アレルゲンを精製することによる花粉アレルゲンの精製方法に関する。

【0031】

花粉アレルゲンの精製方法の1つの実施形態においては、該花粉溶液中のタンパク質を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で沈殿させる。

【0032】

花粉アレルゲンの精製方法のもう1つの実施形態においては、該有機溶媒は石油エーテルである。

【0033】

花粉アレルゲンの精製方法のもう1つの実施形態においては、該花粉アレルゲンをクロマトグラフィーまたは電気泳動法により該水相から精製する。該方法においては、該クロマトグラフィー法はゲル濾過またはアフィニティークロマトグラフィーでありうる。

【0034】

本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合する単離された抗体に関する。

【0035】

本発明は更に、他のいずれの花粉タンパク質をも実質的に含有しない花粉アレルゲンに特異的に結合する単離された抗体であって、該花粉アレルゲンが、a) 花粉抽出物中に含有されている、b) 糖タンパク質である、c) スルフヒドリル基を含有するタンパク質である、d) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定で約30,000の分子量を有する、およびe) アレルゲン活性を有するという物理化学的および生物学的特性により特徴づけられることを特徴とする抗体に関する。

【0036】

本発明の抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体でありうる。

【0037】

本発明の更なる特徴は、以下の本発明の好ましい実施形態の詳細な記載および添付図面から、より良く理解されるであろう。

【0038】

図面の説明

本発明は、以下の図面を参照することにより、より良く理解されるであろう。

【0039】

図1は、ブタクサ花粉の壁の構造を示す：(1)内壁、(2)外壁、(3)ネクシン、(4)セクシン、(5)脂肪層、(6)微小孔、(7)とげ、(8)タンパク質、(9)内腔、および(10)原形質体。

【0040】

図2aは、臨床上の花粉調製物を製造するための従来方法を示す。

【0041】

図2bは、30kDaタンパク質および他のタンパク質をブタクサ花粉から抽出するための方法の概要を示す。

【0042】

図3は、完全および脱脂ブタクサ花粉からの水性抽出物の全タンパク質、スルフヒドリルタンパク質およびアレルゲンのプロファイルを示す。抽出物は、Sephadex G50Fクロマトグラフィーにより分画し、SDS-PAGE(10~20%)により分離した。図3Aは、全タンパク質に対して染色されたゲルを示す。ゲルは、クーマシーブルーで染色した。各レーンは3~30 $\mu\text{g}$ のタンパク質を含有していた。図3Bは、モノブロモビマン(monobromobimane)でのスルフヒドリルの測定を示す。タンパク質のスルフヒドリル基をモノブロモビマンで標識し、UV光で分析した。図3Cは、IgE免疫プロット法によるアレルゲンの測定を示す。タンパク質をニトロセルロースフィルターに移行させ、10人のブタクサ患者から集めた血清の

10

20

30

40

50

IgEでプローブした。図3cに示す記号は以下のとおりである：( ) 30kDaタンパク質、(\*) 8~10kDaタンパク質(完全花粉)および( )第2の30kDaタンパク質(脱脂花粉)。

#### 【0043】

図4は、30kDaタンパク質の特性のいくつかを示す。SDS-PAGE(10~20%)。図4Aは、30kDaタンパク質がグリコシル化されていることを示している。図4A中のゲルは、糖タンパク質に対して染色した。レーン1はダイズトリプシンインヒビター(陰性対照、5μg)を含有し、レーン2は30kDaタンパク質(10μg)を含有し、レーン3はホースラディッシュペルオキシダーゼ(陽性対照、5μg)を含有する。図4Bは、30kDaタンパク質が少なくとも1つのジスルフィド結合を含有することを示している。ゲルを、モノブロモビラン(mBBr)との反応後、UV光下で検査した。10μgのタンパク質を使用した。

10

#### 【0044】

図5は、SDS/PAGE(10~20%)/IgE免疫プロット法による、花粉調製物に対するクサ感受性患者由来の血清の応答を示す。図5Aは、純粋な30kDaタンパク質に対する35名の患者由来の血清の応答を示す。30kDaタンパク質への結合を示す患者は「+」で示されている。陽性のImmunoCAP試験結果をも示す患者は、「+」を囲む丸で示されている。ゲル上の各レーンは1.6μgのタンパク質を含有していた。図5Bは、市販ブタクサ抽出物(左パネル)、完全花粉抽出物(中央パネル)および精製30kDaタンパク質(右パネル)に対する、選択されたクサ陽性患者由来の血清の応答を示す。市販および完全抽出物ならびに30kDaタンパク質は、それぞれ25、25および1.6μgのタンパク質を含有していた。対照(C)処理においては、血清および二次抗体が省かれており、「Ab2」と示されたレーンにおいては、二次抗体が省かれている。

20

#### 【0045】

図6は、クルミおよびライグラス花粉抽出物による30kDaタンパク質の免疫プロット抑制、ならびに交差反応性の実例を示す。図6Aは、対照、すなわち、インヒビータンパク質が無添加のもの(C)、インヒビータンパク質としてのオボアルブミン(0、陰性対照)、クログルミ(*Juglans nigra*)完全花粉抽出物(W)およびライグラス(*Lolium perenne*)完全花粉抽出物(R)(免疫プロッティングの前に血清に加えられたもの)である。図6Bには、30kDaタンパク質に対して陽性の追加的な17名の患者由来の血清を用いた結果を示す。対照レーン(C)においては、アレルゲンは加えられていない。(R)と表示されたレーンにおいては、ライグラス完全花粉抽出物がインヒビータンパク質として加えられている。

30

#### 【0046】

図7は、既知ブタクサアレルゲン対30kDaタンパク質に対するヒトIgE結合の割合(%)を示す。10名のブタクサ感受性患者由来の血清を用いて、ELISA測定を行った。各アレルゲンについて、1μg/mlのタンパク質を試験した。値は、試験した各アレルゲンが結合した全IgEの割合(%)を表す。

40

#### 【0047】

##### 発明の詳細な説明

オオブタクサ(giant ragweed)アレルゲン抽出物をBayer社(Spokane, WA)から購入した。完全および脱脂オオブタクサ(*Ambrosia trifida*)花粉粒をGreer Laboratories(Lenoir, N. C.)から購入した。これらの花粉源は、便利な花粉供給源を代表するものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。本発明は、任意の地域または源からのブタクサ花粉を使用して実施することができる。

40

#### 【0048】

以下の考察においては、30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンが記載されており、「30kDaブタクサタンパク質アレルゲン」として示されている。この考察は30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに限定されるものではなく、8~10kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質、30kDaブタクサ脱脂花粉抽出物ジスルフィドタンパク質およびそれらの誘導体または相同体を含む他のブタクサタンパク質アレルゲンに等しく適用される。

50

## 【0049】

花粉タンパク質の精製

本発明は花粉タンパク質の精製方法に関する。該方法は、ブタクサ花粉に特に有用であるが、ブタクサ花粉には限定されない。該方法の概要を図2bに示す。花粉を50mM Tris-HCl (pH7.4) のようなバッファーに懸濁させる。タンパク質の分解を減少させるために、1以上のプロテアーゼインヒビター、例えばフェニルメチルスルホニルフルオリドおよびEDTAを該バッファーに加えてもよい。花粉タンパク質を遊離させるのに十分な時間（典型的には30分間）にわたり、該懸濁花粉を室温で穏やかに攪拌する。ついで該懸濁液を遠心分離して不溶性花粉物質を沈殿させる。ついで上清を濾過する。上清中のタンパク質を硫酸アンモニウム（例えば、95%飽和）で沈殿させる。ついで浮遊ペレットを遠心分離により回収し、塩を含有するバッファーに再懸濁させる。1つの実施形態においては、該バッファーは20mM Tris-HCl (pH7.5) であり、該塩は200mM NaClである。ついで、再懸濁タンパク質ペレットを石油エーテルのような有機溶媒中で抽出することにより、脂質を除去する。ついで該混合物を、例えば4、48,000gで10分間にわたり遠心分離し、有機相を捨てる。得られた清澄化水溶液を、例えば0.2μMフィルターで濾過する。濾過後、濾液をゲル濾過カラム上で分離して種々の花粉タンパク質を分離する。分離後、Ambt7のような花粉タンパク質を、SDS-PAGE、クロマトグラフィーなどのような当技術分野で良く知られた方法により更に精製することができる。

10

## 【0050】

本発明は、単離された又は実質的に精製された核酸またはタンパク質組成物を含む。本発明の場合には、「単離（された）」もしくは「精製（された）」DNA分子または「単離（された）」もしくは「精製（された）」ポリペプチドは、人間の手によりその天然環境から分離されて存在し、従って天然状態の産物ではないDNA分子またはポリペプチドである。単離されたDNA分子またはポリペプチドは精製形態で存在したり、あるいは非天然環境（例えば、トランスジェニック宿主細胞）中に存在しうる。例えば、「単離（された）」または「精製（された）」核酸分子またはタンパク質あるいはその生物学的に活性な部分は、他の細胞物質を、または組換え技術により製造された場合には培地を実質的に含有せず、あるいは化学合成された場合には化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しない。好ましくは、「単離（された）」核酸は、該核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸に天然で隣接する配列（すなわち、該核酸の5'および3'末端に位置する配列）（好ましくは、タンパク質コード配列）を含有しない。例えば、種々の実施形態においては、単離核酸分子は、該核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然で隣接するヌクレオチド配列の約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kbまたは0.1kb未満を含有しうる。細胞物質を実質的に含有しないタンパク質は、約30%、20%、10%、5%（乾燥重量基準）未満の混入タンパク質を含有するタンパク質またはポリペプチドの調製物を包含する。本発明のタンパク質またはその生物学的に活性な部分を組換え的に製造する場合には、好ましくは、培地は、関心のある化学物質の化学的前駆体または非タンパク質の約30%、20%、10%または5%（乾燥重量基準）未満に相当する。

20

30

30

## 【0051】

ブタクサタンパク質アレルゲンをコードする遺伝子

40

本発明においては、「遺伝子」は、その最も広い意味で用いられ、任意の連続的ヌクレオチド配列（その転写がタンパク質に翻訳されうるmRNA分子をもたらす）を意味する。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーをコードする遺伝子は、該タンパク質をコードするヌクレオチド配列、あるいは1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加を含有しうる該タンパク質の誘導体または相同体をコードするヌクレオチド配列を意味する。30kDaブタクサタンパク質アレルゲン遺伝子は、完全長または部分長の30kDaタンパク質に対応するmRNAに相補的なcDNAをも意味する。

## 【0052】

各30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーをコードする核酸配列においては配列多形が存在すると予想され、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメ

50

ンバーをコードする核酸配列中の1以上のヌクレオチドは、自然対立遺伝子変異のため、個々のブタクサ植物によって様々でありうることが当業者には理解されるであろう。任意の及びすべてのそのようなヌクレオチド変異および生じるアミノ酸多形が本発明の範囲内である。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンは、密接に関連した遺伝子（そのタンパク質がブタクサ花粉中に存在する）のファミリーであることが当業者には理解されうる。30kDaを含む任意の及びすべての関連ファミリーメンバーのヌクレオチド配列および対応する推定アミノ酸配列が本発明の範囲内である。

#### 【0053】

したがって、本発明の範囲内には、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーに属するすべてのタンパク質、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーの断片（ペプチド）の少なくとも1つ、およびそれらのアミノ酸誘導体が含まれ、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその断片もしくは誘導体をコードするDNA、cDNAおよびmRNAならびにそれらの相同体または縮重形態を含むヌクレオチド配列が含まれる。本発明の範囲内にはまた、精製された天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲン、少なくとも1つのその断片（ペプチド）、およびそれらの誘導体または相同体が含まれる。本発明には更に、30kDaタンパク質、または少なくとも1つのその断片、またはその誘導体に融合したポリペプチド、あるいはそのような断片および/または誘導体をコードするヌクレオチド配列に隣接したヌクレオチド配列のような分子が含まれる。

#### 【0054】

例えば、本発明のいくつかの態様については、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたは少なくとも1つのその断片またはそれらの誘導体と別のペプチドまたはタンパク質からのアミノ酸配列とを含む融合タンパク質（後者の具体例としては、ガラクトシダーゼ、ホスファターゼ、ウレアーゼ酵素が挙げられる）、およびHisタグなどの精製用部分を含む融合タンパク質を製造することが望ましい。ほとんどの融合タンパク質は、2つのコード配列がそれらのリーディングフレームがインフェーズとなるよう連結された組換え遺伝子の発現により形成される。あるいはタンパク質またはペプチドは化学的手段により *in vitro* で連結されうる。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンのすべてのそのような融合タンパク質またはハイブリッド遺伝的誘導体またはそのコード化ヌクレオチド配列が本発明に含まれる。さらに、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの相同体および誘導体とは、それらの合成誘導体を包含するものである。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンをコードするヌクレオチド配列を使用して、よく知られた方法（例えば、固相合成）により、該全タンパク質を化学合成したり又は多数の断片（ペプチド）を化学合成することが可能である。すべてのそのような化学合成ペプチドが本発明に含まれる。したがって、本発明は、組換え手段または化学合成により製造された単離された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバー、その断片およびそれらの誘導体、相同体および免疫学的類縁体に及ぶ。

#### 【0055】

「単離（された）」および「精製（された）」なる語は本発明では互換的に用いられ、細胞物質を、または組換えDNA技術により製造された場合には培地を、または化学合成された場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含有しないペプチド、タンパク質、タンパク質断片および核酸配列を意味する。本発明で用いる「天然（の）精製（された）」なる語は、オオブタクサ (*Ambrosia trifida*) 花粉または他の植物部分から精製されたタンパク質またはその断片を意味する。さらに、本発明は、全体的にせよ部分的にせよ対応するタンパク質または断片（ペプチド）に及ぶ。

#### 【0056】

本発明の範囲内の核酸の断片は、哺乳動物（好ましくはヒト）において免疫応答（例えば、最少量のIgEの刺激、IgEの結合）を惹起する又はIgGおよびIgM抗体の産生を惹起する又はT細胞応答（例えば、増殖および/またはリンホカイン分泌および/またはT細胞アネルギーの誘導）を惹起する30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの部分をコードするものを包含する。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの前記断片は、本発明では抗原断片と称

10

20

30

40

50

される。本発明の範囲内の断片は、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンと交差反応性であるアレルゲンを検出するためのスクリーニングプロトコールにおいて使用される、他の植物種に由来する核酸とハイブリダイズしうるものを含む。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンをコードする核酸配列の断片は、本発明で用いる場合、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンおよび／または成熟30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーの全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列より少ない塩基を有するヌクレオチド配列を意味する。一般に、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーの断片をコードする核酸配列は、成熟30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーをコードする塩基から選択されるが、いくつかの場合には、本発明の核酸配列のリーダー配列部分から断片の全部または一部を選択することが望ましいかもしれない。本発明の核酸配列はまた、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその断片のクローニング、発現または精製に有用なリンクマー配列、制限エンドヌクレアーゼ部位および他の配列を含有しうる。10

#### 【 0 0 5 7 】

##### ブタクサタンパク質アレルゲンの抗原断片

ブタクサ花粉由来のアレルゲン、好ましくは30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの抗原断片は、例えば、そのようなペプチドをコードする本発明の核酸配列の対応断片から組換え方法により製造された又は当技術分野で公知の技術を用いて化学合成されたペプチドをスクリーニングすることにより、あるいは精製アレルゲンの分解により得ることができる。該タンパク質アレルゲンのペプチド断片は、当技術分野で公知の任意の方法（例えば、該アレルゲンの化学分解、該ペプチドの重複を有しない所望の長さの断片への該アレルゲンの任意分解、または好ましくは、所望の長さの重複断片への該アレルゲンの分解）により得ることができる。該断片は、その抗原性およびアレルゲン性を測定するために試験される。20

#### 【 0 0 5 8 】

T細胞応答、例えば刺激（すなわち、増殖またはリンホカイン分泌）を惹起しうる及び／又はT細胞アレルギーを誘導しうる、組換え的もしくは合成的に製造された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの又は精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの断片が、特に望ましい。免疫グロブリンE（IgE）に結合しない及び／又は最小のIgE刺激活性を有する、組換え的もしくは合成的に製造された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの断片も好ましい。組換え的もしくは合成的に製造された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの断片がIgEに結合する場合には、そのような結合がヒスタミン放出を招かないこと（例えば、そのような結合がマスト細胞または好塩基球上のIgEの架橋を引き起こさないこと）が好ましい。最小のIgE刺激活性は、組換え的もしくは合成的に製造された全30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは全精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンにより刺激されたIgE産生の量より少ないIgE刺激活性を意味する。30

#### 【 0 0 5 9 】

好ましい断片はまた、ブタクサ花粉に感受性の個体またはブタクサ花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲンに対してアレルギー性の個体に投与したとき、該個体のブタクサ花粉アレルゲンに対するアレルギー応答を改変しうる抗原断片、およびブタクサ花粉に感受性の個体に投与したとき、ブタクサ花粉アレルゲンに対する該個体のB細胞応答、T細胞応答またはB細胞およびT細胞の両方の応答を改変しうる抗原断片を含む。ブタクサ花粉アレルゲンに感受性の個体のアレルギー応答の改変は、本発明で用いる場合には、標準的な臨床的方法（例えば、Varneyら、British Medical Journal, (1990), 302:265-269を参照されたい）により判定される該アレルゲンに対する不応答または症状の減弱（クサ花粉誘発性喘息症状（Suphiogluら (1992) Lancet 339: 569-572）の減弱を含む）として定義される。40

#### 【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

T細胞刺激活性を有し少なくとも1つのT細胞エピトープを含む本発明の抗原断片が特に望ましい。T細胞エピトープは、アレルギーの臨床症状を引き起こすタンパク質アレルゲンに対する免疫応答の開始および維持に関与すると考えられる。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞の表面上の適当なHLA分子に結合し関連T細胞亜集団を刺激することによりTヘルパー細胞のレベルで初期事象を誘発すると考えられる。これらの事象は、T細胞の増殖、リンホカインの分泌、局所炎症反応、該部位への追加的免疫細胞の動員、および抗体産生につながるB細胞カスケードの活性化を招く。これらの抗体のイソタイプの1つであるIgEはアレルギー症状の発生に基本的に重要であり、その産生は事象のカスケードの初期においてTヘルパー細胞のレベルで分泌リンホカインの性質により影響される。T細胞エピトープは、T細胞受容体による認識の基本要素または最小単位であり、該エピトープは受容体認識に必須のアミノ酸を含む。T細胞エピトープのアミノ酸配列を模倣しタンパク質アレルゲンに対するアレルギー応答を改変するアミノ酸配列が本発明の範囲内である。

#### 【0061】

本発明の精製タンパク質アレルゲンへの、又は少なくとも1つのT細胞エピトープを含みタンパク質アレルゲンに由来する本発明の抗原断片への患者の曝露は、適当なT細胞亜集団を寛容化またはアネルギー化することが可能であり、その結果、それらは該タンパク質アレルゲンに不応答性となり、そのような曝露の際の免疫応答の刺激に関与しなくなりうる。また、本発明のタンパク質アレルゲンまたは少なくとも1つのT細胞エピトープを含む本発明の抗原断片の投与は、天然に存在するタンパク質アレルゲンまたはその一部に対する曝露と比較してリンホカイン分泌プロファイルを改変しうる（例えば、IL-4の減少および/またはIL-2の増加を引き起こしうる）。さらに、そのような抗原断片またはタンパク質アレルゲンに対する曝露は、該アレルゲンに対する応答に正常に関与するT細胞亜集団に影響を及ぼすことが可能性であり、その結果、これらのT細胞は該アレルゲンに対する通常の曝露の部位（例えば、鼻粘膜、皮膚および肺）から離れて該断片またはタンパク質アレルゲンの治療投与の部位に向かう。T細胞亜集団のこの再分布は、該アレルゲンに対する通常の曝露の部位における通常の免疫応答を刺激する個体の免疫系の能力を改善または減弱して、アレルギー症状の軽減をもたらしうる。

#### 【0062】

該タンパク質またはその断片へのIgEの結合に関するスクリーニングは、実験動物またはヒト志願者に対する引っ掻き試験または皮内皮膚試験により、あるいはin vitro系、例えばRAST（放射性アレルゲン吸着試験）、RAST阻害、ELISAアッセイまたはラジオイムノアッセイ（RIA）において行うことができる。

#### 【0063】

##### 発現ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本発明のブタクサタンパク質アレルゲンをコードする核酸配列を発現するように形質転換された宿主細胞およびそのための発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、少なくとも1つの30kDaブタクサ花粉アレルゲンまたは少なくとも1つのその抗原断片またはその誘導体もしくは相同体をコードする核酸配列、またはそのような核酸配列の機能的等価体を含む。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンを含む30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたは少なくとも1つのその断片をコードする核酸配列は、原核または真核宿主細胞内で発現させることができる。適当な宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）のような細菌細胞、昆虫細胞、酵母、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳類細胞を包含する。適当な発現ベクター、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御要素は、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されている。酵母内での発現のための適当なベクターは、YepSec1 (Balariら (1987) *Embo J.* 6: 229-234)、pMF (KurjanおよびHerskowitz (1982) *Cell* 30: 933-943) およびJRY88 (Schultzら (1987) *Gene* 54: 113-123) を包含する。

#### 【0064】

大腸菌（*E. coli*）内での発現の場合、適当な発現ベクターは、pTRC (Amannら (1988) Ge

10

20

30

40

50

ne 69: 301-315)、pET-11d (Novagen, Madison, Wis.)、pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia)、pMAL (N. E. Biolabs, Beverly, Mass.)、pRIT5 (Pharmacia Piscataway, N. J.)、およびPSEM (Knappら (1990) BioTechniques 8: 280-281) を包含する。pT RCおよびpET-11dの使用は未融合タンパク質の発現を招く。pGEX、pMAL、pRIT5およびpSEMの使用は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (pGEX)、マルトースE結合タンパク質 (pMAL)、プロテインA (pRIT5) またはトランケート化-ガラクトシダーゼ (PSEM) に融合したアレルゲンの発現を招く。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその断片が融合タンパク質として発現される場合には、担体タンパク質と30kDaタンパク質ファミリーメンバーまたはその断片との間の融合部位に酵素切断部位を導入することが特に有利である。ついで30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその断片を、該酵素部位における酵素切断ならびにタンパク質およびペプチドの精製のための通常の技術を用いる生化学的精製により、該融合タンパク質から回収することができる。適当な酵素切断部位は、血液凝固因子Xaまたはトロンビンのための切断部位を包含し、その切断のための適当な酵素およびプロトコールは、例えば、Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.) およびN. E. Biolabs (Beverly, Mass.) から商業的に入手可能である。

10

#### 【0065】

本発明の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンをコードする核酸配列を発現させるために、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションのような通常の技術を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。宿主細胞を形質転換するための適当な方法は、Sambrookら (前掲) および他の実験用参考書に記載されている。また、本発明の核酸配列は、標準的な技術を用いて合成することができる。

20

#### 【0066】

##### 組換え30kDaブタクサタンパク質の製造

したがって、本発明のもう1つの態様は、組換え30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは少なくとも1つのその断片またはそれらの誘導体もしくは相同体またはそれらの免疫学的類縁体 (前記で定義されている) の製造方法であって、複製可能な組換えDNA分子を含有する生物 (該分子は、該生物内での発現が可能なプロモーター、該プロモーターの下流に位置し該プロモーターから転写される、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバー、少なくとも1つのその断片またはそれらの相同体もしくは誘導体またはそれらの免疫学的類縁体をコードする遺伝子、選択マーカー、および原核または真核生物複製起点を含有するDNAビヒクルを含む) を、該組換えDNA分子が安定に維持され30kDaブタクサタンパク質アレルゲン、少なくとも1つのその断片またはそれらの誘導体、相同体もしくは免疫学的類縁体の合成を導くのに十分な条件下および時間にわたり培養し、ついで所望によりそれを単離することを含んでなる製造方法を提供する。

30

#### 【0067】

30kDaブタクサタンパク質アレルゲンおよびその断片 (ペプチド) は、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動および30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその断片に特異的な抗体を用いる免疫精製を含めて、ペプチドおよびタンパク質を精製するための当技術分野で公知の技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞またはそれらの両方から精製することができる。単離 (された) および精製 (された) なる語は本発明においては互換的に用いられ、組換えDNA技術により製造された場合には細胞物質または培地を、化学合成された場合には化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しないペプチド、タンパク質、タンパク質断片および核酸配列に関するものである。

40

#### 【0068】

本発明のもう1つの態様は、単離された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの断片の少なくとも1つを含んでなるタンパク質調製物を提供する。本発明のこの態様の好ましい実施形態においては、30kDaブタクサタンパク質

50

アレルゲンまたは30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの断片の少なくとも1つを、該タンパク質または断片をコードする核酸配列で形質転換された宿主細胞内で產生させる。

【0069】

個体のアレルギー応答の改変

十分な量でブタクサ花粉感受性個体に投与するとブタクサ花粉に対する該個体のアレルギー応答が改変される、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに由来するペプチドを設計することが可能である。これは、例えば、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの構造を調べ、ブタクサ花粉感受性個体におけるB細胞および/またはT細胞応答に影響を及ぼす能力に関して調べようとするペプチドを(発現系、合成法などにより)得、該細胞により認識される適当なエピトープを選択することにより行うことができる。エピトープに言及する場合、該エピトープは、受容体、特に免疫グロブリン、組織適合性抗原およびT細胞受容体による認識の基本要素または最小単位であり、この場合、受容体認識に必須のアミノ酸は該アミノ酸配列中で連続的および/または非連続的でありうる。該エピトープのアミノ酸配列を模倣する及びブタクサ花粉アレルゲンに対するアレルギー応答をダウンレギュレーションするアミノ酸配列も使用することができる。

【0070】

そして今度は、ブタクサ花粉感受性個体においてアレルギー反応を誘導するブタクサ花粉アレルゲンの能力を遮断または抑制しうる物質または薬物を設計することも可能である。そのような物質は、例えば、それが関連抗30kDaブタクサタンパク質アレルゲンIgEに結合してIgE-アレルゲン結合およびそれに続くマスト細胞または好塩基球の脱顆粒を妨げるよう設計することが可能であろう。あるいは、そのような物質は免疫系の細胞成分に結合して、オオブタクサ(*Ambrosia trifida*)花粉アレルゲンに対するアレルギー応答の抑制または脱感作を引き起こしうるであろう。この非限定的な具体例としては、ブタクサ花粉に対するアレルギー応答を抑制するための、本発明のcDNA/タンパク質構造体に基づく適当なBおよびT細胞エピトープペプチドまたはその修飾体の使用が挙げられる。これは、ブタクサ花粉感受性個体由来の血液成分を用いた*in vitro*研究においてBおよびT細胞機能に影響を及ぼすBおよびT細胞エピトープペプチドの構造を規定することにより行うことができる。

【0071】

花粉症の診断

また、本発明のタンパク質、ペプチドまたは抗体は、ブタクサ花粉症を検出し診断するために使用することができる。例えば、これは、ブタクサ花粉に対する感受性を評価する個体から得た血液または血液製剤を、組換え的もしくは合成的に製造した30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは天然精製30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの単離抗原ペプチドと、該ペプチドまたはタンパク質への該血液中の成分(例えば、抗体、T細胞、B細胞)の結合に適した条件下で組み合わせ、そのような結合が生じる度合を測定することにより行うことが可能であろう。結合が生じる度合は、例えば、T細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能あるいは該血液またはその組合せ体中に存在する抗体への該タンパク質もしくはその断片またはその誘導体もしくは相同体の結合を評価することにより測定することができる。

【0072】

また、ブタクサ花粉に対する哺乳動物の感受性は、30kDaブタクサ花粉アレルゲンまたは少なくとも1つのその断片またはその誘導体もしくは相同体の十分な量を哺乳動物に投与して哺乳動物においてアレルギー応答を惹起し、ブタクサ花粉アレルゲンに対する哺乳動物におけるアレルギー応答の発生を測定することにより調べることができる。本発明のこの態様において使用するブタクサ花粉アレルゲン、その断片または誘導体または相同体は、組換え的または合成的に製造することができる。精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその断片を、組換え的もしくは合成的に製造した30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその断片の代わりに使用し、ブタクサに対する哺乳動物の感受性を測定するために前記方法において使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

本発明は更に、単離されたアレルゲン性タンパク質またはその断片を含み、これは、例えば抗体交差反応性（この場合、単離アレルゲン性タンパク質またはその断片は、本発明のタンパク質およびペプチドに特異的な抗体に結合しうる）またはT細胞交差反応性（この場合、単離アレルゲン性タンパク質またはその断片は、本発明のタンパク質およびペプチドに特異的なT細胞を刺激しうる）により免疫学的に関連した30kDaブタクサタンパク質アレルゲン（その断片または誘導体または相同体を含む）である。

## 【 0 0 7 4 】

他の研究者らによる研究は、高用量のアレルゲンが、一般には、最良の結果（すなわち、最良の症状軽減）を与えることを示している。しかし、多くの人々は、アレルゲンに対するアレルギー反応のため、大量のアレルゲンを許容し得ない。天然に存在するアレルゲンの修飾は、対応する天然に存在するアレルゲンと比べて同じ又は増強した治療特性を有するが、減少した副作用（特にアナフィラキシー反応）を有する修飾ペプチドまたは修飾アレルゲンが得られうるよう設計することができる。これらは、例えば、本発明のタンパク質またはペプチド（例えば、精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンを含む30kDaブタクサタンパク質アレルゲンのアミノ酸配列の全部または一部を有するもの）、あるいは修飾されたタンパク質またはペプチド、あるいは該タンパク質またはペプチド類似体でありうる。溶解度の増加、治療もしくは予防効力または安定性（例えば、ex vivo貯蔵寿命およびin vivoでのタンパク質分解に対する抵抗性）のような目的のために、本発明のタンパク質またはペプチドの構造を修飾することが可能である。免疫原性を改変するために及び／又はアレルゲン性を減少させるために、例えばアミノ酸の置換、欠失または付加によりアミノ酸配列が改変された、あるいは同じ目的のために成分が添加された修飾タンパク質またはペプチドを製造することができる。修飾タンパク質は更に、米国特許第6,114,504号に記載のとおり、タンパク質の分子内ジスルフィド結合を減少させるためにチオールレドックスタンパク質の使用により製造することができる。

## 【 0 0 7 5 】

アレルギー応答の治療

したがって、本発明は、ブタクサ花粉に感受性の個体に投与したとき、ブタクサ花粉に対する個体のアレルギー応答を軽減する修飾されたブタクサ花粉タンパク質アレルゲンを提供する。好ましい修飾ブタクサ花粉タンパク質アレルゲンは、修飾された30kDaブタクサ花粉アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体を包含する。本発明はまた、ブタクサ花粉に感受性の個体に投与したとき、ブタクサ花粉に対する個体のアレルギー応答を軽減するブタクサ花粉タンパク質アレルゲンの少なくとも1つの修飾断片を提供する。好ましくは、そのような修飾断片は、30kDaブタクサ花粉アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体の少なくとも1つの修飾断片である。

## 【 0 0 7 6 】

タンパク質またはペプチドの修飾のもう1つの例として、ジスルフィド結合による二量体化を最小限に抑えるための、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシンまたはグルタミン酸によるシステイン残基の置換が挙げられる。本発明のペプチドの修飾のもう1つの例として、該ペプチドの環化またはアミノ酸側鎖の化学修飾によるものが挙げられる。

## 【 0 0 7 7 】

また、安定性および／または反応性を増強するためには、本発明のタンパク質またはペプチドを、自然対立遺伝子変異から生じる該タンパク質アレルゲンのアミノ酸配列中の1以上の多形を含むよう修飾することができる。また、本発明の範囲内の修飾タンパク質またはペプチドを得るために、D-アミノ酸、非天然アミノ酸または非アミノ酸類似体を代用または付加することができる。

## 【 0 0 7 8 】

天然30kDaブタクサ花粉アレルゲンの精製は、本明細書中の実施例に記載されている。

## 【 0 0 7 9 】

cDNAのクローニング

10

20

30

40

50

本発明の任意の実施形態において使用するDNAは、本明細書に記載のとおりに得たcDNAでありうる。あるいはそれは、本明細書中に表された配列の全部または一部を有する任意のオリゴデオキシヌクレオチド配列またはそれらの機能的等価体でありうる。そのようなオリゴデオキシヌクレオチド配列は、公知技術を用いて化学的または機械的に製造することができる。

#### 【0080】

以下の用語は、2以上の核酸またはポリヌクレオチド間の配列関係を説明するために用いられる：(a)「参照配列」、(b)「比較ウィンドウ」、(c)「配列同一性」、(d)「配列同一性の割合(%)」、および(e)「実質的同一性」。

#### 【0081】

(a) 本発明で用いる「参照配列」は、配列比較のための基礎として用いる配列と定義される。参照配列は、例えば完全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメントあるいは完全cDNAまたは遺伝子配列としての特定された配列の一部または全部でありうる。

#### 【0082】

(b) 本発明で用いる「比較ウィンドウ」は、ポリヌクレオチド配列の連続的な特定されたセグメントを示し、ここで、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列は、2つの配列の最適なアライメントのために、参照配列(これは付加も欠失も含まない)と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含みうる。一般に、比較ウィンドウは、連続した少なくとも20ヌクレオチド長であり、所望により、30、40、50、100ヌクレオチド長またはそれより長くなりうる。ポリヌクレオチド配列中にギャップを入れることによる参照配列に対する高い類似性を回避するために、典型的にはギャップペナルティが導入され、マッチ数から差し引かれることが当業者には理解される。

#### 【0083】

比較のための配列アライメント方法は当技術分野で良く知られている。例えば、任意の2つの配列間の同一性(%)の測定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。そのような数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な具体例としては、MyersおよびMiller, 1988のアルゴリズム、Smithら, 1981のローカルホモロジーアルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch 1970のホモロジーアライメントアルゴリズム、PearsonおよびLipman 1988の類似性検索法(search-for-similarity-method)、KarlinおよびAltschul, 1990のアルゴリズム(KarlinおよびAltschul, 1993のとおりに改変されたもの)が挙げられる。

#### 【0084】

配列同一性を測定するための配列の比較のために、これらの数学的アルゴリズムをコンピューターで実行することができる。そのような実行は、PC/Geneプログラム(Inteligentics, Mountain View, Californiaから入手可能)中のCLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USAから入手可能)中のALIGNプログラム(バージョン2.0)およびGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTAを含むが、これらに限定されるものではない。これらのプログラムを使用するアライメントは、デフォルトパラメーターを使用して行うことができる。CLUSTALプログラムは、Higginsら 1988、Higginsら 1989、Corpetら 1988、Huangら 1992およびPearsonら 1994により十分に記載されている。ALIGNプログラムはMyersおよびMiller(前掲)のアルゴリズムに基づく。Altschulら, 1990のBLASTプログラムはKarlinおよびAltschul(前掲)のアルゴリズムに基づく。

#### 【0085】

BLAST解析を行うためのソフトウェアは、ウェブサイトncbi.nlm.nih.gov.においてNational Center for Biotechnology Informationを介して公に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列中の同じ長さのワードと整列された場合に幾らかの正の値の閾値スコアTに一致する又はそれを満足する問合せ配列中の長さWの短いワードを同定することによりHSP(high scoring sequence pairs)を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と称される(Altschulら, 1990)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含有する、より長いHSPを見出すために検索を開始するためのシードとして機能

する。ついで、累積アライメントスコアが増加しうる限り、該ワードヒットを各配列に沿って両方向に伸長させる。累積スコアは、ヌクレオチド配列に関してはパラメーターM(マッチ残基のペアに関するリワードスコア；常に $>0$ )およびN(ミスマッチ残基に関するペナルティスコア；常に $<0$ )を使用して計算する。アミノ酸配列に関しては、累積スコアを計算するためにスコアリングマトリックスを使用する。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積アライメントスコアがその最大達成値から量Xだけ減少した場合、1以上の負スコア残基アライメントのために累積スコアが0未満になった場合、またはいずれかの配列の末端に達した場合に停止する。

#### 【0086】

BLASTアルゴリズムは、配列同一性(%)を計算することに加えて、2つの配列間の類似性的統計解析をも行う(例えば、Karlin & Altschul(1993)を参照されたい)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性的1つの尺度は最小総和確率(smalllest sum probability)(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然に生じる確率の指標を与える。例えば、参照核酸配列に対する試験核酸配列の比較における最小総和確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満の場合には、試験核酸配列は参照配列に類似しているとみなされる。

#### 【0087】

比較目的のためにギャップ入りアライメントを得るために、Gapped BLAST(BLAST 2.0におけるものをAltschulら1997に記載のとおりに利用することができる。あるいは、分子間の遠縁関係を検出する反復検索を行うために、PSI-BLAST(BLAST 2.0におけるものを使用することができる。Altschulら(前掲)を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLASTを使用する場合には、それぞれのプログラム(ヌクレオチド配列の場合にはBLASTN、タンパク質の場合にはBLASTX)のデフォルトパラメーターを使用することができる。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、100のカットオフ、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合には、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長、10の期待値(E)およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを用いる(Henikoff & Henikoff, 1989を参照されたい)。ncbi.nlm.nih.gov.にあるウェブサイトを参照されたい。また、アライメントは精査により手動で行うことも可能である。

#### 【0088】

本発明の目的においては、本明細書に開示するプロモーター配列に対する配列同一性(%)の測定のためのヌクレオチド配列の比較は、好ましくは、BlastNプログラム(バージョン1.4.7.以降)をそのデフォルトパラメーターと共に又は任意の同等のプログラムを使用して行う。「同等のプログラム」は、問題にされている任意の2つの配列に関して、好ましいプログラムにより作成された対応するアライメントと比較して同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基のマッチおよび同じ配列同一性(%)を有するアライメントをもたらす任意の配列比較プログラムを意味する。

#### 【0089】

(c) 2つの核酸またはポリペプチド配列の場合に本発明で用いる「配列同一性」または「同一性」は、一定の比較ウインドウにわたり最大の一一致が得られるよう整列させた場合に同一であるそれらの2つの配列中の残基を参照するものである。配列同一性の割合(%)をタンパク質に関して用いる場合には、同一でない残基位置は、しばしば、同類アミノ酸置換[この場合、アミノ酸残基は、同様の化学的特性(例えば、電荷または疎水性)を有する他のアミノ酸残基により置換されており、したがって、該分子の機能特性を変化させない]により異なると認識される。配列が同類置換において異なる場合には、配列同一性(%)は、該置換の同類的性質に関して補正するために上方修正することができる。そのような同類置換により異なる配列は「配列類似性」または「類似性」を有すると称される。この修正を行うための手段は当業者に良く知られている。典型的には、これは、同類置換を、完全ミスマッチではなく部分ミスマッチと評価し、それにより配列同一性(%)を増加させることを含む。したがって、例えば、同一アミノ酸にスコア1が与えられ非同類

10

20

30

40

50

置換にはスコア0が与えられる場合には、同類置換には0と1との間のスコアが与えられる。同類置換の評価は、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California)で実行されるとおりに計算される。

【0090】

(d) 本発明で用いる「配列同一性の割合(%)」は、2つの最適に整列された配列を比較ウィンドウにわたり比較することにより測定された値を意味し、ここで、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部は、それらの2つの配列の最適アライメントのために、参照配列(これは付加も欠失も含まない)と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含みうる。割合(%)は、同一核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列中に存在する位置の数を求めてマッチ位置数を得、比較のためのウィンドウ中の位置の総数でマッチ位置数を割り算し、その結果に100を掛けることにより算出される。

10

【0091】

(e) (i) ポリヌクレオチド配列の「実質的同一性」なる語は、標準的なパラメーターを使用する記載されているアライメントプログラムの1つを使用して参照配列と比較して、ポリヌクレオチドが、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%または79%、好ましくは少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%または94%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。これらの値は、コドン縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの配置などを考慮して、2つのヌクレオチド配列にコードされるタンパク質の対応同一性を求めるために適当に調節されうる、と当業者は認識するであろう。これらの目的におけるアミノ酸配列の実質的同一性は、通常、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を意味する。

20

【0092】

ヌクレオチド配列が実質的に同一であるというもう1つの指標は、2つの分子が、ストリンジエントな条件下(後記を参照されたい)で互いにハイブリダイズするか否かということである。一般に、ストリンジエントな条件は、一定のイオン強度およびpHにおいて特定の配列の熱融解温度( $T_m$ )より約5 低くなるように選択される。しかし、ストリンジエントな条件は、その他の点では本発明に適した所望のストリンジエンシーの度合に応じて約1 ~ 約20 の範囲の温度を含む。ストリンジエントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合には尚も実質的に同一である。これは、例えば、遺伝暗号により許容される最高のコドン縮重を用いて核酸のコピーが作製される場合に生じうる。2つの核酸配列が実質的に同一であるという1つの指標は、第1核酸にコードされるポリペプチドが、第2核酸にコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応する場合である。

30

【0093】

(e) (ii) ペプチドの場合の「実質的同一性」なる語は、ペプチドが、特定の比較ウィンドウにわたり参照配列に対して、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%または79%、好ましくは80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%または89%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%または94%、より一層好ましくは95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。好ましくは、最適アライメントは、NeedlemanおよびWunsch (1970) の相同性(ホモロジー)アライメントアルゴリズムを用いて行う。2つのペプチド配列が実質的に同一であるという指標は、一方のペプチドが、もう一方のペプチドに対して産生された抗体と免疫学的に反応性であるということである。したがって、例えば、2つのペプチドが同類置換により異なるに過ぎない場合には、一方のペプチドは、もう一方のペプチドと実質的に同一である。

40

【0094】

配列比較では、典型的には、1つの配列が、試験配列を比較するための参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験配列および参照配列がコンピュ

50

ーターに入力され、必要に応じて配列座標が示され、配列アルゴリズムパラメーターが示される。ついで配列比較アルゴリズムは、示されたプログラムパラメーターに基づき、参考配列に対する試験配列の配列同一性(%)を計算する。

#### 【0095】

前記のとおり、2つの核酸配列が実質的に同一であるというもう1つの指標は、それらの2つの分子が、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズするということである。「特異的にハイブリダイズする」なる表現は、分子が、ストリンジェントな条件下、複雑な混合物(例えば、全細胞)のDNAまたはRNA中に存在する特定のヌクレオチド配列のみと結合し、二本鎖形成し、またはハイブリダイズすることを意味する。「実質的に結合する」は、プローブ核酸と標的核酸との相補的なハイブリダイゼーションを意味し、標的核酸配列の所望の検出を達成するためにハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーを減少させることにより適合されうる若干のミスマッチを含む。

#### 【0096】

サザンおよびノーザンハイブリダイゼーションのような核酸ハイブリダイゼーション実験の場合における「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は配列依存的なものであり、環境パラメーターによって異なる。T<sub>m</sub>は、完全にマッチするプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする際の(一定のイオン強度およびpH下での)温度である。特異性は、典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄と相関関係にあり、決定的に重要な因子は最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA-DNAハイブリッドの場合、T<sub>m</sub>は、MeinkothおよびWahlの式: T<sub>m</sub> = 81.5 + 16.6(log M) + 0.41 (% GC) - 0.61 (% ホルム) - 500/L (式中、Mは一価陽イオンのモル濃度であり、% GCはDNA中のグアノシンおよびシトシンヌクレオチドの割合(%)であり、% ホルムはハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの割合(%)であり、Lは、塩基対形成したハイブリッドの長さである)から概算することができる。T<sub>m</sub>は、1%のミスマッチにつき約1 減少する。したがって、所望の同一性の配列にハイブリダイズするよう、T<sub>m</sub>、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を調節することができる。例えば、>90%の同一性を有する配列を探す場合には、T<sub>m</sub>は10 減少させることができると可能である。一般に、ストリンジェントな条件は、一定のイオン強度およびpHにおける特定の配列およびその相補体の熱融解温度より約5 低くなるように選択される。しかし、高度にストリンジェントな条件は、熱融解温度より1、2、3または4 低い温度のハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を用いることが可能であり、中等度にストリンジェントな条件は、熱融解温度より6、7、8、9または10 低い温度のハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を用いることが可能であり、低度にストリンジェントな条件は、熱融解温度より11、12、13、14、15または20 低い温度のハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を用いることが可能である。上記式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成ならびに所望のTを用いて、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄溶液のストリンジェンシーにおける種々の形態が固有に記載されることが当業者には理解されるであろう。所望の度合のミスマッチが45 未満(水溶液)または32 未満(ホルムアミド溶液)のTを与える場合には、より高い温度が用いられるよう、SSC濃度を増加させることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションに関する詳細な指針は、Tijssen, 1993に記載されている。一般に、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、一定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の熱融解温度T<sub>m</sub>より約5 低くなるよう選択される。

#### 【0097】

高度にストリンジェントな洗浄条件の一例としては、0.15M NaCl、72 で約15分間が挙げられる。ストリンジェントな洗浄条件の一例としては、0.2 × SSCでの65 で15分間の洗浄が挙げられる(SSCバッファーの説明は、後記のSambrookを参照されたい)。しばしば、高いストリンジェンシーの洗浄の前に、バックグラウンドプローブシグナルを除去するために低いストリンジェンシーの洗浄を行う。例えば100ヌクレオチドを超える二本鎖に対する中等度のストリンジェンシーの洗浄の一例としては、1 × SSC、45 で15分間が挙げら

10

20

30

40

50

れる。例えば100ヌクレオチドを超える二本鎖に対する低いストリンジエンシーの洗浄の一例としては、4~6×SSC、40°で15分間が挙げられる。短いプローブ（例えば、約10~50ヌクレオチド）の場合には、ストリンジエントな条件は、典型的には、約1.5M未満の塩濃度、より好ましくは約0.01~1.0MのNaイオン濃度（または他の塩）（pH 7.0~8.3）を含み、温度は、典型的には、少なくとも約30°、および長いプローブ（例えば、>50のヌクレオチド）の場合には少なくとも約60°である。また、ストリンジエントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によっても達成されうる。一般に、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおける無関係なプローブで観察されるものの2倍（またはそれ以上）のSN比（シグナルとノイズとの比）は、特異的ハイブリダイゼーションの検出を示す。ストリンジエントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするタンパク質が実質的に同一である場合には、尚も実質的に同一である。これは、例えば、遺伝暗号により許容される最高のコドン縮重を用いて核酸のコピーが作製される場合に生じうる。10

#### 【0098】

非常にストリンジエントな条件は、特定のプローブのT<sub>m</sub>と等しくなるように選択される。サザンまたはノーザンプロットにおけるフィルター上に100以上の相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションのストリンジエントな条件の一例としては、50% ホルムアミド、例えば、50% ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS中、37°でのハイブリダイゼーション、および0.1×SSC中、60~65°での洗浄が挙げられる。典型的な低いストリンジエンシーの条件は、30~35% ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）のバッファー溶液での37°でのハイブリダイゼーション、および1×~2×SSC（20×SSC=3.0M NaCl/0.3M クエン酸三ナトリウム）中、50~55°での洗浄を含む。典型的な中等度のストリンジエンシーの条件は、40~45% ホルムアミド、1.0M NaCl、1% SDS中、37°でのハイブリダイゼーション、および0.5×~1×SSC中、55~60°での洗浄を含む。20

#### 【0099】

以下は、本発明の参照ヌクレオチド配列と実質的に同一であるオルソログヌクレオチド配列をクローニングするために使用しうるハイブリダイゼーション／洗浄条件の組合せの具体例である。参照ヌクレオチド配列は、該参照ヌクレオチド配列に、好ましくは、7% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中、50°でハイブリダイズし、2×SSC、0.1% SDS中、50°での洗浄に付され、より望ましくは、7% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中、50°でハイブリダイズし、1×SSC、0.1% SDS中、50°での洗浄に付され、より一層望ましくは、7% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中、50°でハイブリダイズし、0.5×SSC、0.1% SDS中、50°での洗浄に付され、好ましくは、7% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中、50°でハイブリダイズし、1×SSC、0.1% SDS中、50°での洗浄に付され、より好ましくは、7% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中、50°でハイブリダイズし、0.1×SSC、0.1% SDS中、65°での洗浄に付される。30

#### 【0100】

30kDaブタクサタンパク質アレルゲンcDNAまたはその一部を使用して、任意の種々のタイプの植物における同様の配列を同定し、したがって、低いストリンジエンシーの条件下で30kDa cDNAもしくはmRNAまたはその一部（例えば、他の植物のアレルゲンからのDNA）にハイブリダイズするのに十分な相同意を有する配列を「取り出す」することができる。本明細書に記載の方法を用いる更なる評価のためには、十分な相同意（一般には40%以上）を有する配列が選択されうる。このようにして、本発明のDNAを使用して、他のタイプの植物、好ましくは、関連した科、属または種において、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンと類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を同定し、それゆえに、他の種におけるアレルゲンを同定することができる。したがって、本発明は、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンだけでなく、好ましくは高いストリンジエンシーの条件下で本発明のDNAにハイブリダイズするDNAにコードされる他のアレルゲンをも含む。40

10

20

30

40

50

## 【0101】

30kDaブタクサ花粉アレルゲンをコードするcDNAのクローニングは、クサ花粉に感受性の患者からの特異的血清IgEおよび特異的モノクローナル抗体の両方を使用する、ラムダ-gt 11ファージで形質転換された大腸菌 (*Escherichia coli*) により発現されたタンパク質の認識に基づくものでありうる。

## 【0102】

対象タンパク質のアレルゲン性は、1つには、アレルギー患者の血清中に高レベルで存在するレアギンIgE抗体の、該タンパク質への結合により特徴づけられる。アレルギー性タンパク質上のエピトープへのIgE結合は、固体支持体上に固定化されたアレルゲンが(1)アレルギー患者の血清、(2)酵素標識抗IgE抗体中での連続的インキュベーションにより可視化されうる発色アッセイにおいて試験することができる。10

## 【0103】

30kDaブタクサタンパク質アレルゲン、その少なくとも1つの断片またはそれらの誘導体の製造のためには、種々の発現ベクターを構築することができる。したがって、本発明の更なる態様は、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体をコードするDNA配列を含む組換えベクターを提供する。より詳しくは、本発明は、真核生物または原核生物複製起点、検出可能なマーカー、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその誘導体もしくは相同体あるいは30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体に対する抗体と交差反応性であるアレルゲン性タンパク質をコードするDNA配列、および所望により、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーの転写を指令しうるプロモーター配列を含んでなる組換えDNA分子に関する。20

## 【0104】

30kDaブタクサタンパク質アレルゲンプロモーターは、プロモータープローブベクターの使用、「染色体歩行」およびS1ヌクレアーゼマッピングおよび転写開始部位の上流のDNAとしての配列決定を含む多数の方法により、ブタクサゲノムDNAから単離可能である。

## 【0105】

したがって、本発明は、ブタクサ花粉プロモーター配列を含む組換えDNA分子を提供する。特に、組換えDNA分子は、該分子上に位置する、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーをコードする遺伝子またはその相同体もしくは縮重形態のプロモーターを含み、更に、該プロモーターの下流に1以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を有していて、これらの1以上の部位に挿入されたヌクレオチド配列は、正しいリーディングフレームで転写可能となり、発生的に調節される花粉特異的発現ベクターである。本発明で用いる「正しいリーディングフレーム」は「インフェーズ(in phase)」と同義である。前記のDNA分子は、好ましくは、該分子上に、選択可能なマーカー、例えば抗生物質または他の薬剤耐性遺伝子、例えば、アンピシリン、カルベニシリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシンなどに対する耐性をコードする遺伝子をも有する。組換え分子は更に、原核および/または真核細胞内での安定な遺伝のための手段を含む。これは、発現ベクターに関して前記した真核生物および/または原核生物複製起点を保持する組換え分子により達成されうる。30

## 【0106】

あるいは、組換え分子は、宿主細胞ゲノム内に組込まれて宿主細胞ゲノムの複製と同時に組換え分子が複製されるのを可能にする手段を保持する。好ましい原核生物宿主の具体例は、とりわけ、大腸菌 (*E. coli*)、バシラス (*Bacillus*) およびシュードモナス (*Pseudomonas*) を包含する。好ましい真核生物宿主は、酵母および真菌、昆虫、哺乳動物および植物に由来する細胞を包含する。40

## 【0107】

ブタクサタンパク質アレルゲンに対する抗体

本発明は、当業者に良く知られた方法に従い製造された、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたは組換え的もしくは合成的に製造された30kDaブタクサタンパク質アレルゲン50

の断片の少なくとも1つまたは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体に及ぶ。

【0108】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、種々の関連種の花粉に由来するアレルゲン性タンパク質と交差反応する30kDaブタクサタンパク質アレルゲンクローニングに関してcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。以下の考察における30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対する言及は、その誘導体、相同体ならびにそれらの免疫学的類縁体および化学合成誘導体を含む。以下の考察はまた、精製された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンならびにその断片、誘導体および相同体に特異的な抗体を含む。そのような抗体は、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに関する検出アッセイ（イムノアッセイ）（特に、治療または診断計画のモニタリングにおけるもの）の開発において、および組換え的もしくは合成的に製造された30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの精製において有用であると予想される。該抗体はモノクローナルまたはポリクローナルでありうる。また、本発明の範囲内には、前記の第1（一次）抗体に対する任意の第2（二次）抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）が含まれる。本発明は更に、検出アッセイにおける、および例えば、診断用または投与医薬製剤の効果のモニタリングにおける、これらの第1または第2抗体の使用を含む。さらに、本発明の範囲内には、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンと複合体形成した任意の分子に対する抗体が含まれる。したがって、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対する抗体は、そのようなブタクサタンパク質アレルゲンまたはその抗原性部分に対する及び任意の関連分子（例えば、脂質領域、担体分子、融合タンパク質など）に対する抗体を含む。

【0109】

本発明で考慮される30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその断片は精製され、ついで抗体産生において使用される。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が、組換え、合成または天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーでの免疫により入手可能であり、いずれのタイプのものもイムノアッセイに利用可能である。両方のタイプの血清の入手方法が当技術分野で良く知られている。ポリクローナル血清は、それほど好ましくはないが、精製30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたはその抗原性部分の有効量を適当な実験動物に注射し、該動物から血清を集め、公知の免疫吸収技術のいずれかにより特異的血清を単離することにより、比較的容易に製造される。この方法により製造された抗体は、実質的にあらゆるタイプのイムノアッセイにおいて利用可能であるが、それらは、一般には、該産物の潜在的不均一性のため、それほど好ましくはない。

【0110】

イムノアッセイにおけるモノクローナル抗体の使用は、それが大量に製造可能であり該産物が均一であるため、特に好ましい。免疫原性調製物に対して感作されたリンパ球と不死化細胞系とを融合することにより誘導されるモノクローナル抗体製造用のハイブリドーマ細胞系の製造は、当業者に良く知られた技術により行うことができる（例えば、KohlerおよびMilstein (1975) Nature 256: 495-499, ならびにKohlerおよびMilstein (1986) Eur. J. Immunol. 6: 511-519を参照されたい）。

【0111】

ポリクローナル血清の製造とは異なり、動物の選択は、リンパ球と融合しうる適当な不死化系の入手可能性に左右される。マウスおよびラットはハイブリドーマ技術において選択される動物であり、好ましく使用される。適当な不死化ヒト（または非ヒト）細胞系が入手可能である場合には、ヒトも感作リンパ球源として利用されうる。本発明の目的においては、選択した動物に、約0.1mg～約20mgの精製組換えまたは天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその一部を注射することができる。通常、注射物質をフロイント完全アジュバント中に乳化する。追加免疫注射も必要かもしれない。抗体産生の検出は、適当

10

20

30

30

40

50

に標識された抗原を用いて抗血清を試験することにより行うことができる。リンパ球は、無菌的に感作動物の脾臓またはリンパ節を取り出し融合を行うことにより得ることができる。あるいは、例えば、Reading (1982) J. Immunol. Methods 53: 261-291に記載のとおりに、in vitroでリンパ球を刺激または免疫することができる。

#### 【0112】

融合に適した多数の細胞系が開発されており、ハイブリダイゼーションプロトコールのための任意の特定の細胞系の選択が、増殖特性の均一性、速度、増殖培地の成分に関するその代謝の欠損および良好な融合頻度の可能性のような多数の基準のいずれかにより導かれる。

#### 【0113】

種内ハイブリッド（特に類似系統間のもの）は種間融合体より良好に機能する。骨髄腫免疫グロブリンを分泌する能力の喪失について選択された突然変異体を含めて、幾つかの細胞系が入手可能である。

#### 【0114】

細胞融合は、エプスタイン・バーまたはセンダイウイルスのようなウイルスあるいはポリエチレングリコールにより誘発されうる。ポリエチレングリコール（PEG）は、哺乳類細胞の融合のための最も効果的な物質である。PEG自体は細胞に毒性でありうるため、融合を試みる前に、生存性に対する影響に関して種々の濃度を試験すべきである。PEGの分子量範囲は1000～6000の種々の値でありうる。それは、塩水または無血清培地中で約20%～約70%（w/v）に希釈された場合に最も良い結果を与える。マウス細胞を使用する場合には、37℃で約30秒間のPEGへの曝露が好ましい。極端な温度（すなわち、約45℃）は避け、融合前の37℃での融合系の各成分のブレインキュベーションが有用でありうる。リンパ球と悪性細胞との比は、脾臓細胞間の細胞融合を避けるように最適化され、通常、約1:1～約1:10の範囲が用いられる。

#### 【0115】

成功裏に融合された細胞は、当技術分野で公知の任意の技術により骨髄腫系から分離することができる。最も一般的で好ましい方法は、ハイブリッドだけを増殖させるために使用され、一般にはヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンから構成されるアミノブテリン含有培地（一般にはHAT培地として公知である）中では増殖しないヒポキサンチングアニンホスホリボシリトランスクレオチド（HGPRT）欠損悪性細胞系を選択することである。融合の直後または24時間後、融合混合物をHAT含有培地中で増殖させることが可能である。供給計画は、通常、2週間にわたるHAT培地中での維持、およびそれに続く通常の培地またはヒポキサンチン、チミジン含有培地の供給を伴う。

#### 【0116】

ついで、抗原調製物を認識する抗体の存在に関して、増殖中のコロニーを試験する。ハイブリドーマ抗体の検出は、抗原を固相支持体に結合させ、推定抗体含有ハイブリドーマ上清と反応させるアッセイを用いて行うことができる。抗体の存在は、種々の指示薬を使用する「サンドイッチ」技術により検出することができる。一般的な方法のほとんどは、ハイブリッドの増殖中に分泌される抗体濃度の範囲での使用に十分な程度の感度を有する。

#### 【0117】

ハイブリッドのクローニングは、選択培地中での細胞増殖の21～23日後に行うことができる。クローニングは、流体相中の細胞限界希釈により又は半固体アガロース中の単細胞を直接的に選択することにより行うことができる。限界希釈の場合には、1ウェル当たり1個の細胞のみを有する統計的確率を得るために細胞懸濁液を系列希釈する。アガロース技術の場合には、フィーダー細胞を含有する下層の上の半固体上層にハイブリッドを播く。上層からのコロニーを拾い上げ、最終的にはウェルに移すことが可能である。

#### 【0118】

抗体を分泌するハイブリッドを種々の組織培養フラスコ中で増殖させて、種々の濃度の抗体を伴う上清を得ることができる。より高い濃度を得るために、ハイブリッドを動物に移して、炎症性腹水を得ることができる。腹腔内注射の8～12日後に抗体含有腹水を集め

10

20

30

40

50

ことができる。腹水は、より高い濃度の抗体を含有するが、炎症性腹水からのモノクローナル抗体および免疫グロブリンの両方を含む。ついで、例えばアフィニティークロマトグラフィーにより、抗体の精製を行うことができる。

#### 【 0 1 1 9 】

##### 30kDaブタクサタンパク質アレルゲンの検出

患者の血清、植物もしくは哺乳類組織または組織抽出物中の本発明で意図される30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはそれに特異的な抗体の存在は、モノクローナルまたはポリクローナルである前記のとおりに製造した抗体を使用して実質的にあらゆるタイプのイムノアッセイにおいて検出することができる。米国特許第4,015,043号、第4,424,279号および第4,018,653号を参考することにより理解されるとおり、多種多様なイムノアッセイ技術が利用可能である。これは、もちろん、伝統的な競合結合アッセイならびに非競合型の一部位 (single-site) および二部位 (two-site) アッセイまたは「サンドイッチ」アッセイの両方を含む。サンドイッチアッセイは、最も有用で一般的に用いられるアッセイの1つであり、本発明での使用に好ましい。サンドイッチアッセイ技術の多数の変法が存在し、すべて、本発明に含まれると意図される。簡潔に説明すると、典型的なフォワードアッセイにおいては、未標識抗体を固体担体中に固定化し、被検サンプルを該結合分子と接触させる。ついで、抗体-抗原二次複合体の形成を可能にするのに十分な適当なインキュベーション時間の後、検出可能なシグナルを生成しうるレポーター分子で標識された二次抗体を加え、抗体-抗原-標識抗体 (例えば、抗体-30kDaブタクサタンパク質-抗体) の三次複合体の形成に十分な時間にわたりインキュベートする。未反応物質を洗い落とし、該レポーター分子により生成されたシグナルの観察により該抗原の存在を判定する。結果は、可視シグナルの単純な観察による定性的なもの、あるいは既知量のハプテンを含有する対照サンプルとの比較により定量化されうるものであることができる。該フォワードアッセイの変法は、サンプルおよび標識抗体の両方を結合抗体に同時に加える同時アッセイ、または標識抗体および被検サンプルをまず一緒にしてインキュベートし次いで結合抗体に同時に加えるリバース (逆) アッセイを包含する。これらの技術は、容易に理解される任意のマイナーな変法を含めて、当業者に良く知られている。

#### 【 0 1 2 0 】

典型的なフォワードサンドイッチアッセイにおいては、本発明で意図される30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその抗原性部分に対して特異性を有する1次抗体は、共有的または受動的 (passively) に固体表面に結合している。該固体表面は、典型的には、ガラスまたは重合体であり、最も一般的に使用される重合体は、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。該固体支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスク、またはイムノアッセイを行うのに適した任意の他の表面形態でありうる。結合方法は当技術分野で良く知られており、一般には架橋共有結合または物理的吸着よりなり、被検サンプル調製時に重合体-抗体複合体を洗浄する。ついで被検サンプルのアリコートを固相複合体に加え、抗体中に存在する任意のサブユニットの結合を可能にするのに十分な時間にわたり25でインキュベートする。インキュベーション時間は様々であるが、一般には、約2~40分間の範囲である。インキュベーション時間の後、抗体サブユニット固相を洗浄し、乾燥させ、ハプテンの部分に特異的な二次抗体と共にインキュベートする。二次抗体は、ハプテンへの二次抗体の結合を示すために使用するレポーター分子に連結されている。

#### 【 0 1 2 1 】

本明細書で用いる「レポーター分子」は、その化学的性質により抗原結合抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルを与える分子を意味する。検出は定性的または定量的でありうる。このタイプのアッセイにおいて最も一般的に使用されるレポーター分子は、酵素、発蛍光団または放射性核種含有分子 (すなわち、放射性同位体) である。酵素イムノアッセイの場合には、一般にはグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩を使用して、酵素を二次抗体に結合させる。しかし、容易に認識されるとおり、多種多様な結合技術が存在し、それらは当業者に容易に利用可能である。一般的に使用される酵素は、とりわけ

10

20

30

40

50

、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼを包含する。特異的酵素と共に使用する基質は、一般には、対応酵素による加水分解に際して、検出可能な変色が生じるよう選択される。例えば、アルカリホスファターゼコンジュゲートを使用する場合にはR-ニトロフェニルホスファートが適しており、ペルオキシダーゼコンジュゲートには、1,2-フェニレンジアミン、5-アミノサリチル酸またはトルイジンが一般に使用される。また、前記の発色基質の代わりに、蛍光産物を与える発蛍光性基質を使用することも可能である。いずれの場合においても、一次抗体ハプテン複合体に酵素標識抗体を加え、結合させ、ついで過剰の試薬を洗い落とす。ついで、適当な基質を含有する溶液を抗体-抗原-抗体の三次複合体に加える。基質は、二次抗体に連結された酵素と反応して定性的可視シグナルを与え、これを更に、通常は分光光度的に定量して、サンプル中に存在したハプテンの量の指標を得ることができる。「レポーター分子」は、赤血球等の細胞の凝集または凝集の抑制またはラテックスビーズ等への使用などにも拡張される。  
10

#### 【0122】

あるいは、フルオレセインおよびローダミンのような蛍光性化合物を抗体に、その結合能を改変することなく化学的に結合させることができる。特定の波長の光の照射により活性化される場合には、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収し、該分子の励起状態を誘導し、ついで、光学顕微鏡で視覚的に検出されうる特徴的な色の光を放出する。EIAの場合のように、蛍光標識抗体を一次抗体-ハプテン複合体に結合させる。ついで、未結合試薬を洗い落とした後、残存三次複合体を適当な波長の光にさらす。観察されるフルオレセインは、対象のハプテンの存在を示す。免疫蛍光およびEIA技術は、当技術分野において非常によく確立されており、かつ、本方法に特に好ましい。しかし、放射性同位体、化学発光または生物発光分子のような他のレポーター分子も使用することができる。要求される目的に適合するよう該方法をどのように改変すべきかは、当業者に容易に理解されるであろう。また、本発明の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンを直接的または間接的（すなわち、抗体を介して）に検出するために前記のものを使用しうることが明らかであろう。  
20

#### 【0123】

「タンパク質チップ」なる語は、タンパク質をアッセイするためのチップを意味する。タンパク質チップの具体例は、生物学研究用の汎用性の集積プラットフォームを科学者に提供しているCiphergenから入手可能なCiphergen ProteinChip（登録商標）Systemを提供する。種々の入手起源に由来する生物学的に重要な分子を、迅速なデータ解析のためのProteinChip ReadersおよびProteinChip Softwareを使用するProteinChip Arrays上に捕捉し解析することができる。本発明の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンは、タンパク質チップを使用して解析することができる。  
30

#### 【0124】

本発明の別の態様は、血清、組織抽出物、植物抽出物または他の生物学的流体中に存在する30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体あるいは30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体と免疫学的に反応性のアレルゲン性タンパク質の検出方法であって、試験する血清、抽出物または流体を30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対する抗体と、アレルゲン性タンパク質-抗体複合体の形成に十分な時間にわたり及び条件下で接触させ、該複合体を検出手段に付す工程を含んでなる方法を提供する。  
40

#### 【0125】

##### キット

本発明はまた、哺乳動物の体液（例えば、血清、組織抽出物、組織流体）、in vitro細胞培養上清および細胞ライセート中の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体、相同体もしくは免疫学的類縁体に対する抗体についての迅速かつ簡便なアッセイのためのキットに関する。該キットは、その抗原成分に適合した第1容器と、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対する抗体を含有するように適合した第2容器とを収容するように区画化されており、該抗体は、前記のとおりの検出可能なシグナルを与えうるレポーター  
50

分子で標識されている。該レポーター分子が酵素である場合には、該酵素の基質を含有するように適合した第3容器が設けられる。本キットの用途の1つにおいては、被検サンプル中に抗体が存在する場合、該抗体が該第1容器内の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに結合するための時間にわたり、また該条件下で、該被検サンプルを該第1容器の内容物と接触させる。該第1容器の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンが試験流体中の抗体に結合していれば、第2容器の抗体は二次複合体に結合して三次複合体を形成する。これらの抗体はレポーター分子で標識されているため、検出手段に付されると、三次複合体が検出される。

#### 【0126】

したがって、本発明の1つの態様は、アレルゲン性を有するタンパク質、ブタクサの花粉に由来するタンパク質に対する抗体の検出のためのキットであり、該キットは、組換え30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその抗原性誘導体もしくは相同体あるいは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその抗原性誘導体もしくは相同体を含有するように適合した第1容器と、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体に対する抗体を含有するように適合した第2容器とを収容するように区画化されており、該抗体は、検出可能なシグナルを与えうるレポーター分子で標識されている。該「レポーター分子」は、ラテックスビーズ上の赤血球(RBC)の凝集に関連したものでありうる。このキットにおいては、該レポーター分子は、放射性同位体、酵素、蛍光分子、化学発光分子、生物発光分子またはRBCである。あるいは、該キットは、検出可能なシグナルを与えうるレポーター分子で標識された組換え30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体もしくは相同体を含有するように適合した容器を含む。

#### 【0127】

##### 免疫療法

枯草熱および季節性喘息は、それらの薬理学および免疫学における進歩にもかかわらず、環境中のアレルゲンの存在のため、有意な罹患的および社会経済的な影響を西洋地域社会に与え続けている。抗ヒスタミン剤およびステロイド剤を含む利用可能な薬物の範囲はアレルギー疾患の治療における改善をもたらしたが、それらは、長期使用に関連した不都合な副作用を有する。これらの問題のため、アレルギー疾患の免疫療法において、新たな関心が示されている。免疫療法は、アレルギー反応に対して患者を感作するための強力なアレルゲン抽出物の注射を伴う(Bousquet, & Michel (1989) *Allergy Clin. Immunol. News* 1: 7-10)。残念ながら、アレルゲンとして使用された花粉調製物は多価であり、低品質である。そのため、IgG応答を誘導するために用いる濃度はしばしば高く、アナフィラキシーを含む全身反応の誘発により致死的となりうる。アレルゲンの配列に基づくクローニング遺伝子産物または合成ペプチドは、品質管理、特徴づけ及び標準化がなされうるため、治療のための、より安全な媒体を与える。

#### 【0128】

症候軽減の厳密なメカニズムは依然として仮説に過ぎない。しかし、本発明の組換え、合成もしくは精製天然30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその少なくとも1つの抗原性断片を含む製剤の、ブタクサ感受性個体への投与は、例えば、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するB細胞応答、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するT細胞応答または30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するB細胞およびT細胞の両方の応答を修飾することにより、ブタクサ花粉アレルゲンに対するブタクサ感受性個体のアレルギー応答を修飾する。

#### 【0129】

したがって、本発明は、ブタクサ花粉に対してアレルギー性のヒトを脱感作するための方法であって、クサ花粉に対するヒトの脱感作を引き起こすのに十分な時間にわたり、また該条件下で、脱感作に有効な量の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその少なくとも1つの断片もしくは誘導体、相同体もしくは免疫学的類縁体を投与することを含む方法を提供する。

#### 【0130】

10

20

30

40

50

本発明はまた、ブタクサ花粉に感受性である哺乳動物におけるブタクサ花粉に対する過敏症の治療方法であって、治療的に有効な量の本発明の治療用組成物を該哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。本発明は更に、治療的に有効な量の本発明のタンパク質製剤を哺乳動物に投与することを含む、ブタクサ花粉アレルゲンまたはブタクサ花粉アレルゲンと免疫交差反応するアレルゲンに対する過敏症の治療方法を提供する。

#### 【0131】

本発明のペプチドおよびタンパク質の使用により、一貫した十分に特徴づけられた組成および生物活性の製剤を製造し、治療目的（すなわち、ブタクサの花粉に対するブタクサ花粉感受性個体のアレルギー応答を修飾するため）に投与することができる。そのようなペプチドまたはタンパク質の投与は、例えば、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するB細胞応答、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンに対するT細胞応答、または両方の応答を修飾しうる。また、ブタクサタンパク質アレルギーの免疫療法のメカニズムを研究するため及び免疫療法において有用な修飾誘導体または類似体を設計するために、精製ペプチドを使用することができる。

#### 【0132】

##### 医薬組成物

したがって、本発明は、脱感作または治療的に有効な量の30kDaブタクサタンパク質アレルゲンまたはその誘導体、相同体もしくは免疫学的類縁体と、1以上の製薬上許容される担体および/または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。30kDaブタクサタンパク質アレルゲンを含む医薬組成物の有効成分は、個々の場合に応じた量で投与されると、例えば、ブタクサ花粉に対してアレルギー性のヒトの脱感作において、優れた治療活性を示すと考えられる。例えば、約0.5μg～約20mg/kg体重/日を投与することが可能である。投与計画は、最適の治療応答が得られるよう調節することができる。例えば、数回の分割量を毎日投与することが可能であり、あるいは治療状況の緊急性により示されるとおりに該用量を比例的に減少させることができると考えられる。該活性化合物は、経口、静脈内（水溶性の場合）、筋肉内、皮下、鼻腔内、皮内もしくは坐剤経路または移植（例えば、徐放性分子を使用する場合）のような簡便な方法で投与することができる。投与経路に応じて、本発明の医薬組成物を構成する有効成分は、酵素、酸および該成分を不活性化しうる他の天然状態の作用から該成分を防御するための物質でコーティングする必要があるかもしれない。例えば、30kDaブタクサタンパク質アレルゲンは、酵素阻害剤と共に投与される佐剤（アジュバント）中またはリポソーム中で投与することができる。佐剤は、その最も広い意味で用いられ、インターフェロンのような任意の免疫刺激性化合物を含む。本発明で意図される佐剤は、レゾルシノール、非イオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルを含む。酵素阻害剤はブチトリプシンを含む。リポソームは、水中油中水CGFエマルションおよび通常のリポソームを含む。T細胞アレルギーを誘導する目的には、医薬組成物は、好ましくは、非免疫原性形態（例えば、それはアジュバントを含有しない）で投与する。

#### 【0133】

また、該活性化合物は、非経口的または腹腔内に投与することができる。また、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物中ならびに油中で分散液を調製することができる。保存および使用の通常の条件下では、これらの製剤は、微生物の増殖を妨げるための保存剤を含有する。

#### 【0134】

注射用に適した医薬形態は、無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および用時分散用の無菌粉末を含む。いずれの場合も、該形態は無菌でなければならず、容易なシリンジ通過性が存在する程度に流動性でなければならない。それは製造および保存の条件下で安定でなければならない、細菌および真菌のような微生物の汚染作用から保護されなければならない。該担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適当な混合物および植物油を含有する溶媒または分散媒でありうる。適切な流動性は、例えば、レシチンのような

10

20

30

40

50

コーティング剤の使用、分散液の場合には要求される粒径の維持およびスープラーファクタント (surfactant) の使用により維持することができる。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによりもたらされうる。多くの場合、等張化剤、例えば糖または塩化ナトリウムを加えることが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを該組成物中で使用することによりもたらされうる。

## 【0135】

無菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて前記の種々のその他の成分と共に、適当な溶媒中に含有させ、ついで濾過滅菌することにより製造することができる。一般に、分散液は、前記で列挙したものから選ばれる必要な他の成分と基本分散媒とを含有する無菌ビヒクル中に種々の無菌有効成分を含有させることにより製造することができる。無菌注射溶液製造用の無菌粉末の場合には、好ましい製造方法は、該有効成分と任意の追加的な所望の成分との粉末を、予め滅菌濾過されたその溶液から与える真空乾燥および凍結乾燥技術である。

## 【0136】

少なくとも1つの30kDaブタクサタンパク質アレルゲンファミリーメンバーまたは少なくとも1つのその断片が、前記のとおりに適切に保護されている場合には、該活性化合物を、例えば不活性希釈剤または同化可能な可食担体と共に経口投与することが可能であり、あるいはそれを硬または軟殻ゼラチンカプセル中に封入することが可能であり、あるいはそれを錠剤に圧縮することが可能であり、あるいはそれを食事の食物中に直接加えることが可能である。経口的な治療用投与には、該活性化合物を賦形剤と共に含有させ、摂取可能な錠剤、バッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハースなどの形態で使用することが可能である。そのような組成物および製剤は、少なくとも1重量%の活性化合物を含有すべきである。該組成物および製剤に対する割合(%)は、もちろん、様々でありうるが、簡便には、該単位の重量の約5~80%でありうる。そのような治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、適当な投与量が得られるような量である。本発明の好ましい組成物または製剤は、経口投与単位形態が約10~2000mgの活性化合物を含有するように製造される。

## 【0137】

該錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは以下のものも含有しうる。トラガカントゴム、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチンのような結合剤；リン酸二カルシウムのような賦形剤；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤；およびスクロース、ラクトースまたはサッカリンのような甘味剤を加えることが可能であり、あるいはハッカ、冬緑油またはサクランボ香料のような香味剤を加えることも可能である。投与単位形態がカプセル剤である場合には、それは、前記のタイプの物質に加えて、液体担体を含有しうる。コーティングとして、または該投与単位の物理的形態を修飾するために、種々の他の物質が存在しうる。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤は、シェラック、糖またはそれらの両方でコーティングすることができる。シロップ剤またはエリキシル剤は、該活性化合物、甘味剤としてのスクロース、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、サクランボまたはオレンジ香料のような着色剤および香味剤を含有しうる。もちろん、いずれの投与単位形態の製造に使用するいずれの物質も、製薬上純粋であり、使用する量において実質的に無毒性であるべきである。また、該活性化合物を徐放製剤および配合物中に含有させることができある。

## 【0138】

本発明で用いる「製薬上許容される担体および/または希釈剤」は、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質に対するそのような媒体および物質の使用は当技術分野で良く知られている。いずれかの通常の媒体または物質が該有効成分に適合しない場合を除き、該治

10

20

30

40

50

療用組成物中でのそれらの使用が意図される。補足的な有効成分も、該組成物中に含有させることが可能である。

【0139】

投与の容易さ及び用量の均一性のためには、親組成物を投与単位形態に製剤化することが特に有利である。本発明で用いる投与単位形態は、治療する哺乳動物対象に対する単位用量に適した物理的に分離した単位を意味し、各単位は、必要な医薬担体と共に、所望の治療効果を与えるよう計算された所定量の活性物質を含有する。本発明の新規投与単位形態の規格は、(1)該活性物質の特有の特徴および達成される個々の治療効果、ならびに(b)本明細書中に詳しく開示されている身体の健康が損なわれた病態を示す生きた対象における疾患の治療のためにそのような活性物質を配合する技術における固有の制限によって決まり、それらに直接的に左右される

簡便かつ有効な投与のためには、該主要有効成分を有効な量で、製薬上許容される適当な担体と共に、前記で開示した投与単位形態に配合する。単位投与形態は、例えば、主要活性化合物を、約10μg～約2000mgの範囲の量で含有しうる。比率で表すと、該活性化合物は、一般には、担体1ml当たり約10μg～約2000mgで存在する。補足的活性成分を含有する組成物の場合には、投与量は、該成分の通常の用量および投与方法を参考にして決定する。

【0140】

以下に、非限定的な実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

【実施例】

【0141】

A. 材料および方法

花粉粒

完全および脱脂オオブタクサ (*Ambrosia trifida*) 花粉粒をGreer laboratories (Lenoir, NC) から購入した。オオブタクサからの対照花粉抽出物をBayer, Inc (Spokane WA) から購入し、イヌにおける皮膚試験に使用した。オオブタクサ、短 (short) ブタクサおよび西洋 (Western) ブタクサの花粉抽出混合物を、ヒトにおける臨床的経皮皮膚試験のためにBayer, Inc. から購入した。

【0142】

タンパク質の定量およびアミノ酸の配列決定

タンパク質は、標準として グロブリンを使用するBradford法で定量した (Bradford, M. A. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 : 248-254)。アミノ酸配列は、Protein Structure Laboratory, University of California, Davisにより、質量分析によりトリプティックペプチドで決定された。

【0143】

モノブロモビマン (mBr) でのタンパク質の標識

タンパク質溶液を1mM ジチオトレイトールで100℃で5分間にわたり還元した。該サンプルを室温に冷却し、室温で20分間のインキュベーションにより0.2mM mBrで標識した。該反応を、10mM -メルカプトエタノールを加えることにより停止させ、該タンパク質を、トリクロロ酢酸を12%まで加えることにより沈殿させた。100% アセトンで洗浄した後、該ペレットをSDS-PAGEに付し、Wongら (Wong, J. H., Kobrehel, K. および Buchanan, B. B. (1995) Thioredoxin and seed proteins. Methods in Enzymology 252: 228-240) に記載のとおりに、タンパク質標識の度合を365nmでの分光法により可視化した。

【0144】

糖タンパク質の染色

SDS-PAGEによる分離の後、Pierce (Rockford, IL) からのゲルGelCode Glycoprotein Staining Kitでグリコシル化に関してタンパク質を染色した。

【0145】

10

20

30

40

50

ゲル電気泳動

サンプルを1mM ジチオトレイトルにより100℃で5分間にわたり還元し、室温に冷却した後、10~20% SDS-PAGEにおいて分離した (Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5)。泳動後、ゲルを固定し、クーマシープリリアントブルーG-250で染色し、10% 酢酸で脱染した。本発明者らは、Amb t5のような低分子量タンパク質が、クーマシープルーで有效地に染色されるためにはジチオトレイトルによる還元を要すること、および脱染のためのメタノールの使用が該タンパク質を該ゲルから除去することを観察した。

## 【0146】

免疫プロット

タンパク質を、半乾燥条件下、20% メタノール溶液 (25mM Tris塩基、192mM グリシン、0.1% SDS) で4℃で1時間にわたり、10~20% SDS-PAGEからニトロセルロースメンブレンにトランスファーした。ニトロセルロースメンブレンをポンソーレッドで手短に染色してトランスファーの度合を確認し、ついで3% 牛乳溶液 (20mM Tris-HCl, pH 7.5、150mM NaClおよび0.2% Triton X-100) と共に室温で30分間にわたり2回インキュベートすることによりブロッキングした。ついでメンブレンを、同じ溶液中の1~10倍希釈の血清中で4℃で一晩インキュベートした。最後に、メンブレンを、1000倍希釈のホースラディッシュペルオキシダーゼ共役二次抗ヒトIgE (Sigma) 中、室温で1時間インキュベートし、反応性タンパク質を、ペルオキシダーゼに対する3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) 基質キット (Vector laboratories (Burlingame, CA)) で同定した。

## 【0147】

ELISA

マイクロプレートを、10mM PBS (pH 7.5) 中、100μlの1μg/ml 各精製アレルゲン (後記を参照されたい) で、4℃で一晩放置することによりコーティングした。該プレートを、0.05% Triton X-100を含有する10mM PBS (pH 7.2) (バッファーA) で3回洗浄し、バッファーA中の1% 乳で37℃で2時間にわたりもう一度コーティングし、前記のとおりに洗浄した。10個の異なるヒト血清のそれぞれの系列希釈 (10~50倍) をバッファーAに加え、インキュベーションを37℃で更に2時間継続した。プレートを前記のとおりに洗浄し、1000倍希釈のペルオキシダーゼ共役二次抗ヒトIgE (Sigma) と共に37℃で2時間インキュベートした。該共役ペルオキシダーゼを測定するためのTMB基質を、該製造業者の指示に従い加え、該反応を、マイクロプレートリーダーを使用して650nmにおける線形性に関して1時間にわたりモニターした。該反応を50μlの0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、吸光度を450nmで測定した。該実験を3回繰返し、試験した10個のヒト血清の場合の各アレルゲンについて平均を計算した。

## 【0148】

皮膚試験

感作イヌでの皮膚試験によりI型過敏症反応を測定するための方法は文献に記載されている (Ermel, R. W., Kock, M., Griffey, S. M., Reinhart, G. A. および Frick, O. L. (1997) The atopic dog: a model for food allergy. *Laboratory Animal Science* 47: 40-9)。簡潔に説明すると、皮膚試験の5分前に0.5% エバンスブルー色素 (0.2ml/kg) を静脈内に注射した。半対数希釈度の該試験タンパク質溶液の0.1mlのアリコートを腹側腹部皮膚に皮内注射した。皮膚試験は、各青色斑点の直交する2つの直径を評価する同じ熟練した盲検化観察者により判定された。各試験動物について、適当な陰性対照 (PBS中で希釈) を加えた。

## 【0149】

ヒト血清

オオブタクサ、短 (short) ブタクサおよび西洋 (Western) ブタクサ花粉抽出物の混合物に対する陽性プリック皮膚試験結果 (陰性対照より3mm大きな膨疹) および秋花粉症を有する患者からの7個の血清、ならびにオオブタクサに対するPharmacia ImmunoCAP特異的IgEアッセイの陽性結果 (IU/kI > 0.35) を有する患者からの15個の血清を使用した。これら

10

20

30

40

50

の被験者の多くは、カリフォルニアに居住する前に米国の中西部、東部または南東部に居住していたことが判明したが、すべての被験者に関する完全な地理的履歴を入手することはできなかった。また、ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) に対しては（プリック皮膚試験、陽性ImmunoCAPおよび晩春アレルギー性鼻炎により）感受性であるがオオブタクサに対してはImmunoCAPアッセイで陰性であることが判明している患者からの更に20個の血清を加えた。

#### 【0150】

##### 相対アレルゲン性の計算

精製された又は花粉抽出物中の等量のタンパク質を注射し、膨疹を与える最少量を示す相対値 (330ngタンパク質=1、100ng=2、33ng=3、10ng=4、3.3ng=5、1ng=6および0.33ng=7) を割り当てた。ついで、試験したイヌの2群 [4匹の老いた(7歳)イヌおよび5匹の若い(2歳)イヌ]について、各精製タンパク質または抽出物に関する値を合計した。

#### 【0151】

##### タンパク質抽出およびアレルゲン精製

Marshら、1981の方法の適用に従った (Marsh, D. G., Belin, L., Bruce, A., Lichtenstein, L. M. および Hussain, R. (1981) Rapidly released allergens from short ragweed pollen. I. Kinetics of release of known allergens in relation to biologic activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 67 (3): 206-16. Hussain, R., Norman, P. S. および Marsh, D. G. (1981) Rapidly released allergens from short ragweed pollen. II. Identification and partial purification. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 67 (3): 217-22)。該方法を達成するために、抽出物を10gの花粉(完全または脱脂)から調製し、種々の研究処理に付した。タンパク質の精製のためには、100gの完全花粉を使用した。簡潔に説明すると、該花粉を1gにて10mlの冷バッファー [1μM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) と 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>とを含有する 50mM Tris-HCl pH 7.4] に懸濁させ、室温で30分間、穏やかに攪拌した。該混合物を 25,900 × g、4

で10分間遠心分離した。該花粉粒を含有するペレットをとっておき、該上清画分を再び遠心分離し、ワットマン定量フィルターで濾過した。硫酸アンモニウムを95%飽和まで加えて浮遊ペレットを得、これを遠心分離(10分間、25,900 × g、4)により回収し、200mM NaClを含有する20mM Tris-HCl pH 7.5の最小容量に再懸濁させた。完全および脱脂花粉では、等量の石油エーテルでの抽出により大量の脂質を除去した。該混合物を遠心分離(10分間、48,400 × g、4)し、該有機画分を捨てた。該石油エーテル工程を少なくとも4回繰返した。得られた清澄化水溶液を0.2μM フィルターで濾過し、100gの花粉の場合には、サンプルを溶解するのに使用したのと同じバッファーで平衡化および溶出される Sephadex G-50F ゲル濾過カラム (2.1 × 90cm) で分離した。該画分を 10 ~ 20% SDS-PAGEにより分析し、タンパク質のサイズに応じて一緒にし、10mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) に対して4で一晩透析した。該方法の残りの部分は、出発物質として100gの花粉を使用した場合に関して記載する。

#### 【0152】

##### 30kDaタンパク質

完全花粉からのタンパク質と一緒にした Sephadex G-50F 画分を 10mM リン酸K (pH 7.0) に対して透析し、まず、6mlのResource Sカラムに、ついで6mlのResource Qカラム(共に20mM リン酸K (pH 7.0) で平衡化されたもの)にアプライした。30kDaタンパク質(本発明においては30kDaブタクサタンパク質アレルゲンおよび30kDaブタクサ完全花粉抽出物ジスルフィドタンパク質アレルゲンとして知られる)はいずれの場合にも保持されず、カラム通過画分中に回収された。相当量の汚染物質が該カラム上に保持され、したがって30kDaタンパク質から除去された。30kDaタンパク質を含有する画分を硫酸アンモニウム(95%飽和)での沈殿に付し、48,400 × g、4で10分間遠心分離した。該上清画分を捨て、該ペレットを、2.0M 硫酸アンモニウムを含有する2~3mlの容量の50mM リン酸K (pH 7.0) に再懸濁させた。該画分を、同じバッファーで平衡化された1mlのResource Isopropylカラムにアプライした。2~0M の勾配の硫酸アンモニウム60mlを用いたところ、30kDaタンパク

10

20

30

40

50

質は1.7Mで溶出した。30kDaタンパク質を含有する画分をSDS-PAGE (mBBr標識およびクーマシープルーカー染色を使用) により局在化し、一緒にし、5mM リン酸K (pH 7.0) に対して透析した。ついで酢酸ナトリウム (pH 4.75) を30mMまで加え、該サンプルを、同じバッファーで平衡化された6mlのResource Sにアプライした。30kDaタンパク質は、0~300mM の勾配のNaCl120mlにおいて100~200mM NaClで溶出した。該画分を、50mM リン酸K (pH 7.0) の添加により中和し、10mMの同じバッファーに対して透析し、YM-10 Amicon膜での限外濾過により濃縮し、-70で保存した。ブラッドフォードアッセイを用いてタンパク質を定量した。

## 【0153】

30kDaタンパク質(別法)

10

20mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>、0.5M NaClを加えた後、一緒にしたSephadex G-50F画分を、同じバッファーで平衡化された18mlのコンカナバリンAアフィニティーカラム (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) にアプライした。30kDaタンパク質は保持され、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5M NaClおよび0.5M メチル-D-グルコピラノシドの溶液で溶出した。30kDaタンパク質を含有する画分と一緒にし、分子量25,000カットオフ孔を有する膜を使用して5mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) に対して透析した。最後に、該タンパク質を、20mM 酢酸Na (pH 6.0) で平衡化された6mlのResource Sカラムにアプライし、通過画分中に回収した。

## 【0154】

Amb t 5

20

Amb t 5を含有する完全花粉からの低分子量Sephadex G-50F画分に硫酸アンモニウムを2.6Mまで加えた。得られた溶液を、200mM リン酸バッファー (pH 7.0) で平衡化され同じバッファー中の2.5~0Mの勾配の硫酸アンモニウム50mlで溶出される1mlのHiTrap Phenyl Sepharoseカラム上で分画した。純粋なAmb t 5を約0.8M 硫酸アンモニウムで単一のピークとして回収し、5mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) に対して透析し、更なる実験のために-70で保存した。278nmで5800のモル吸光係数を用いて、タンパク質を定量した (Gill, S. C. および von Hippel, P. H. (1989) Calculations of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical Biochemistry 182: 319-26)。

## 【0155】

Amb t 3およびシトクロムc

30

Amb t 3の最大収量を完全花粉から、シトクロムcを脱脂花粉から得た。それぞれの花粉調製物からの約10~20kDaタンパク質を含有するSephadex G-50F画分と一緒にし、20mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) で平衡化された6mlのResource Sカラムにアプライした。Amb t 3およびシトクロムcを、20mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) 中の0~500mM の勾配のNaCl120mlで分離した。Amb t 3は100~120mM NaClで、シトクロムcは150~170mM NaClで溶出した。Amb t 3の銅を酸化するために該画分にフェリシアン化カリウムの結晶を加えて該溶液を青変させることにより、Amb t 3の存在を確認した。Amb t 3を含有する画分と一緒にし、硫酸アンモニウムで2Mにした。200mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) で平衡化された1mlのHiTrap Phenyl Sepharoseカラムでの分離により、Amb t 3およびシトクロムcの最終精製を達成した。該カラムを、(1) Amb t 3には1.75~0M (Amb t 3は1.4Mで溶出した) および(2) シトクロムcには2.0~0M (シトクロムcは1.2Mで溶出した) の勾配の硫酸アンモニウム60mlで溶出した。ついで該精製タンパク質を10mM リン酸Kバッファー (pH 7.0) に対して透析し、アリコート中に-70で保存した。ブラッドフォードアッセイを用いて、およびAmb t 3の場合には278nmにおいて26600のモル吸光係数を用いて、タンパク質含量を定量した (Gill, S. C. および von Hippel, P. H. (1989) Calculations of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical Biochemistry 182: 319-26)。

## 【0156】

Amb t 1および2

脱脂花粉から最大量のAmb t 1-2を得た。35kDa以上のタンパク質を含有するSephadex G-5

40

50

OF画分を、14mM -メルカプトエタノールを含有する20mM Tris-HCl (pH 7.9) に対して透析した。後続の工程は、Kingのグループの方法から修飾されたものであった (King, T. P. (1972) Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. *Biochemistry* 11: 367-371. Ishizaka, K., Kishimoto, T. Delespesse, G. および King, T. P. (1974) Immunogenic properties of modified antigen E. I. Presence of specific determinants of T cells in denatured antigen and polypeptide chains. *Journal of Immunology* 113 : 70-7. King, T. P. Philip, S. N. および Tao, N. (1874) Chemical modifications of the major allergen of ragweed pollen, antigen E. *Immunochemistry* 11: 83-92. Ishizaka, K. Okudaira, H. および King T. P. (1975) Immunogenic properties of modified antigen E. II. Ability of urea-denatured antigen and alpha-polypeptide chain to prime cells specific for antigen E. *Journal of Immunology* 114: 110-5. King, T. P., Kouchman, L., Ishizaka, K., Lichtenstein, L. および Norman, P. S. (1975) Immunochemical studies of dextran coupled ragweed pollen allergen, antigen E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 169: 464-473)。該タンパク質溶液を、20mM Tris-HCl (pH 7.9) で平衡化された6mlのResource Qカラムにアプライし、0~500mM の範囲のNaCl 240mlの勾配で溶出した。Kingのグループにより既に記載されているとおり、該タンパク質は約50mM NaClで溶出した。硫酸アンモニウムを2.5Mまで加え、該溶液を、2.5M 硫酸アンモニウムを含有する100mM リン酸K (pH 7.0) で平衡化された1mlのResource Isopropylカラムにアプライした。Amb t 1およびAmb t 2は、2.5M~0Mの100mlの勾配における約1.4M 硫酸アンモニウムで溶出した。陽性画分を前記のとおりに同定し、一緒にし、YM-30 Amicon膜による限外濾過により濃縮し、10mM リン酸K (pH 7.0) に対して透析し、アリコート中で-70 で保存した。該陽性画分はSDS-PAGEにより正しい分子量を有することが示された。ブタクサ感受性イヌでの皮膚試験により、アレルゲン性を確認した。ブラッドフォードアッセイでタンパク質を定量した。

### 【0157】

30kDaタンパク質と他の花粉との考えられうる交差反応性を調べるために、カリフォルニアに転居する前にブタクサ繁茂地域に住んでいた患者からの4個の患者血清に対して、免疫プロット抑制を行った。ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) およびクログルミ (*Juglans nigra*) の完全花粉をHollister-Stier (Spokane, WA) から購入した。簡潔に説明すると、5gの花粉をPBS (1:20 w:v) 中で4 で一晩抽出し、前記のとおりの遠心分離によりペレット化した。その後、上清をエーテルで脱脂し、有機相を捨てた。250 μg/ml のペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) 花粉抽出物、クログルミ (*Juglans nigra*) 花粉抽出物、またはオボアルブミン (Sigma) (陰性対照) の存在下、血清のプレインキュベーションを、4 で一晩行った。ついで該血清を前記のとおりにニトロセルロース片と共にインキュベートし、洗浄し、<sup>125</sup>I標識抗IgE (Hycor Biomedical, Inc., Garden Grove, CA) を、Teuberら, 1999に記載のとおり免疫プロット法のための二次抗体として使用した。

### 【0158】

#### B. 結果および考察

比較アレルゲン研究において、Marshら (Marshら (1981))、Hussainら (1981)は、完全ブタクサ花粉と脱脂ブタクサ花粉との間に有意な相違を見出さなかった。これに対して、アトピー性のイヌの過敏性応答に関する本発明者らの予備研究は、完全花粉および脱脂花粉でのアレルゲンプロフィールにおける相違を示唆した (Ermelら (1997) および G. del Valら, J. Allergy Clin. Immunol. 103, 690 (1999))。該結果は、花粉に対するアレルゲン性応答に関連している可能性があるため、興味深く思われた。BridgerおよびProtcor, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 80, 445 (1971)に示されているとおり、花粉粒サイズのアルブミンビーズは、飲み込まれる前に鼻および喉頭に約30分間留まる。したがって、その時間中に大量の花粉タンパク質が放出される (Howlettら, J. Cell Sci., 13, 603 (1973))。したがって、本発明者らは、抽出の最初の20分以内に放出されるタンパク質に焦点を合わせた。なぜなら、この画分中に新規アレルゲン (「第1放出タンパク質」) が存在しうる。

10

20

30

40

50

ると考えられるからである。この画分はいくつかのアレルゲン (Amb t 5, Amb t 3およびシトクロムc) を含有することが公知である (Marshら, (1981), Hussainら, (1981))。しかし、主要アレルゲン (Amb t 1) は、最大放出に数時間を要する (King (1972), Ishizakaら (1974), Kingら (1974) および Ishizakaら (1974))。本発明者らの初期の結果は、脱脂花粉が、該第1放出タンパク質アレルゲンの欠損の点で、その完全対応物と異なることを示唆した (データは示していない)。

#### 【0159】

##### アレルゲンとしての30kDaタンパク質の同定

この知見に促されて、本発明者らは、完全および脱脂ブタクサ花粉の第1放出タンパク質中に存在するアレルゲンの分析を行うこととなった (Bradford (1976))。完全花粉粒の水性抽出物中に回収された大量の脂質のため、本発明者らは、大量の「第1放出タンパク質」を得るための方法を案出した。本比較研究においては、石油エーテル抽出および濾過の工程の後に得られた水溶液を Sephadex G-50F ゲル濾過カラムにアプライし、該画分を、ブタクサ感受性患者からの血清でプローブした。ついで、それらの2つのタイプの花粉調製物からの画分を、(a) クーマシーブルー染色を用いて全タンパク質に関して (図3A) 、(b) ジチオトレイトール (9, 24-27) での還元後に適用される蛍光プローブであるモノプロモビマン (mBr) を使用してスルフヒドリル基を含有するタンパク質に関して (図3B) 、および (c) オオブタクサに対する特異的 IgE を有する 10 名の患者からのプール化血清を使用してアレルゲンに関して (図3C) 調べた (S. S. Teuber, K. C. Jarvis, A. M. Dandekar, W. R. Peterson, A. A. Ansari, J. Allergy Clin. Immunol. 104, 1311 (1999))。

#### 【0160】

完全および脱脂花粉間で有意な相違が認められた。際立っていたのは、スルフヒドリル成分を含有し該ゲル濾過カラムからの溶出が遅く低分子量タンパク質 (例えば、Amb t 5) と共に回収された 30kDa タンパク質 (くさび形で示されている) であった (図3A および 3B)。30kDa タンパク質は、使用したヒト血清のプールにおいて IgE により認識された (図3C)。ゲル濾過画分を個々の血清にさらすことにより、30kDa タンパク質は、試験した全 10 名の患者の血清により認識されるが、その他のアレルゲンは認識されないことを、本発明者らは見出した (データは示していない)。この知見は、30kDa タンパク質が主要アレルゲンであることを示唆した (後記図5A および 5B を参照されたい)。

#### 【0161】

30kDa タンパク質に加えて、これまでに記載されていない幾つかのタンパク質がヒト IgE に結合することが判明した。これらは、(i) Amb t 3 の直下の完全花粉抽出物中の 8~10kDa ジスルフィドタンパク質 (G-50F 画分 #36) (図3C において、該 8~10kDa タンパク質は星印で示されている)、および (ii) 該ゲル濾過で遅れなかった脱脂抽出物中の第 2 の 30kDa タンパク質 (図3C において菱形で示されている G-50F 画分 #16) を含む。最後に、Marshらが報告しているとおり、本発明者らは、Amb t 3 および Amb t 5 とは異なり、主要アレルゲン Amb t 1-2 のレベルが、完全花粉からのタンパク質画分においては低いことを見出した。一方、脱脂花粉からの対応画分中には、有意に高い量の Amb t 1-2 が見出された。

#### 【0162】

##### 30kDa タンパク質の特性

その明らかなアレルゲン性のため、本発明者らは、前記で詳しく説明したとおり、30kDa タンパク質を、均一になるまで完全花粉から精製した。該タンパク質の特徴づけにおいて、本発明者らは、それが多数の公知アレルゲンの特性を有することを見出した (R. D. J. Huby, R. J. Dearman, I. Kimber, Toxicol. Sci. 55, 235 (2000). S. B. Lehrer, W. E. Horner, G. Reese, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36, S165 (1996). D. D. Metcalfeら, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36, S165 (1996). J. D. Astwood, J. N. Leach, R. L. Fuchs, Nat. Biotechnol. 14, 1269 (1996))。すなわち、それは、(i) 糖タンパク質であり (図4A)、(ii) 少なくとも 1 つのジスルフィド結合を有し (図4B)、および (iii) 約 8.0 の pI を有していた (等電点電気泳動による測定、データは示していない)。該タン

10

20

30

40

50

パク質中の糖部分の知見は、もう1つの興味深い特性に導いた。該ゲル濾過分離の後、30kDaタンパク質は糖タンパク質アフィニティーカラム（コンカナバリンA）上で強力に保持された（>90%）。この特性は、該タンパク質の精製を数工程に単純化する。また、更なる実験は、30kDaタンパク質が、レクチニアフィニティーカラムにより、より低いレベルで保持されることを示した（データは示していない）。該アフィニティーデータは、糖部分が主に-D-マンノースおよび-D-グルコースから構成されることを示唆している。

#### 【0163】

##### ヒトアレルゲンとしての30kDaタンパク質の重要性

次の課題は、ブタクサ感受性患者での30kDaタンパク質のアレルゲンとしての重要性を評価することであった。アレルゲンは、少なくとも15名の感受性患者の少なくとも50%により免疫学的に認識されれば主要であるとみなされる（S. B. Lehrerら, (1966)）。本発明者らの場合、ブタクサ花粉症（アレルギー性鼻炎）の病歴、オオブタクサ、短ブタクサおよび西洋ブタクサ花粉抽出物の混合物に対する陽性プリック皮膚試験結果を有し、IgEに関するオオブタクサに対する承認された *in vitro* (Pharmacia ImmunoCAP FEIA) 試験において陽性 ( $kU/I > 0.35$ ) であった7個体からの血清を、最初にスクリーニングした。全7個の血清は、30kDaタンパク質へのIgE結合を示した。本発明者らの研究を遂行するために、本発明者らは、クサおよび恐らくはブタクサに対してアレルギー性であると同定された患者からの35個の更なる血清を盲検的に分析した。そのうち、31名の患者の血清が30kDaタンパク質への結合を示した（図5Aにおいて、「+」で示されている）。これらの患者血清のうちの15個は、ブタクサに対する陽性ImmunoCAP ( $kU/I > 0.35$ ) を有し、また、30kDaタンパク質に対するIgE結合を示した（図5Aにおいて、丸付きの「+」で示されている）。したがって、皮膚試験および/またはImmunoCAPによりブタクサに対して陽性である22個の患者血清（第1群からの7個、クサ群からの15個）が30kDaタンパク質へのIgE結合を示し、それが主要アレルゲンであるとみなされた（図5A）。残りの20個のクサアレルギー性対照血清のうち、図3Aにおいて「+」で示された16個は、そのいくつかは非常に僅かではあったものの、30kDaタンパク質へのIgE結合を示したが、ブタクサに対するImmunoCAPでは陰性であった。この点を更に研究するために、30kDaタンパク質を含有する完全花粉からの第1放出タンパク質画分に対して及び市販の対応物に対して、免疫プロット法を行った。該完全花粉抽出物においては22個の血清が幾つかのタンパク質に対して強く陽性であったが、市販のブタクサ調製物に対しては18個が陽性であるに過ぎなかつた（ImmunoCAP試験で陽性）。完全花粉抽出物に対して陽性である群から選ばれた6名の患者からの血清を示す免疫プロットを、図5Bに示す。興味深いことに、オオブタクサに対するImmunoCAPアッセイで陰性である22個の患者血清のうちの4個（患者番号7、9、18および26）は、該完全花粉抽出物および30kDaアレルゲンに対してはIgE結合を示したが、該市販対応物（図5Bにおいては番号7が示されている）に対しては示さなかつた。ImmunoCAPでかろうじて陽性 ( $0.37kU/I$ ) または陰性であった2個の患者血清（番号4および7）は、該市販抽出物で試験した場合には陰性であったが、完全花粉の第1放出タンパク質および30kDaアレルゲンでは陽性であった（図5B）。

#### 【0164】

簡潔に説明すると、本発明者らは、試験した42個の患者血清のうち、22個がPharmacia ImmunoCAPアッセイまたは皮膚試験により陽性であり、29個が完全ブタクサ花粉抽出物の第1放出タンパク質に対して陽性であり、39個が該精製30kDaタンパク質に対して陽性であることを見出した。

#### 【0165】

要約すると、ブタクサに対して陽性ImmunoCAPまたは陽性皮膚試験結果を有する患者からの血清を使用するIgE免疫プロットは、30kDaタンパク質が主要アレルゲンであることを示している。さらに、本発明者らの研究は、市販の脱脂抽出物の使用が偽陰性を与えることを示唆している。すなわち、本発明者らは、血清が完全花粉抽出物に対しては陽性であるがImmunoCAPアッセイでは陰性である患者を同定した。例えば、ImmunoCapスクリーニングとは反応しない（番号7に関しては図5B、他のデータは示していない）、完全花粉抽出

物に対する少なくとも4個の強力な反応体（患者血清番号7、9、18および26）が存在した。この知見に基づけば、ImmunoCapアッセイはブタクサ感受性患者の約18%（該完全花粉抽出物中のタンパク質に結合した血清IgEを有する22名中4名の患者）を見落としている可能性がある。しかし、この点は、ImmunoCAPでは陰性（脱脂花粉がその調製物中で使用される）であるが完全花粉に対しては陽性である患者における攻撃試験により、臨床的に相互に関連づけられる必要があろう。また、本発明者らは、20個のクサアレルギー性血清のうち、30kDaタンパク質とは反応性であるがその他の試験では検出されない16個（患者番号1、6、7、8、9、12、17、18、22、23、24、25、26、30、31および34からの血清）を同定した。これらの患者のブタクサ感受性に関する臨床的履歴は知られていなかった。

## 【0166】

10

クサアレルギー性患者の血清（ImmunoCAPによりブタクサに陰性）の80%（20個中16個）が30kDaタンパク質への結合を示したという知見は、このタンパク質が他のアレルゲン源中の対応タンパク質と交差反応するという可能性を提示した。この可能性を調べるために、臨床的および地理的履歴によりブタクサ花粉症の診断が裏付けられた35名のクサアレルギー性患者群の患者からの30kDaタンパク質に強力に結合する2個の血清（番号2、20）および弱く結合する2個の血清（番号33、35）を使用して、免疫プロット抑制を行った。図6A（左パネル）は、対照タンパク質オボアルブミン（0）が不活性であり、添加インヒビター無しの対照処理（C）に類似していることを示している。これに対して、クログルミ（W）およびペレニアルライグラス（R）の完全花粉からの抽出物での血清の処理は、部分的または完全に、30kDaタンパク質へのIgE結合を抑制した。更なる17個の患者血清を、30kDaタンパク質とライグラス花粉抽出物との間の交差反応性に関してスクリーニングした。それぞれの場合において、ライグラス抽出物は、部分的または完全に、30kDaタンパク質に対するIgEを吸収した（図6B右パネル）。これらの結果は、ブタクサ花粉由来の30kDaタンパク質が他の花粉（クルミおよびライグラス）中の対応物と交差反応することを示唆している。

## 【0167】

20

10名のブタクサ感受性患者からの血清（図3Cの場合と同じもの）に関するELISAプロトコール（38）を用いるアレルゲン性の比較評価は、該免疫プロットが30kDaタンパク質をアレルゲンとして同定するものであることを証明した（図7）。さらに、該データは、30kDaタンパク質が、ブタクサにおいて最強であると提示されたアレルゲンであるAmb t 1を含む試験したいずれの公知アレルゲン（39、40）より高い割合のこれらの患者からのヒトIgEに結合することを示した（t検定、p=0.02）。該結果は、30kDaタンパク質がブタクサ花粉中の主要アレルゲンであるという更なる証拠を提供するものである。

30

## 【0168】

40

もう1つの疑問は、30kDaタンパク質のアレルゲン性がin vivoで検出されうるか否かということである。この目的のために、本発明者らは、Ermelら（1997）がオオブタクサ花粉に対して感作したアトピー性イヌ群で該精製タンパク質を試験し、過敏性応答を観察した（41）。本発明者らは、試験した動物19匹中16匹で陽性結果を得た（表1）。老いたイヌは、30kDaタンパク質に対して、それらの若い対応体より（10倍）感受性であった。また、老いたイヌは該新規アレルゲンに対して一様に感受性であったが、若いイヌの20%はそうではなかった。これらの結果は、市販の調製物中に存在する低レベルの30kDaタンパク質が、長期にわたり反復して注射されれば、イヌを感作するのに十分であることを示している。また、この知見は、該脱脂市販抽出物が主要アレルゲンを欠くという結論を支持している。

## 【0169】

表1：腫瘍を形成する完全ブタクサ花粉からの30kDaタンパク質の最少量の平均

老いたイヌ, n=5*	1ng
若いイヌ, n=14**	10ng

\* 5匹のイヌが陽性

\*\* 11匹のイヌが陽性

### 【0170】

次の課題は、30kDaタンパク質が既に記載されているか否かを判定することであった。したがって、本発明者らは、マススペクトロメトリーにより部分アミノ酸配列を得た。その結果は、エンベロープ糖タンパク質に対する僅かな類似性を除き、花粉または他の起源に由来する30kDaタンパク質が未だ記載されていないことを示した。 10

### 【0171】

トリプティックペプチダーゼのアミノ酸配列

1. L/I L/I SGISNTVYANPK (配列番号1)
2. PTSFN L/I ATK (配列番号2)
3. L/I YGLVQFNR (配列番号3)
4. FY L/I FSTK (配列番号4)
5. FYATEV L/I D L/I D\* (配列番号5)
6. LLDNLHQQTTPDGFG (配列番号6)
7. MYATEVLDLDGSK (配列番号7)
8. YSDGNFFGAGLDHQ (配列番号8)
9. LLNNMR (配列番号9)
10. VEASAE LR (配列番号10)
11. LLSGLSDTV (配列番号11)

\* エンベロープ糖タンパク質に対する相同性

### 【0172】

本発明者らは、花粉の細胞外脂質層に関連するアレルゲンを抽出するための簡便な方法を開発した。この方法により、数分以内に完全ブタクサ花粉から放出される30kDaタンパク質である主要新規アレルゲンが得られた（それは商業的脱脂方法においては捨てられる）。該タンパク質はグリコシル化されており、30kDaの分子量を有し、水溶性であり、少なくとも1つのジスルフィド結合を有する。配列データは間もなく入手される。30kDaタンパク質、およびブタクサ花粉粒から数分以内に放出されるタンパク質のうちの特徴づけられない他のアレルゲンについての知見は、これらのアレルゲンが花粉に対する最初のアレルギー症状の出現と密接に関連していることを示唆している。本発明者らは、新規アレルゲンをAmb t 7と命名することを提案している（WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommitteeに提出されている）。 30

### 【0173】

手元のデータは、IgE免疫プロット法でブタクサ花粉に感受性である患者の18%までが、皮膚試験およびin vitro特異的IgEアッセイに使用される現在の臨床用調製物中のAmb t 7タンパク質および恐らくは他のアレルゲンの欠如のため、診断されないことを示している。アレルギー専門医は、アレルギー性鼻炎症状における典型的な季節的变化を示すが通常のアレルゲンパネルに対するプリック皮膚試験では陰性である患者に時々遭遇する。完全花粉からの水性抽出物が30kDaタンパク質のようなアレルゲンを含有するという認識は、これらの患者の診断および免疫療法のための改良された製剤を得るのに有用でありうる。Amb t 7の反応性を古典的なブタクサアレルギー症候群と相關づけるために、既知のブタクサアレルギーを有する患者を免疫寛容対応体と比較するためには、皮膚試験研究を利用することができる。 40

### 【図面の簡単な説明】

## 【0174】

【図1】ブタクサの花粉の壁の構造を示す。

【図2a】臨床上の花粉調製物を製造するための従来方法を示す。

【図2b】30kDaタンパク質および他のタンパク質をブタクサ花粉から抽出するための方法の概要を示す。

【図3】完全および脱脂ブタクサ花粉からの水性抽出物の全タンパク質、スルフヒドリルタンパク質およびアレルゲンのプロファイルを示す。図3Aは、全タンパク質に対して染色されたゲルを示す。図3Bは、モノブロモビマン (monobromobimane) でのスルフヒドリルの測定を示す。図3Cは、IgE免疫プロット法による免疫アレルゲンの測定を示す。

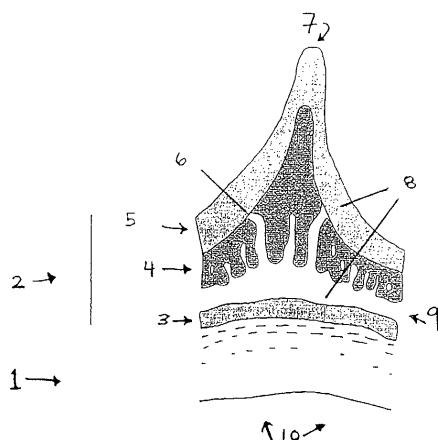
【図4】30kDaタンパク質の特性のいくつかを示す。図4Aは、30kDaタンパク質がグリコシル化されていることを示す。図4Bは、30kDaタンパク質が少なくとも1つのジスルフィド結合を含有することを示す。

【図5】SDS/PAGE (10~20%) / IgE免疫プロット法による、花粉調製物に対するクサ感受性患者由来の血清の応答を示す。図5Aは、純粋な30kDaタンパク質に対する、35名の患者からの血清の応答を示す。図5Bは、市販ブタクサ抽出物（左パネル）、完全花粉抽出物（中央パネル）および精製30kDaタンパク質（右パネル）に対する、選択されたクサ陽性患者からの血清の応答を示す。

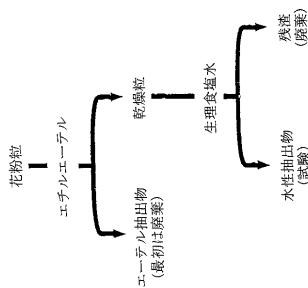
【図6】クルミおよびライグラス花粉抽出物での30kDaタンパク質の免疫プロット抑制、ならびに交差反応性の実例を示す。

【図7】既知ブタクサアレルゲンに結合するヒトIgEの割合(%)と30kDaタンパク質に結合するヒトIgEの割合(%)との比較を示す。

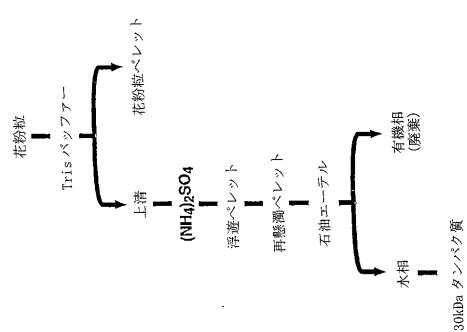
【図1】



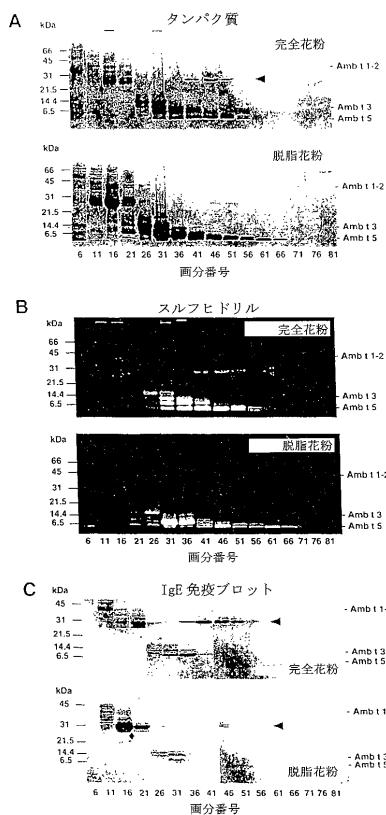
【図2a】



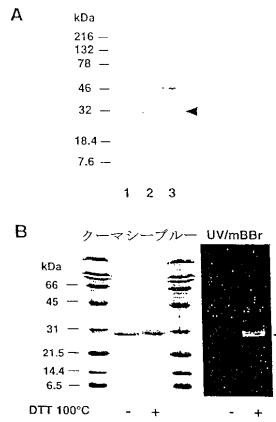
【図2b】



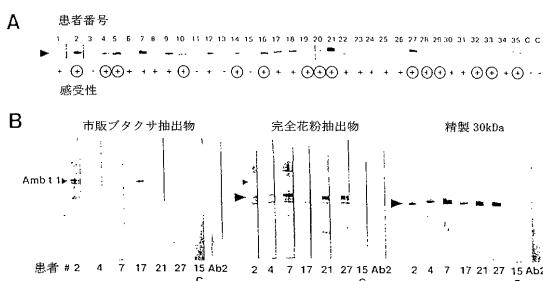
【図3】



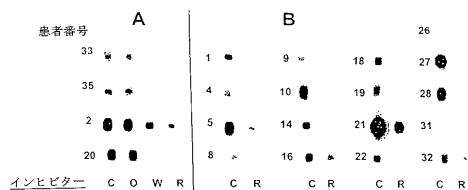
【 図 4 】



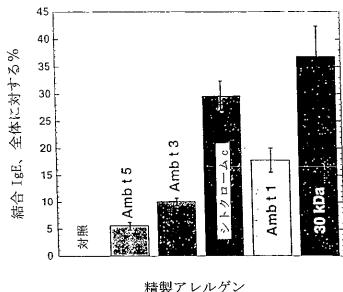
( 义 5 )



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【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  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/063012 A2(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: C12N 15/29, C07K 14/415, 16/16, A61K 39/36

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BUCHANAN, Bob, B, [US/US]; 19 Tamalpais Road, Berkeley, CA 94708 (US). DEL VAL, Gregorio [CH/US]; 5727 Birlanger Street, San Diego, CA 92122 (US). FRICK, Oscar, L, [US/US]; 370 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94117 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/03346

(22) International Filing Date: 4 February 2002 (04.02.2002)

(25) Filing Language:

English

(74) Agents: WARD, Michael, R, et al.; Morrison &amp; Foerster LLP, 425 Market Street, San Francisco, CA 94105-2482 (US).

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data: 60/266,686 5 February 2001 (05.02.2001) US

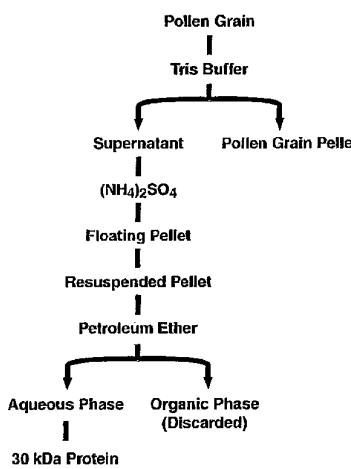
(81) Designated States (national): AE; AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: RAGWEED ALLERGENS



WO 02/063012 A2



(57) Abstract: A 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen has been purified from ragweed pollen. IgE immunoblots with sera of ragweed sensitive patients indicated that the 30 kDa protein is a major allergen. The 30 kDa protein finds use in allergy testing and immunotherapy regimens. In addition to the 30 kDa disulfide protein isolated from complete ragweed pollen, an 8-10 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein and a 30 kDa ragweed defatted pollen extract disulfide protein and fragments, derivatives and homologues thereof are described.

WO 02/063012 A2



**(84) Designated States (regional):** ARIPO patent (GII, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:** — without international search report and to be republished upon receipt of that 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 02/063012

PCT/US02/03346

**RAGWEED ALLERGENS****FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to allergenic proteins from pollen of ragweed and fragments, derivatives and homologues thereof, and to allergenic proteins immunologically related thereto. More particularly, the present invention relates to a major allergenic 30 kDa disulfide protein isolated from complete ragweed pollen, an 8-10 kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein, a 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein and fragments, derivatives and homologues thereof.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

Genetically predisposed individuals, who make up at least 10% of the population, become hypersensitized (allergic) to antigens from a variety of environmental sources to which they are exposed. Those antigens that can induce immediate and/or delayed types of hypersensitivity are known as allergens. Anaphylaxis or atopy, which includes the symptoms of hay fever, asthma, and hives, is one form of immediate allergy. It can be caused by a variety of atopic allergens, such as products of grasses, trees, weeds, animal dander, mites, insects, food, drugs and chemicals. Many individuals are allergic to ragweed pollen. In fact, ragweed is the major cause of pollen related allergies in much of the United States.

However, some of these ragweed sufferers do not test positively for allergic reactions in conventional tests suggesting that there may be as yet unidentified ragweed allergens.

There is thus an urgent need to identify additional ragweed allergens.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

In accordance with the present invention, it has been discovered that a number of ragweed proteins are only marginally extracted by prior art ragweed protein purification protocols. These proteins are, however, readily extracted by reversing the order of the extraction solutions--i.e., by applying the aqueous buffer first and then extracting this fraction with ether to remove interfering lipids. With this procedure, we have detected several novel ragweed pollen proteins. These proteins include a 30kDa complete pollen extract disulfide glyco-protein also referred to as Ambt 7 herein, an 8-10kDa complete pollen extract disulfide protein and a 30kDa defatted pollen extract disulfide protein. Ambt 7 appears to be a major

WO 02/063012

PCT/US02/03346

allergen: it has a high specificity for IgE from ragweed-sensitive patients and elicits a positive skin test in dogs sensitized to ragweed. This invention is directed to the isolation, purification and use of this glycoprotein, referred herein as the "30 kDa ragweed pollen protein allergen" and "Ambt 7." This invention is further directed to isolation, purification and use of an 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein and a 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein

The present invention provides at least one purified 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, at least one 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein and at least one 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein or at least one antigenic fragment thereof, or derivative or homologue. A further aspect of the present invention provides an isolated antigenic fragment of an allergen from ragweed pollen, from a 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen, from an 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or from a 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein.

The present invention is further directed to isolated peptides having the following peptide sequences:

1. L/I L/I SGISNTVYANPK (SEQ ID NO: 1)
2. PTSFN L/I ATK (SEQ ID NO: 2)
3. L/I YGLVQFN (SEQ ID NO: 3)
4. FY L/I FSTK (SEQ ID NO: 4)
5. FYATEV L/I D L/I D (SEQ ID NO: 5)
6. LLDNLHQQTPPDGFG (SEQ ID NO: 6)
7. MYATEVLDLDGSK (SEQ ID NO: 7)
8. YSDGNFFGAGLDHQ (SEQ ID NO: 8)
9. LLNNMNR (SEQ ID NO: 9)
10. VEASAELR (SEQ ID NO: 10)
11. LLSGLSDTV (SEQ ID NO:11)

The present invention is directed to a method of purifying a 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen. The present invention is further directed to a method of purifying an 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein and a method of purifying a 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

In one embodiment, the present invention is directed to the purification scheme depicted in Figure 2B.

The present invention further provides purified nucleic acid sequences coding for the 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen, the 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein and the 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein or at least one antigenic fragment thereof, or derivative or homologue thereof, or the functional equivalent of the nucleic acid sequences. In particular, the present invention further provides purified nucleic acid sequences coding for peptides depicted in SEQ ID NO:1-11. The present invention also provides expression vectors comprising a nucleic acid sequence coding for at least one 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, one 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein and one 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein or at least one antigenic fragment thereof, or derivative or homologue thereof, or the functional equivalent of the nucleic acid sequence. The present invention further provides host cells transformed to express a protein or peptide encoded by the nucleic acid sequences of the invention.

Still another aspect of the invention provides a modified ragweed pollen protein allergen which, when administered to a ragweed pollen-sensitive individual, reduces the allergic response of the individual to ragweed pollen. Preferably the ragweed pollen allergen is a modified 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen, a modified 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or a modified 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein or derivative or homologue thereof. The present invention also provides at least one modified fragment of ragweed pollen protein allergen which, when administered to a ragweed pollen-sensitive individual, reduces the allergic response of the individual to ragweed pollen. Preferably the ragweed pollen protein allergen is a 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, an 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or a 30kDa defatted ragweed pollen extract protein or antigenic fragment thereof, immunologically related to the 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen, the 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or the 30kDa defatted ragweed pollen extract protein or fragment or derivative thereof is also provided by the present invention. The ragweed pollen protein allergen is generally in the form of a pharmaceutical composition.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

In yet another aspect of the present invention, there is provided non-native (i.e., recombinant or chemically synthesized) 30 kDa ragweed pollen protein family members or their derivatives or homologues, or a non-native allergenic protein immunologically cross-reactive to antibodies to one or more 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide proteins, one or more 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide proteins or one or more 30kDa defatted ragweed pollen extract protein family members or their derivatives or homologues. The present invention also provides purified native 30 kDa ragweed complete pollen disulfide protein allergens, purified native 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein allergens or purified native 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein allergens or at least one fragment or derivative or homologue thereof.

Non-native 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, non-native 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or non-native 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein and fragments or portions derived therefrom (peptides) can be used in methods of diagnosing, treating and preventing allergic reactions to ragweed pollen. Purified native 30 kDa ragweed complete pollen extract protein, purified native 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or purified native 30kDa defatted ragweed pollen extract protein fragments thereof, and homologues or derivatives thereof are also useful in methods of diagnosing, treating and preventing allergic reactions to ragweed pollen.

Still yet another aspect of the present invention relates to antibodies to non-native 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, non-native 8-10kDa complete ragweed pollen extract disulfide protein or non-native 30kDa defatted ragweed pollen extract disulfide protein or derivatives or homologues thereof as well as antibodies raised against purified native 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, purified native 8-10kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein or purified native 30kDa defatted ragweed pollen extract protein or derivatives or homologues thereof.

The present invention is thus directed to an isolated protein having an amino acid sequence wherein the amino acid sequence is selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The present invention is further directed to a pharmaceutical composition including an isolated protein having an amino acid sequence wherein the amino acid sequence is selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11. The pharmaceutical composition may be utilized in a method of treating pollen allergy in a mammal by administering a therapeutically effective amount of the protein to a mammal. The pharmaceutical composition may be also be utilized in a method of treating sensitivity to pollen in a mammal sensitive to pollen by administering to the mammal a therapeutically effective amount of the protein to a mammal. The mammal may be a human.

The present invention is further directed to a diagnostic composition for detecting pollen allergy wherein the diagnostic composition includes an isolated protein having an amino acid sequence wherein the amino acid sequence is selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.

In the invention, the pollen may be from any source. In one embodiment, the pollen is selected from walnut, ryegrass and ragweed pollen.

The present invention is further directed to an isolated nucleic acid having a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence wherein the amino acid sequence is selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11. The nucleic acid of the invention may be in an expression vector. The expression vector may be in a host cell.

The present invention is further directed to an isolated pollen allergen substantially free of any other pollen proteins characterized by the following physiochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity. The allergen may be from any source. In a preferred embodiment, the allergen may be from walnut, ryegrass or ragweed pollen.

The present invention is further directed to a pharmaceutical composition having a pollen allergen substantially free of any other pollen proteins characterized by the following

WO 02/063012

PCT/US02/03346

physiochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity. The allergen may be from any source. In a preferred embodiment, the allergen may be selected from walnut, ryegrass and ragweed pollen.

The present invention is further directed to a diagnostic composition for detecting allergic diseases which includes as the active ingredient a diagnostically effective amount of a pollen allergen substantially free of any other pollen proteins characterized by the following physiochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity. The allergen may be from any source. In a preferred embodiment, the allergen may be selected from walnut, ryegrass and ragweed pollen.

The present invention is further directed to a method of treating pollen allergy in a mammal by administering a pharmaceutically effective amount of an pollen allergen substantially free of any other pollen proteins characterized by the following physiochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity to a mammal, preferably a human.

The present invention is further directed to a therapeutic composition having an isolated antigenic fragment of a ryegrass pollen allergen Ambt 7 wherein the antigenic fragment includes one or more amino acid sequences selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11 wherein the antigenic fragment has at least one epitope of the pollen allergen. The therapeutic composition generally includes a pharmaceutically effective carrier.

The epitope may be a T cell epitope or a B cell epitope.

The therapeutic composition may be administered to a mammal such as a human to treat sensitivity to ryegrass pollen.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The present invention is further directed to a therapeutic composition having an Ambt7 pollen allergen which is a polymorphic variant of a ryegrass Ambt7 pollen allergen wherein the polymorphic variant has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11. The therapeutic composition may include a pharmaceutically acceptable carrier.

The therapeutic composition may be administered to a mammal in a method of treating sensitivity to ryegrass pollen

The present invention is further directed to a kit for detecting Ambt7 pollen allergen wherein the kit includes one or more isolated proteins having an amino acid sequence selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11. The kit may further include protein detection components such as antibodies. The kit may also further include directions for use of the kit.

The present invention is further directed to a method of purifying a pollen allergen, by: a) suspending the pollen in a liquid to form a pollen solution; b) centrifuging the pollen solution to produce a pollen protein supernatant; c) precipitating the protein in the pollen protein supernatant to form a protein precipitate; d) resuspending the protein precipitate in a protein precipitate buffer to form a resuspended protein mixture; e) extracting the resuspended protein mixture in organic solvent to form an aqueous phase and an organic phase; and f) purifying the pollen allergen from the aqueous phase.

In one embodiment of the method of purifying a pollen allergen, the protein in the pollen solution is precipitated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

In another embodiment of the method of purifying a pollen allergen the organic solvent is petroleum ether.

In another embodiment of the method of purifying a pollen allergen, the pollen allergen is purified from the aqueous phase by chromatography or electrophoresis procedures. In the method, the chromatography procedure may be gel filtration or affinity chromatography.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The present invention is further directed to an isolated antibody that binds specifically to a protein comprising an amino acid sequence wherein the amino acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.

The present invention is further directed to an isolated antibody that binds specifically to a pollen allergen substantially free of any other pollen proteins wherein the pollen allergen is characterized by the following physicochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulphydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity.

The antibodies of the invention may be a polyclonal or monoclonal antibodies

Further features of the present invention will be better understood from the following detailed description of the preferred embodiments of the invention in conjunction with the appended figures.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

The invention will be better understood by reference to the Figures in which:

Figure 1 shows the structure of the wall of ragweed pollen including: (1) the intine; (2) the exine; (3) the nexine; (4) the sexine; (5) the lipid layer; (6) the micropore; (7) the spine, (8) the protein; (9) cavity and (10) the protoplast.

Figure 2a shows the prior art procedure for producing clinical pollen preparations.

Figure 2b outlines a procedure for extracting the 30 kDa protein and other proteins from ragweed pollen.

Figure 3 shows total protein, sulphydryl protein and allergen profiles of aqueous extracts from complete and defatted ragweed pollen. Extracts were fractionated by Sephadex G50F chromatography and separated by SDS-PAGE (10-20%). Figure 3A. shows gels stained for total protein. Gels were stained with Coomassie blue; each lane contained 3 to 30 µg protein. Figure 3B shows sulphydryl determination with monobromobimane. Sulphydryl

WO 02/063012

PCT/US02/03346

groups of proteins were labeled with monobromobimane and analyzed by UV light. Figure 3C shows allergen determination by IgE immunoblotting. Proteins were transferred to nitrocellulose and probed with IgE of sera combined from 10 ragweed patients. The symbols depicted in Figure 3c are: (◐) 30 kDa protein, (\*) 8-10 kDa protein (complete pollen) and (◆) second 30 kDa protein (defatted pollen).

Figure 4 shows some properties of 30 kDa protein. SDS-PAGE (10-20%). Figure 4A demonstrates that 30 kDa protein is glycosylated. The gel in Figure 4A was stained for glycoprotein. Lane 1 contains soybean trypsin inhibitor (negative control, 5 µg); lane 2 contains 30 kDa protein (10 µg); and lane 3 contains horseradish peroxidase (positive control, 5 µg). Figure 4B demonstrates that the 30 kDa protein contains at least one disulfide bond. The gel was examined under UV light following reaction with monobromobimane (mBBr). Ten µg protein was used.

Figure 5 shows the response of sera from grass-sensitive patients to pollen preparations by SDS/PAGE (10-20%)/IgE immunoblotting. Figure 5A shows the response of sera from 35 patients to pure 30 kDa protein. Patients showing binding to the 30kDa protein are designated with a “+”. Those patients also showing a positive ImmunoCAP test are identified with an circle surrounding the “+”. Each lane on the gel contained 1.6 µg protein. Figure 5B shows the response of sera from selected grass positive patients to commercial ragweed extract (left panel), complete pollen extract (middle panel) and purified 30 kDa protein (right panel). The commercial and complete extracts and the 30 kDa protein contained 25, 25 and 1.6 µg protein, respectively. In the control (C) treatment, sera and secondary antibody were omitted; the secondary antibody was omitted in lanes designated “Ab2.”

Figure 6 shows the immunoblot inhibition of the 30 kDa protein with walnut and ryegrass pollen extracts and the demonstration of cross-reactivity. Figure 6A is the control with no inhibitor protein added (C), ovalbumin as inhibitor protein (O, negative control), walnut (*Juglans nigra*) complete pollen extract (W) and ryegrass (*Lolium perenne*) complete pollen extract (R) added to sera prior to immunoblotting. In Figure 6B the results with sera from an additional 17 patients positive to the 30 kDa protein are shown. In the control lanes (C) no allergen is added. In the lanes identified with an (R) ryegrass complete pollen extract is added as an inhibitor protein.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

Figure 7 shows the percentage of human IgE binding to known ragweed allergens vs. 30 kDa protein. An ELISA determination was carried out with sera from 10 ragweed-sensitive patients. 1 µg per ml protein was tested for each allergen. The values represent percent of total IgE bound by each allergen tested.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Giant ragweed allergen extract was purchased from Bayer, Inc. (Spokane, WA). Complete and defatted giant ragweed (*Ambrosia trifida*) pollen grains were purchased from Greer Laboratories (Lenoir, N.C.). These sources of pollen are not intended to limit the scope of the invention since they only represent one convenient supply of the pollen. The present invention can be practiced using ragweed pollen from any location or source.

In the following discussion, the 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen is described and is identified as "the 30 kDa ragweed protein allergen" and as "Ambt 7." This discussion is not limited to the 30 kDa ragweed protein allergen but applies equally to other ragweed protein allergens including the 8-10kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein, the 30kDa ragweed defatted pollen extract disulfide protein and derivatives or homologues thereof.

#### Purification of Pollen Proteins

The present invention is directed to a method of purifying pollen proteins. The method finds particular use with ragweed pollen but is not limited to ragweed pollen. The method is outlined in Figure 2b. Pollen is suspended in buffer such as 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. One or more protease inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride and EDTA may be added to the buffer to reduce protein degradation. The suspended pollen is stirred gently at room temperature for a time sufficient to release pollen proteins, typically 30 minutes. The suspension is then centrifuged to precipitate the insoluble pollen material. The supernatant is then filtered. The proteins in the supernatant are precipitated with ammonium sulfate, for example at a 95% saturation. The floating pellet is then recovered by centrifugation and resuspended in buffer containing salt. In one embodiment, the buffer is 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and the salt is 200mM NaCl. Lipids are then removed by extracting the resuspended protein pellet in an organic solvent such as petroleum ether. The mixture is then centrifuged, for example for 10 min at 48,000g at 4°C, and the organic phase is discarded. The resulting clarified aqueous solution is filtered, for example, through a 0.2 uM filter. After filtration,

WO 02/063012

PCT/US02/03346

the filtrate is separated on a gel filtration column to separate the various pollen proteins. After separation, the pollen proteins such as Ambt 7 can be further purified by procedures well known in the art such as SDS-PAGE, chromatography, etc.

The invention encompasses isolated or substantially purified nucleic acid or protein compositions. In the context of the present invention, an "isolated" or "purified" DNA molecule or an "isolated" or "purified" polypeptide is a DNA molecule or polypeptide that, by the hand of man, exists apart from its native environment and is therefore not a product of nature. An isolated DNA molecule or polypeptide may exist in a purified form or may exist in a non-native environment such as, for example, a transgenic host cell. For example, an "isolated" or "purified" nucleic acid molecule or protein, or biologically active portion thereof, is substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences (preferably protein encoding sequences) that naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated nucleic acid molecule can contain less than about 5kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, or 0.1 kb of nucleotide sequences that naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. A protein that is substantially free of cellular material includes preparations of protein or polypeptide having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, (by dry weight) of contaminating protein. When the protein of the invention, or biologically active portion thereof, is recombinantly produced, preferably culture medium represents less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of chemical precursors or non-protein of interest chemicals.

**Gene(s) Encoding Ragweed Protein Allergens**

"Gene," is used, in respect of the present invention, in its broadest sense and refers to any contiguous sequence of nucleotides, the transcription of which leads to a mRNA molecule, which mRNA molecule is capable of being translated into a protein. The gene encoding a 30 kDa ragweed protein allergen family member means the nucleotide sequence encoding the protein or derivatives or homologues of the protein which may contain single or multiple amino acid substitutions, deletions or additions. A 30 kDa ragweed protein allergen

WO 02/063012

PCT/US02/03346

gene also refers to cDNAs complementary to the mRNAs corresponding to the full or partial length of a 30 kDa protein.

It is expected that there are sequence polymorphisms in the nucleic acid sequence coding for each 30 kDa ragweed protein allergen family member, and it will be appreciated by one skilled in the art that one or more nucleotides in the nucleic acid sequence coding for a 30 kDa ragweed protein allergen family member may vary among individual ragweed plants due to natural allelic variation. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms are within the scope of the invention. It may also be appreciated by one skilled in the art that the 30 kDa ragweed protein allergen is a family of highly related genes whose proteins are present in ragweed pollen. Nucleotide sequences and corresponding deduced amino acid sequences of any and all such related family members including 30 kDa are within the scope of the invention.

Accordingly, it is within the scope of the present invention to encompass all proteins belonging to the 30 kDa ragweed protein allergen family, at least one fragment (peptide) of a 30 kDa ragweed protein allergen family member, and amino acid derivatives thereof, and to encompass nucleotide sequences, including DNA, cDNA and mRNA and homologue or degenerate forms thereof, encoding 30 kDa ragweed protein allergen family members or fragments thereof, or derivatives thereof. It is also within the scope of the invention to encompass purified native 30 kDa ragweed protein allergen, at least one fragment (peptide) thereof, and derivatives or homologues thereof. It is further in accordance with the present invention to include molecules such as polypeptides fused to a 30 kDa protein, or at least one fragment thereof, or derivatives thereof or to nucleotide sequences contiguous to such fragment and/or derivative-encoding nucleotide sequences.

For example, for some aspects of the present invention, it is desirable to produce a fusion protein comprising a 30 kDa ragweed protein allergen family member or at least one fragment thereof or their derivatives and an amino acid sequence from another peptide or protein, examples of the latter being enzymes such as beta-galactosidase, phosphatase, urease and fusion proteins incorporating purification moieties such as His-tags and the like. Most fusion proteins are formed by the expression of a recombinant gene in which two coding sequences have been joined together such that their reading frames are in phase. Alternatively, proteins or peptides can be linked in vitro by chemical means. All such fusion protein or hybrid genetic derivatives of a 30 kDa ragweed protein allergen or its encoding

WO 02/063012

PCT/US02/03346

nucleotide sequences are encompassed by the present invention. Furthermore, by homologues and derivatives of a 30 kDa ragweed protein allergen is meant to include synthetic derivatives thereof. The nucleotide sequences encoding the 30 kDa ragweed protein allergen can be used to chemically synthesize the entire protein or generate any number of fragments (peptides) by chemical synthesis by well known methods (e.g., solid phase synthesis). All such chemically synthesized peptides are encompassed by the present invention. Accordingly, the present invention extends to isolated 30 kDa ragweed protein allergen family members, fragments thereof and their derivatives, homologues and immunological relatives made by recombinant means or by chemical synthesis.

The terms "isolated" and "purified" are used interchangeably herein and refer to peptides, protein, protein fragments, and nucleic acid sequences substantially free of cellular material or culture medium when produced by recombinant DNA techniques, or chemical precursors or other chemicals when synthesized chemically. The term "native purified" as used herein refers to proteins or fragments thereof purified from *Ambrosia trifida* pollen or other plant part. Furthermore, the present invention extends to proteins or fragments (peptides) corresponding in whole or part.

Fragments of nucleic acid within the scope of the invention include those coding for parts of the 30 kDa ragweed protein allergen that elicit an immune response in mammals, preferably humans, such as the stimulation of minimal amounts of IgE; binding of IgE; eliciting the production of IgG and IgM antibodies; or the eliciting of a T cell response such as proliferation and/or lymphokine secretion and/or the induction of T cell anergy. The foregoing fragments of the 30 kDa ragweed protein allergen are referred to herein as antigenic fragments. Fragments within the scope of the invention also include those capable of hybridizing with nucleic acid from other plant species for use in screening protocols to detect allergens that are cross-reactive with the 30 kDa ragweed protein allergen. As used herein, a fragment of the nucleic acid sequence coding for the 30 kDa ragweed protein allergen refers to a nucleotide sequence having fewer bases than the nucleotide sequence coding for the entire amino acid sequence of the 30 kDa ragweed protein allergen and/or a mature 30 kDa ragweed protein allergen family member. Generally, the nucleic acid sequence coding for the fragment or fragments of a the 30 kDa ragweed protein allergen family member will be selected from the bases coding for the mature 30 kDa ragweed protein allergen family member, however, in some instances it may be desirable to select all or a part

WO 02/063012

PCT/US02/03346

of a fragment or fragments from the leader sequence portion of a nucleic acid sequence of the invention. A nucleic acid sequence of the invention may also contain linker sequences, restriction endonuclease sites and other sequences useful for cloning, expression or purification of the 30 kDa ragweed protein allergen or fragments thereof.

**Antigenic Fragments of Ragweed Protein Allergens**

Antigenic fragments of an allergen from ragweed pollen, preferably the 30 kDa ragweed protein allergen, may be obtained, for example, by screening peptides produced by recombinant methods from the corresponding fragment of the nucleic acid sequence of the invention coding for such peptides, synthesized chemically using techniques known in the art, or by degrading of the purified allergen. The peptide fragments of the protein allergen may be obtained by any method known in the art such as chemical cleavage of the allergen, arbitrary division of the allergen into fragments of a desired length with no overlap of the peptides, or preferably division of the allergen into overlapping fragments of a desired length. The fragments are tested to determine their antigenicity and allergenicity.

Fragments of recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or of purified native 30 kDa ragweed protein allergen which are capable of eliciting a T cell response such as stimulation (i.e., proliferation or lymphokine secretion) and/or are capable of inducing T cell anergy are particularly desirable. Fragments of recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or purified native 30 kDa ragweed protein allergen which do not bind immunoglobulin E (IgE) and/or which have minimal IgE stimulating activity are also desirable. If the fragment or fragments of a recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen family member or purified native 30 kDa ragweed protein allergen bind IgE, it is preferable that such binding does not lead to histamine release, e.g., such binding does not cause cross-linking of IgE on mast cells or basophils. Minimal IgE stimulating activity refers to IgE stimulating activity that is less than the amount of IgE production stimulated by whole recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or whole purified native 30 kDa ragweed protein allergen.

Preferred fragments also include antigenic fragments which, when administered to a ragweed pollen-sensitive individual or an individual allergic to an allergen cross-reactive with ragweed pollen allergen, are capable of modifying the allergic response to ragweed pollen allergen of the individual, and antigenic fragments which, when administered to a

WO 02/063012

PCT/US02/03346

ragweed pollen-sensitive individual, are capable of modifying B-cell response, T-cell response or both B-cell and T-cell response of the individual to a ragweed pollen allergen. As used herein modification of the allergic response of an individual sensitive to ragweed pollen allergen can be defined as non-responsiveness or diminution in symptoms to the allergen, as determined by standard clinical procedures (see e.g. Varney et al, British Medical Journal, (1990), 302:265-269), including diminution in grass pollen induced asthmatic symptoms (Suphioglu et al. (1992) Lancet 339: 569-572).

Antigenic fragments of the present invention which have T cell stimulating activity, and thus comprise at least one T cell epitope are particularly desirable. T cell epitopes are believed to be involved in initiation and perpetuation of the immune response to a protein allergen which is responsible for the clinical symptoms of allergy. These T cell epitopes are thought to trigger early events at the level of the T helper cell by binding to an appropriate HLA molecule on the surface of an antigen presenting cell and stimulating the relevant T cell subpopulation. These events lead to T cell proliferation, lymphokine secretion, local inflammatory reactions, recruitment of additional immune cells to the site, and activation of the B cell cascade leading to production of antibodies. One isotype of these antibodies, IgE, is fundamentally important to the development of allergic symptoms and its production is influenced early in the cascade of events, at the level of the T helper cell, by the nature of the lymphokines secreted. A T cell epitope is the basic element or smallest unit of recognition by a T cell receptor, where the epitope comprises amino acids essential to receptor recognition. Amino acid sequences which mimic those of the T cell epitopes and which modify the allergic response to protein allergens are within the scope of this invention.

Exposure of patients to purified protein allergens of the present invention or to the antigenic fragments of the present invention which comprise at least one T cell epitope and are derived from protein allergens may tolerize or anergize appropriate T cell subpopulations such that they become unresponsive to the protein allergen and do not participate in stimulating an immune response upon such exposure. In addition, administration of the protein allergen of the invention or an antigenic fragment of the present invention which comprises at least one T cell epitope may modify the lymphokine secretion profile as compared with exposure to the naturally-occurring protein allergen or portion thereof (e.g. result in a decrease of IL-4 and/or an increase in IL-2). Furthermore, exposure to such antigenic fragment or protein allergen may influence T cell subpopulations which normally

WO 02/063012

PCT/US02/03346

participate in the response to the allergen such that these T cells are drawn away from the site(s) of normal exposure to the allergen (e.g., nasal mucosa, skin, and lung) towards the site(s) of therapeutic administration of the fragment or protein allergen. This redistribution of T cell subpopulations may ameliorate or reduce the ability of an individual's immune system to stimulate the usual immune response at the site of normal exposure to the allergen, resulting in a diminution in allergic symptoms.

Screening for IgE binding to the protein or fragments thereof may be performed by scratch tests or intradermal skin tests on laboratory animals or human volunteers, or in in vitro systems such as RAST (radioallergosorbent test), RAST inhibition, ELISA assay or radioimmunoassay (RIA).

#### Expression Vectors and Host Cells

The present invention provides expression vectors and host cells transformed to express the nucleic acid sequences encoding the ragweed protein allergen of the invention. Expression vectors of the invention comprise a nucleic acid sequence coding for at least one 30 kDa ragweed pollen allergen, or at least one antigenic fragment thereof, or derivative or homologue thereof, or the functional equivalent of such nucleic acid sequence. Nucleic acid sequences coding for 30 kDa ragweed protein allergen family members including 30 kDa ragweed protein allergen, or at least one fragment thereof may be expressed in prokaryotic or eukaryotic host cells. Suitable host cells include bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast, or mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO). Suitable expression vectors, promoters, enhancers, and other expression control elements may be found in Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Suitable vectors for expression in yeast include YepSecl (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6: 229-234); pMF (Kurjan and Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933-943); and JRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113-123).

For expression in *E. coli*, suitable expression vectors include pTRC (Amann et al. (1988) *Gene* 69: 301-315); pET-11d (Novagen, Madison, Wis.); pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia); pMAL (N.E. Biolabs, Beverly, Mass.); pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.); and PSEM (Knapp et al. (1990) *BioTechniques* 8: 280-281). The use of pTRC and pET-11d will lead to the expression of unfused protein. The use of pGEX, pMAL,

WO 02/063012

PCT/US02/03346

pRIT5 and pSEM will lead to the expression of allergen fused to glutathione S-transferase (pGEX), maltose E binding protein (pMAL), protein A (pRIT5), or truncated  $\beta$ -galactosidase (PSEM). When a 30 kDa ragweed protein allergen family member, fragment, or fragments thereof is expressed as a fusion protein, it is particularly advantageous to introduce an enzymatic cleavage site at the fusion junction between the carrier protein and the 30 kDa protein family member or fragment thereof. A 30 kDa ragweed protein allergen family member or fragment thereof may then be recovered from the fusion protein through enzymatic cleavage at the enzymatic site and biochemical purification using conventional techniques for purification of proteins and peptides. Suitable enzymatic cleavage sites include those for blood clotting Factor Xa or thrombin for which the appropriate enzymes and protocols for cleavage are commercially available from for example Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. and N.E. Biolabs, Beverly, Mass.

Host cells can be transformed to express the nucleic acid sequences encoding the 30 kDa ragweed protein allergen of the invention using conventional techniques such as calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, or electroporation. Suitable methods for transforming the host cells may be found in Sambrook et al. *supra*, and other laboratory textbooks. The nucleic acid sequences of the invention may also be synthesized using standard techniques.

#### **Production of Recombinant 30 kDa Ragweed Protein**

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method of producing recombinant 30 kDa ragweed protein allergen, or at least one fragment thereof, or their derivatives or homologues, or their immunological relatives (as hereinbefore defined) comprising culturing an organism containing a replicable recombinant DNA molecule, the molecule comprising a promoter capable of expression in the organism, a gene encoding a 30 kDa ragweed protein allergen family member, at least one fragment thereof, or homologue or derivative thereof, or immunological relatives thereof, located downstream of and transcribed from the promoter, a selectable marker and a DNA vehicle containing a prokaryotic or eukaryotic origin of replication, under conditions and for a time sufficient for the recombinant DNA molecule to be stably maintained and direct the synthesis of the 30 kDa ragweed protein allergen, at least one fragment thereof, or derivatives, homologues or immunological relatives thereof and then optionally isolating same.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

30 kDa ragweed protein allergen and fragments (peptides) thereof can be purified from cell culture medium, host cells, or both using techniques known in the art for purifying peptides and proteins, including ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration chromatography, ultrafiltration, electrophoresis and immunopurification with antibodies specific for 30 kDa ragweed protein allergen or fragments thereof. The terms isolated and purified are used interchangeably herein and refer to peptides, protein, protein fragments, and nucleic acid sequences substantially free of cellular material or culture medium when produced by recombinant DNA techniques, or chemical precursors or other chemicals when synthesized chemically.

Another aspect of the invention provides protein preparations comprising isolated 30 kDa ragweed protein allergen or at least one fragment of 30 kDa ragweed protein allergen. In preferred embodiments of this aspect of the invention, the 30 kDa ragweed protein allergen or at least one fragment of the 30 kDa ragweed protein allergen is produced in a host cell transformed with a nucleic acid sequence coding for the protein or fragment.

**Modifying an Individual's Allergic Response**

It is possible to design peptides derived from the 30 kDa ragweed protein allergen which, when administered to a ragweed pollen sensitive individual in sufficient quantities, will modify the individual's allergic response to ragweed pollen. This can be done, for example, by examining the structure of 30 kDa ragweed protein allergen, producing peptides (via an expression system, synthetically or otherwise) to be examined for their ability to influence B-cell and/or T-cell responses in ragweed pollen sensitive individuals and selecting appropriate epitopes recognized by the cells. In referring to an epitope, the epitope will be the basic element or smallest unit of recognition by a receptor, particularly immunoglobulins, histocompatibility antigens and T cell receptors where the amino acids essential to the receptor recognition may be contiguous and/or non-contiguous in the amino acid sequence. Amino acid sequences which mimic those of the epitopes and which are capable of down regulating allergic response to ragweed pollen allergen can also be used.

It is now also possible to design an agent or a drug capable of blocking or inhibiting the ability of ragweed pollen allergen to induce an allergic reaction in ragweed pollen sensitive individuals. Such agents could be designed, for example, in such a manner that they would bind to relevant anti-30 kDa ragweed protein allergen-IgE's, thus preventing IgE-

WO 02/063012

PCT/US02/03346

allergen binding and subsequent mast cell or basophil degranulation. Alternatively, such agents could bind to cellular components of the immune system, resulting in suppression or desensitization of the allergic response to *Ambrosia trifida* pollen allergens. A non-restrictive example of this is the use of appropriate B- and T-cell epitope peptides, or modifications thereof, based on the cDNA/protein structures of the present invention to suppress the allergic response to ragweed pollen. This can be carried out by defining the structures of B- and T-cell epitope peptides which affect B- and T-cell function in *in vitro* studies with blood components from ragweed pollen sensitive individuals.

#### **Diagnosing Pollinosis**

Protein, peptides or antibodies of the present invention can also be used for detecting and diagnosing ragweed pollinosis. For example, this could be done by combining blood or blood products obtained from an individual to be assessed for sensitivity to ragweed pollen with an isolated antigenic peptide or peptides of recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or native purified 30 kDa ragweed protein allergen, under conditions appropriate for binding of components (e.g., antibodies, T-cells, B-cells) in the blood with the peptide(s) or protein and determining the extent to which such binding occurs. The extent to which binding occurs can be determined, for example, by assessing T cell function, T cell proliferation, B cell function, or binding of the protein, or fragment thereof, or derivative or homologue thereof to antibodies present in the blood or a combination thereof.

Additionally, sensitivity of a mammal to ragweed pollen may be determined by administering to a mammal a sufficient quantity of the 30 kDa ragweed pollen allergen, or at least one antigenic fragment thereof, or derivative or homologue thereof to provoke an allergic response in the mammal and determining the occurrence of an allergic response in the mammal to the ragweed pollen allergen. The ragweed pollen allergen(s), fragment(s) or derivative or homologue thereof used in this aspect of the present invention can be produced recombinantly or synthetically. Purified native 30 kDa ragweed protein allergen or fragments thereof may be substituted for a recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or fragments thereof and used in the above method to determine sensitivity of the mammal to ragweed.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The invention further includes isolated allergenic proteins or fragments thereof that are immunologically related to 30 kDa ragweed protein allergen, including fragments, or derivatives or homologues thereof, such as by antibody cross-reactivity wherein the isolated allergenic proteins or fragments thereof are capable of binding to antibodies specific for the protein and peptides of the invention, or by T cell cross-reactivity wherein the isolated allergenic proteins or fragments thereof are capable of stimulating T cells specific for the protein and peptides of this invention.

Work by others has shown that high doses of allergens generally produce the best results (i.e., best symptom relief). However, many people are unable to tolerate large doses of allergens because of allergic reactions to the allergens. Modification of naturally-occurring allergens can be designed in such a manner that modified peptides or modified allergens which have the same or enhanced therapeutic properties as the corresponding naturally-occurring allergen but have reduced side effects (especially anaphylactic reactions) can be produced. These can be, for example, a protein or peptide of the present invention (e.g., one having all or a portion of the amino acid sequence of 30 kDa ragweed protein allergen, including purified native 30 kDa ragweed protein allergen), or a modified protein or peptide, or the protein or peptide analogue. It is possible to modify the structure of a protein or peptide of the invention for such purposes as increasing solubility, enhancing therapeutic or preventive efficacy or stability (e.g., shelf life ex vivo and resistance to proteolytic degradation in vivo. A modified protein or peptide can be produced in which the amino acid sequence has been altered, such as by amino acid substitution, deletion or addition, to modify immunogenicity and/or reduce allergenicity or to which a component has been added for the same purpose. A modified protein can further be produced by the use of thiol redox proteins to reduce protein intramolecular disulfide bonds as described in U.S. Patent No.6,114,504.

#### Treating Allergic Responses

Thus, the present invention provides modified ragweed pollen protein allergens which, when administered to a ragweed pollen-sensitive individual, reduce the allergic response of the individual to ragweed pollen. Preferred modified ragweed pollen protein allergens include modified 30 kDa ragweed pollen allergen or derivative or homologue thereof. The present invention also provides at least one modified fragment of ragweed pollen protein allergen which, when administered to a ragweed pollen-sensitive individual, reduces the allergic response of the individual to ragweed pollen. Preferably such modified

WO 02/063012

PCT/US02/03346

fragments are at least one modified fragment of the 30 kDa ragweed pollen allergen or derivative or homologue thereof.

Another example of a modification of protein or peptides is substitution of cysteine residues preferably with alanine, serine, threonine, leucine or glutamic acid to minimize dimerization via disulfide linkages. Another example of modification of the peptides of the invention is by chemical modification of amino acid side chains or cyclization of the peptide.

In order to enhance stability and/or reactivity, the protein or peptides of the invention can also be modified to incorporate one or more polymorphisms in the amino acid sequence of the protein allergen resulting from natural allelic variation. Additionally, D-amino acids, non-natural amino acids or non-amino acid analogues can be substituted or added to produce a modified protein or peptide within the scope of this invention.

The purification of native 30 kDa ragweed pollen allergen is described in the examples herein.

#### **Cloning of cDNAs**

The DNA used in any embodiment of this invention can be cDNA obtained as described herein, or alternatively, can be any oligodeoxynucleotide sequence having all or a portion of a sequence represented herein, or their functional equivalents. Such oligodeoxynucleotide sequences can be produced chemically or mechanically, using known techniques.

The following terms are used to describe the sequence relationships between two or more nucleic acids or polynucleotides: (a) "reference sequence", (b)"comparison window", (c) "sequence identity", (d) "percentage of sequence identity", and (e) "substantial identity".

(a) As used herein, "reference sequence" is a defined sequence used as a basis for sequence comparison. A reference sequence may be a subset or the entirety of a specified sequence; for example, as a segment of a full length cDNA or gene sequence, or the complete cDNA or gene sequence.

(b) As used herein, "comparison window" makes reference to a contiguous and specified segment of a polynucleotide sequence, wherein the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) compared to the

WO 02/063012

PCT/US02/03346

reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Generally, the comparison window is at least 20 contiguous nucleotides in length, and optionally can be 30, 40, 50, 100, or longer. Those of skill in the art understand that to avoid a high similarity to a reference sequence due to inclusion of gaps in the polynucleotide sequence a gap penalty is typically introduced and is subtracted from the number of matches.

Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Thus, the determination of percent identity between any two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. Preferred, non-limiting examples of such mathematical algorithms are the algorithm of Myers and Miller, 1988; the local homology algorithm of Smith et al. 1981; the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch 1970; the search-for-similarity-method of Pearson and Lipman 1988; the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, modified as in Karlin and Altschul, 1993.

Computer implementations of these mathematical algorithms can be utilized for comparison of sequences to determine sequence identity. Such implementations include, but are not limited to: CLUSTAL in the PC/Gene program (available from Intelligenetics, Mountain View, California); the ALIGN program (Version 2.0) and GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (available from Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA). Alignments using these programs can be performed using the default parameters. The CLUSTAL program is well described by Higgins et al. 1988; Higgins et al. 1989; Corpet et al. 1988; Huang et al. 1992; and Pearson et al. 1994. The ALIGN program is based on the algorithm of Myers and Miller, *supra*. The BLAST programs of Altschul et al., 1990, are based on the algorithm of Karlin and Altschul *supra*.

Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information at the web site [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul et al., 1990). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are then extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative

WO 02/063012

PCT/US02/03346

alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always  $> 0$ ) and N (penalty score for mismatching residues; always  $< 0$ ). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value, the cumulative score goes to zero or below due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments, or the end of either sequence is reached.

In addition to calculating percent sequence identity, the BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin & Altschul (1993). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability ( $P(N)$ ), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a test nucleic acid sequence is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid sequence to the reference nucleic acid sequence is less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST (in BLAST 2.0) can be utilized as described in Altschul et al. 1997. Alternatively, PSI-BLAST (in BLAST 2.0) can be used to perform an iterated search that detects distant relationships between molecules. See Altschul et al., *supra*. When utilizing BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, the default parameters of the respective programs (e.g. BLASTN for nucleotide sequences, BLASTX for proteins) can be used. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, a cutoff of 100, M=5, N=-4, and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff & Henikoff, 1989). See the web site located at [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov/). Alignment may also be performed manually by inspection.

For purposes of the present invention, comparison of nucleotide sequences for determination of percent sequence identity to the promoter sequences disclosed herein is preferably made using the BlastN program (version 1.4.7 or later) with its default parameters or any equivalent program. By "equivalent program" is intended any sequence comparison program that, for any two sequences in question, generates an alignment having identical

WO 02/063012

PCT/US02/03346

nucleotide or amino acid residue matches and an identical percent sequence identity when compared to the corresponding alignment generated by the preferred program.

(c) As used herein, "sequence identity" or "identity" in the context of two nucleic acid or polypeptide sequences makes reference to the residues in the two sequences that are the same when aligned for maximum correspondence over a specified comparison window. When percentage of sequence identity is used in reference to proteins it is recognized that residue positions which are not identical often differ by conservative amino acid substitutions, where amino acid residues are substituted for other amino acid residues with similar chemical properties (e.g., charge or hydrophobicity) and therefore do not change the functional properties of the molecule. When sequences differ in conservative substitutions, the percent sequence identity may be adjusted upwards to correct for the conservative nature of the substitution. Sequences that differ by such conservative substitutions are said to have "sequence similarity" or "similarity." Means for making this adjustment are well known to those of skill in the art. Typically this involves scoring a conservative substitution as a partial rather than a full mismatch, thereby increasing the percentage sequence identity. Thus, for example, where an identical amino acid is given a score of 1 and a non-conservative substitution is given a score of zero, a conservative substitution is given a score between zero and 1. The scoring of conservative substitutions is calculated, e.g., as implemented in the program PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) As used herein, "percentage of sequence identity" means the value determined by comparing two optimally aligned sequences over a comparison window, wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid base or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the window of comparison, and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity.

(e)(i) The term "substantial identity" of polynucleotide sequences means that a polynucleotide comprises a sequence that has at least 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, or 79%, preferably at least 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, or 89%, more preferably at least 90%, 91%, 92%, 93%, or 94%, and most preferably at least

WO 02/063012

PCT/US02/03346

95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity, compared to a reference sequence using one of the alignment programs described using standard parameters. One of skill in the art will recognize that these values can be appropriately adjusted to determine corresponding identity of proteins encoded by two nucleotide sequences by taking into account codon degeneracy, amino acid similarity, reading frame positioning, and the like. Substantial identity of amino acid sequences for these purposes normally means sequence identity of at least 70%, more preferably at least 80%, 90%, and most preferably at least 95%.

Another indication that nucleotide sequences are substantially identical is if two molecules hybridize to each other under stringent conditions (see below). Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. However, stringent conditions encompass temperatures in the range of about 1°C to about 20°C, depending upon the desired degree of stringency as otherwise qualified herein. Nucleic acids that do not hybridize to each other under stringent conditions are still substantially identical if the polypeptides they encode are substantially identical. This may occur, e.g., when a copy of a nucleic acid is created using the maximum codon degeneracy permitted by the genetic code. One indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is when the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the polypeptide encoded by the second nucleic acid.

(e)(ii) The term "substantial identity" in the context of a peptide indicates that a peptide comprises a sequence with at least 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, or 79%, preferably 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, or 89%, more preferably at least 90%, 91%, 92%, 93%, or 94%, or even more preferably, 95%, 96%, 97%, 98% or 99%, sequence identity to the reference sequence over a specified comparison window. Preferably, optimal alignment is conducted using the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970). An indication that two peptide sequences are substantially identical is that one peptide is immunologically reactive with antibodies raised against the second peptide. Thus, a peptide is substantially identical to a second peptide, for example, where the two peptides differ only by a conservative substitution.

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated if

WO 02/063012

PCT/US02/03346

necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

As noted above, another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules hybridize to each other under stringent conditions. The phrase "hybridizing specifically to" refers to the binding, duplexing, or hybridizing of a molecule only to a particular nucleotide sequence under stringent conditions when that sequence is present in a complex mixture (e.g., total cellular) DNA or RNA. "Bind(s) substantially" refers to complementary hybridization between a probe nucleic acid and a target nucleic acid and embraces minor mismatches that can be accommodated by reducing the stringency of the hybridization media to achieve the desired detection of the target nucleic acid sequence.

"Stringent hybridization conditions" and "stringent hybridization wash conditions" in the context of nucleic acid hybridization experiments such as Southern and Northern hybridization are sequence dependent, and are different under different environmental parameters. The  $T_m$  is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Specificity is typically the function of post-hybridization washes, the critical factors being the ionic strength and temperature of the final wash solution. For DNA-DNA hybrids, the  $T_m$  can be approximated from the equation of Meinkoth and Wahl, 1984;  $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% form) - 500/L$ ; where M is the molarity of monovalent cations, %GC is the percentage of guanosine and cytosine nucleotides in the DNA, % form is the percentage of formamide in the hybridization solution, and L is the length of the hybrid in base pairs.  $T_m$  is reduced by about  $1^\circ\text{C}$  for each 1% of mismatching; thus,  $T_m$ , hybridization, and/or wash conditions can be adjusted to hybridize to sequences of the desired identity. For example, if sequences with >90% identity are sought, the  $T_m$  can be decreased  $10^\circ\text{C}$ . Generally, stringent conditions are selected to be about  $5^\circ\text{C}$  lower than the thermal melting point I for the specific sequence and its complement at a defined ionic strength and pH. However, severely stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 1, 2, 3, or  $4^\circ\text{C}$  lower than the thermal melting point I; moderately stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 6, 7, 8, 9, or  $10^\circ\text{C}$  lower than the thermal melting point I; low stringency conditions can utilize a hybridization and/or wash at 11, 12, 13, 14, 15, or  $20^\circ\text{C}$  lower than the thermal melting point

WO 02/063012

PCT/US02/03346

1. Using the equation, hybridization and wash compositions, and desired T, those of ordinary skill will understand that variations in the stringency of hybridization and/or wash solutions are inherently described. If the desired degree of mismatching results in a T of less than 45°C (aqueous solution) or 32°C (formamide solution), it is preferred to increase the SSC concentration so that a higher temperature can be used. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen, 1993. Generally, highly stringent hybridization and wash conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point  $T_m$  for the specific sequence at a defined ionic strength and pH.

An example of highly stringent wash conditions is 0.15 M NaCl at 72°C for about 15 minutes. An example of stringent wash conditions is a 0.2X SSC wash at 65°C for 15 minutes (see, Sambrook, *infra*, for a description of SSC buffer). Often, a high stringency wash is preceded by a low stringency wash to remove background probe signal. An example medium stringency wash for a duplex of, e.g., more than 100 nucleotides, is 1X SSC at 45°C for 15 minutes. An example low stringency wash for a duplex of, e.g., more than 100 nucleotides, is 4-6X SSC at 40°C for 15 minutes. For short probes (e.g., about 10 to 50 nucleotides), stringent conditions typically involve salt concentrations of less than about 1.5 M, more preferably about 0.01 to 1.0 M, Na ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3, and the temperature is typically at least about 30°C and at least about 60°C for long robes (e.g., >50 nucleotides). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. In general, a signal to noise ratio of 2X (or higher) than that observed for an unrelated probe in the particular hybridization assay indicates detection of a specific hybridization. Nucleic acids that do not hybridize to each other under stringent conditions are still substantially identical if the proteins that they encode are substantially identical. This occurs, e.g., when a copy of a nucleic acid is created using the maximum codon degeneracy permitted by the genetic code.

Very stringent conditions are selected to be equal to the  $T_m$  for a particular probe. An example of stringent conditions for hybridization of complementary nucleic acids which have more than 100 complementary residues on a filter in a Southern or Northern blot is 50% formamide, e.g., hybridization in 50% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37°C, and a wash in 0. 1X SSC at 60 to 65°C. Exemplary low stringency conditions include hybridization with a buffer solution of 30 to 35% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) at 37°C, and a wash in 1X to 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl/0.3 M trisodium citrate) at 50 to

WO 02/063012

PCT/US02/03346

55°C. Exemplary moderate stringency conditions include hybridization in 40 to 45% formamide, 1.0 M NaCl, 1% SDS at 37°C, and a wash in 0.5X to 1X SSC at 55 to 60°C.

The following are examples of sets of hybridization/wash conditions that may be used to clone orthologous nucleotide sequences that are substantially identical to reference nucleotide sequences of the present invention: a reference nucleotide sequence preferably hybridizes to the reference nucleotide sequence in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA at 50°C with washing in 2X SSC, 0.1% SDS at 50°C, more desirably in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA at 50°C with washing in 1X SSC, 0.1% SDS at 50°C, more desirably still in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA at 50°C with washing in 0.5X SSC, 0.1% SDS at 50°C, preferably in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA at 50°C with washing in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 50°C, more preferably in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA at 50°C with washing in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C.

A 30 kDa ragweed protein allergen cDNA, or a portion thereof can be used to identify similar sequences in any variety or type of plant and thus, to identify or "pull out" sequences which have sufficient homology to hybridize to 30 kDa cDNA or mRNA or portion thereof, for example, DNA from allergens of other plants under conditions of low stringency. Those sequences which have sufficient homology (generally greater than 40%) can be selected for further assessment using the method described herein. Alternatively, high stringency conditions can be used as discussed above. In this manner, DNA of the present invention can be used to identify, in other types of plants, preferably related families, genera, or species, sequences encoding polypeptides having amino acid sequences similar to that of 30 kDa ragweed protein allergen and thus to identify allergens in other species. Thus, the present invention includes not only 30 kDa ragweed protein allergen, but also other allergens encoded by DNA which hybridizes, preferably under high stringency conditions, to DNA of the present invention.

The cloning of the cDNAs encoding the 30 kDa ragweed pollen allergen can be based on the recognition of the protein expressed by *Escherichia coli* transformed with lambda-gt 11 phage, using both specific monoclonal antibodies and specific serum IgE from grass pollen-sensitive patients.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The allergenic nature of the subject proteins are characterized in part, by their binding of the reaginic IgE antibodies which are present at high levels in sera of allergic patients. The IgE binding to the epitopes on allergic proteins can be tested in a chromogenic assay in which allergens immobilized on a solid support can be visualized by sequential incubation in (1) allergic patients serum; (2) enzyme-labeled anti-IgE antibodies.

A variety of expression vectors can be constructed for the production of the 30 kDa ragweed protein allergen, at least one fragment thereof or their derivatives. Thus, a further aspect of the present invention provides recombinant vectors comprising DNA sequences encoding the 30 kDa ragweed protein allergen, or derivatives or homologues thereof. More particularly, the present invention relates to recombinant DNA molecules comprising a eukaryotic or prokaryotic origin of replication, a detectable marker, DNA sequences encoding the 30 kDa ragweed protein allergen family members or derivatives or homologues thereof, or allergenic proteins cross-reactive with antibodies to the 30 kDa ragweed protein allergen or derivatives or homologues thereof, and, optionally, promoter sequences capable of directing transcription of 30 kDa ragweed protein allergen family members.

The 30 kDa ragweed protein allergen promoter is isolatable from ragweed genomic DNA by any number of procedures including use of promoter probes vectors, "chromosome walking" and S1 nuclease mapping and sequencing as DNA upstream of the transcription initiation site.

Accordingly, the present invention provides a recombinant DNA molecule comprising a ragweed pollen promoter sequence, and in particular a promoter for a gene encoding a 30 kDa ragweed protein allergen family member, or homologues or degenerate forms thereof located on the molecule and further having one or more restriction endonuclease sites downstream of the promoter such that a nucleotide sequence inserted into one or more of these sites is transcribable in the correct reading frame and is thereby a developmentally regulated, pollen-specific expression vector. As used herein, the "correct reading frame" has the same meaning as "in phase." The aforementioned DNA molecule will preferably also have a selectable marker thereon, such as an antibiotic or other drug resistance gene, such as for example gene encoding resistance to ampicillin, carbenicillin, tetracycline, streptomycin and the like. The recombinant molecule will further comprise a means for stable inheritance in a prokaryotic and/or eukaryotic cell. This can be accomplished by the recombinant

WO 02/063012

PCT/US02/03346

molecule carrying a eukaryotic and/or a prokaryotic origin of replication as hereinbefore described in relation to expression vectors.

Alternatively, the recombinant molecule will carry a means for integration into a host cell genome thereby permitting replication of the recombinant molecule in synchrony with the replication of said host cell genome. Examples of preferred prokaryotic hosts include cells *E. coli*, *Bacillus* and *Pseudomonas* amongst others. Preferred eukaryotic hosts include cells from yeast and fungi, insects, mammals and plants.

#### Antibodies to Ragweed Protein Allergens

The present invention extends to monoclonal and polyclonal antibodies to the 30 kDa ragweed protein allergen or at least one fragment of recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen or purified native 30 kDa ragweed protein allergen, produced according to methods well known to those of ordinary skill in the art.

#### Monoclonal Antibodies

The monoclonal antibodies may be used to screen the cDNA library for 30 kDa ragweed protein allergen clones to cross-reactivity with allergenic proteins from pollen of various related species. In the following discussion, reference to the 30 kDa ragweed protein allergen includes its derivatives, homologues and immunological relatives and chemical synthetic derivatives thereof. The following discussion also includes antibodies specific for purified 30 kDa ragweed protein allergen and fragments, derivative and homologues thereof. Such antibodies are contemplated to be useful in developing detection assays (immunoassays) for 30 kDa ragweed protein allergens especially during the monitoring of a therapeutic or diagnostic regimen and in the purification of recombinantly or synthetically produced 30 kDa ragweed protein allergen family members or purified native 30 kDa ragweed protein allergen. The antibodies may be monoclonal or polyclonal. Additionally, it is within the scope of this invention to include any second antibodies (monoclonal or polyclonal) directed to the first antibodies discussed above. The present invention further contemplates use of these first or second antibodies in detection assays and, for example, in monitoring the effect of a diagnostic or an administered pharmaceutical preparation. Furthermore, it is within the scope of the present invention to include antibodies to any molecules complexed with a 30 kDa ragweed protein allergen. Accordingly, an antibody to a 30 kDa ragweed protein allergen encompasses antibodies to such 30 kDa ragweed protein

WO 02/063012

PCT/US02/03346

allergen, or antigenic parts thereof, and to any associated molecules (e.g., lipid regions, carrier molecules, fused proteins, and the like).

The 30 kDa ragweed protein allergen family members, or fragments thereof, considered herein are purified then utilized in antibody production. Both polyclonal and monoclonal antibodies are obtainable by immunization with recombinant, synthetic or native 30 kDa ragweed protein allergen family members, and either type is utilizable for immunoassays. The methods of obtaining both types of sera are well known in the art. Polyclonal sera are less preferred but are relatively easily prepared by injection of a suitable laboratory animal with an effective amount of a purified 30 kDa ragweed protein allergen family member, or antigenic parts thereof, collecting serum from the animal, and isolating specific sera by any of the known immunoabsorbent techniques. Although antibodies produced by this method are utilizable in virtually any type of immunoassay, they are generally less favored because of the potential heterogeneity of the product.

The use of monoclonal antibodies in an immunoassay is particularly preferred because of the ability to produce them in large quantities and the homogeneity of the product. The preparation of hybridoma cell lines for monoclonal antibody production derived by fusing an immortal cell line and lymphocytes sensitized against the immunogenic preparation can be done by techniques which are well known to those who are skilled in the art. (See, for example, Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495-499, and Kohler and Milstein (1986) *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519.

Unlike preparation of polyclonal sera, the choice of animal is dependent on the availability of appropriate immortal lines capable of fusing with lymphocytes. Mouse and rat have been the animals of choice in hybridoma technology and are preferably used. Humans can also be utilized as sources for sensitized lymphocytes if appropriate immortalized human (or nonhuman) cell lines are available. For the purpose of the present invention, the animal of choice may be injected with from about 0.1 mg to about 20 mg of purified recombinant or native 30 kDa ragweed protein allergen, or parts thereof. Usually the injecting material is emulsified in Freund's complete adjuvant. Boosting injections may also be required. The detection of antibody production can be carried out by testing the antisera with appropriately labeled antigen. Lymphocytes can be obtained by removing the spleen or lymph nodes of sensitized animals in a sterile fashion and carrying out fusion. Alternatively, lymphocytes

WO 02/063012

PCT/US02/03346

can be stimulated or immunized in vitro, as described, for example, in Reading (1982) J. Immunol. Methods 53:261-291.

A number of cell lines suitable for fusion have been developed, and the choice of any particular line for hybridization protocols is directed by any one of a number of criteria such as speed, uniformity of growth characteristics, deficiency of its metabolism for a component of the growth medium, and potential for good fusion frequency.

Intraspecies hybrids, particularly between like strains, work better than interspecies fusions. Several cell lines are available, including mutants selected for the loss of ability to secrete myeloma immunoglobulin.

Cell fusion can be induced either by virus, such as Epstein-Barr or Sendai virus, or polyethylene glycol. Polyethylene glycol (PEG) is the most efficacious agent for the fusion of mammalian somatic cells. PEG itself may be toxic for cells, and various concentrations should be tested for effects on viability before attempting fusion. The molecular weight range of PEG may be varied from 1000 to 6000. It gives best results when diluted to from about 20% to about 70% (w/v) in saline or serum-free medium. Exposure to PEG at 37° C. for about 30 seconds is preferred in the present case, utilizing murine cells. Extremes of temperature (*i.e.*, about 45° C.) are avoided, and preincubation of each component of the fusion system at 37° C. prior to fusion can be useful. The ratio between lymphocytes and malignant cells is optimized to avoid cell fusion among spleen cells and a range of from about 1:1 to about 1:10 is commonly used.

The successfully fused cells can be separated from the myeloma line by any technique known by the art. The most common and preferred method is to chose a malignant line which is hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) deficient, which will not grow in an aminopterin-containing medium used to allow only growth of hybrids, and aminopterin-containing medium used to allow only growth of hybrids and which is generally composed of hypoxanthine aminopterin, and thymidine, commonly known as the HAT medium. The fusion mixture can be grown in the HAT-containing culture medium immediately after the fusion or 24 hours later. The feeding schedules usually entail maintenance in HAT medium for two weeks and then feeding with either regular culture medium or hypoxanthine, thymidine-containing medium.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The growing colonies are then tested for the presence of antibodies that recognize the antigenic preparation. Detection of hybridoma antibodies can be performed using an assay where the antigen is bound to a solid support and allowed to react to hybridoma supernatants containing putative antibodies. The presence of antibodies may be detected by "sandwich" techniques using a variety of indicators. Most of the common methods are sufficiently sensitive for use in the range of antibody concentrations secreted during hybrid growth.

Cloning of hybrids can be carried out after 21-23 days of cell growth in selected medium. Cloning can be performed by cell limiting dilution in fluid phase or by directly selecting single cells growing in semi-solid agarose. For limiting dilution, cell suspensions are diluted serially to yield a statistical probability of having only one cell per well. For the agarose technique, hybrids are seeded in a semisolid upper layer, over a lower layer containing feeder cells. The colonies from the upper layer may be picked up and eventually transferred to wells.

Antibody-secreting hybrids can be grown in various tissue culture flasks, yielding supernatants with variable concentrations of antibodies. In order to obtain higher concentrations, hybrids may be transferred into animals to obtain inflammatory ascites. Antibody-containing ascites can be harvested 8-12 days after intraperitoneal injection. The ascites contain a higher concentration of antibodies but include both monoclonals and immunoglobulins from the inflammatory ascites. Antibody purification may then be achieved by, for example, affinity chromatography.

#### **Detection of the 30 kDa Ragweed Protein Allergen**

The presence of 30 kDa ragweed protein allergen contemplated herein, or antibodies specific for same, in a patient's serum, plant or mammalian tissue or tissue extract, can be detected utilizing antibodies prepared as above, either monoclonal or polyclonal, in virtually any type of immunoassay. A wide range of immunoassay techniques are available as can be seen by reference to U.S. Pat. No. 4,015,043, 4,424,279 and 4,018,653. This, of course, includes both single-site and two-site, or "sandwich", assays of the non-competitive types, as well as in the traditional competitive binding assays. Sandwich assays are among the most useful and commonly used assays and are favored for use in the present invention. A number of variations of the sandwich assay technique exist, and all are intended to be encompassed by the present invention. Briefly, in a typical forward assay, an unlabeled antibody is

WO 02/063012

PCT/US02/03346

immobilized in a solid substrate and the sample to be tested brought into contact with the bound molecule. After a suitable period of incubation, for a period of time sufficient to allow formation of an antibody-antigen secondary complex, a second antibody, labeled with a reporter molecule capable of producing a detectable signal is then added and incubated, allowing time sufficient for the formation of a tertiary complex of antibody-antigen-labeled antibody (e.g., antibody-30 kDa ragweed protein-antibody). Any unreacted material is washed away, and the presence of the antigen is determined by observation of a signal produced by the reporter molecule. The results may either be qualitative, by simple observation of the visible signal, or may be quantitated by comparing with a control sample containing known amounts of hapten. Variations on the forward assay include a simultaneous assay, in which both sample and labeled antibody are added simultaneously to the bound antibody, or a reverse assay in which the labeled antibody and sample to be tested are first combined, incubated and then added simultaneously to the bound antibody. These techniques are well known to those skilled in the art, including any minor variations as will be readily apparent.

In the typical forward sandwich assay, a first antibody having specificity for the 30 kDa ragweed protein allergen, or antigenic parts thereof, contemplated in this invention, is either covalently or passively bound to a solid surface. The solid surface is typically glass or a polymer, the most commonly used polymers being cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene. The solid supports may be in the form of tubes, beads, discs of microplates, or any other surface suitable for conducting an immunoassay. The binding processes are well-known in the art and generally consist of cross-linking covalently binding or physically adsorbing, the polymer-antibody complex is washed in preparation for the test sample. An aliquot of the sample to be tested is then added to the solid phase complex and incubated at 25° C. for a period of time sufficient to allow binding of any subunit present in the antibody. The incubation period will vary but will generally be in the range of about 2-40 minutes. Following the incubation period, the antibody subunit solid phase is washed and dried and incubated with a second antibody specific for a portion of the hapten. The second antibody is linked to a reporter molecule which is used to indicate the binding of the second antibody to the hapten.

By "reporter molecule," as used in the present specification, is meant a molecule which, by its chemical nature, provides an analytically identifiable signal which allows the

WO 02/063012

PCT/US02/03346

detection of antigen-bound antibody. Detection may be either qualitative or quantitative. The most commonly used reporter molecules in this type of assay are either enzymes, fluorophores or radionuclide containing molecules (i.e., radioisotopes). In the case of an enzyme immunoassay, an enzyme is conjugated to the second antibody, generally by means of glutaraldehyde or periodate. As will be readily recognized, however, a wide variety of different conjugation techniques exist, which are readily available to the skilled artisan. Commonly used enzymes include horseradish peroxidase, glucose oxidase, beta-galactosidase and alkaline phosphatase, amongst others. The substrates to be used with the specific enzymes are generally chosen for the production, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, of a detectable color change. For example, R-nitrophenyl phosphate is suitable for use with alkaline phosphatase conjugates; for peroxidase conjugates, 1,2-phenylenediamine, 5-aminosalicylic acid, or toluidine are commonly used. It is also possible to employ fluorogenic substrates, which yield a fluorescent product rather than the chromogenic substrates noted above. In all cases, the enzyme-labelled antibody is added to the first antibody hapten complex, allowed to bind, and then the excess reagent is washed away. A solution containing the appropriate substrate is then added to the tertiary complex of antibody-antigen-antibody. The substrate will react with the enzyme linked to the second antibody, giving a qualitative visual signal, which may be further quantitated, usually spectrophotometrically, to give an indication of the amount of hapten which was present in the sample. "Reporter molecule" also extends to use of cell agglutination or inhibition of agglutination such as red blood cells or latex beads, and the like.

Alternately, fluorescent compounds, such as fluorescein and rhodamine, may be chemically coupled to antibodies without altering their binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labelled antibody adsorbs the light energy, inducing a state of excitability in the molecule, followed by emission of the light at a characteristic color visually detectable with a light microscope. As in the EIA, the fluorescent labelled antibody is allowed to bind to the first antibody-hapten complex. After washing off the unbound reagent, the remaining tertiary complex is then exposed to the light of the appropriate wavelength, the fluorescein observed indicates the presence of the hapten of interest. Immunofluorescence and EIA techniques are both very well established in the art and are particularly preferred for the present method. However, other reporter molecules, such as radioisotope, chemiluminescent or bioluminescent molecules, may also be employed. It will be readily apparent to the skilled technician how to

WO 02/063012

PCT/US02/03346

vary the procedure to suit the required purpose. It will also be apparent that the foregoing can be used to detect directly or indirectly (*i.e.*, via antibodies) the 30 kDa ragweed protein allergen of this invention.

The term "protein chip" refers to chips for assaying proteins. Examples of protein chips include The Ciphergen ProteinChip® System available from Ciphergen which provides scientists with a versatile, integrated platform for biological research. Biologically important molecules from a variety of sources may be captured and analyzed on ProteinChip Arrays, using ProteinChip Readers and ProteinChip Software for rapid data analysis. The 30 kDa ragweed protein allergen of this invention may be analyzed using protein chips.

Another aspect of the present invention provides a method of detecting the 30 kDa ragweed protein allergen or a derivative or homologue thereof or an allergenic protein immunologically reactive with the 30 kDa ragweed protein allergen or derivatives or homologues present in serum, tissue extract, plant extract or other biological fluid comprising the steps of containing the serum, extract or fluid to be tested with an antibody to the 30 kDa ragweed protein allergen for a time and under conditions sufficient for an allergenic protein-antibody complex to form and subjecting the complex to a detecting means.

#### **Kits**

The present invention is also directed to a kit for the rapid and convenient assay for antibodies to the 30 kDa ragweed protein allergen or derivatives, homologues or immunological relatives thereof in mammalian body fluids (e.g., serum, tissue extracts, tissue fluids), *in vitro* cell culture supernatants, and cell lysates. The kit is compartmentalized to receive a first container adapted to an antigenic component thereof, and a second container adapted to contain an antibody to the 30 kDa ragweed protein allergen, the antibody being labelled with a reporter molecule capable of giving a detectable signal as hereinbefore described. If the reporter molecule is an enzyme, then a third container adapted to contain a substrate for the enzyme is provided. In one use of the subject kit, a sample to be tested is contacted with the contents of the first container for a time and under conditions for an antibody, if present in the sample, to bind to the 30 kDa ragweed protein allergen in the first container. If the 30 kDa ragweed protein allergen of the first container has bound to antibodies in the test fluid, the antibodies of the second container will bind to the secondary

WO 02/063012

PCT/US02/03346

complex to form a tertiary complex and, since these antibodies are labeled with a reporter molecule, when subjected to a detecting means, the tertiary complex is detected.

Therefore, one aspect of the present invention is a kit for the detection of antibodies to a protein having allergenic properties, the protein from pollen of ragweed, the kit being compartmentalized to receive a first container adapted to contain recombinant 30 kDa ragweed protein allergen or its antigenic derivative or homologue or a purified native the 30 kDa ragweed protein allergen or its antigenic derivative or homologue, and a second container adapted to contain an antibody to the 30 kDa ragweed protein allergen or derivative or homologue thereof, the antibody labelled with a reporter molecule capable of giving a detectable signal. The "reporter molecule" may also involve agglutination of red blood cells (RBC) on latex beads. In this kit the reporter molecule is a radioisotope, an enzyme, a fluorescent molecule, a chemiluminescent molecule, bioluminescent molecule or RBC. The kit alternatively comprises a container adapted to contain recombinant 30 kDa ragweed protein allergen or is antigenic derivative or homologue labeled with a reporter molecule capable of giving a detectable signal.

#### Immunotherapy

Because of the presence of allergens in the environment, hayfever and seasonal asthma continue to have significant morbidity and socio-economic impact on Western communities, despite advances made in their pharmacology and immunology. While the available spectrum of drugs, including anti-histamines and steroids have resulted in improvement in the treatment of allergic disease, they have unfortunate side-effects associated with long-term usage. Because of these problems, renewed interest has been shown in the immunotherapy of allergic disease. Immunotherapy involves the injection of potent allergen extracts to desensitize patients against allergic reactions (Bousquet, & Michel (1989) *Allergy Clin. Immunol. News* 1: 7-10). Unfortunately, the pollen preparations used as allergens are polyvalent and of poor quality. Consequently, concentrations used are frequently high in order to induce IgG responses, but may be lethal through triggering of systemic reactions, including anaphylaxis. The cloned gene product or synthetic peptides based on the sequence of allergens provides a safer medium for therapy since it can be quality controlled, characterized and standardized.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

The precise mechanism for symptomatic relief remains hypothetical. However, administration of a preparation comprising recombinant, synthetic or purified native 30 kDa ragweed protein allergen or at least one antigenic fragment thereof, of the instant invention to a ragweed sensitive individual will modify the allergic response of a ragweed sensitive individual to ragweed pollen allergens, *e.g.* by modifying the B-cell response to 30 kDa ragweed protein allergen, the T-cell response to 30 kDa ragweed protein allergen, or both the B cell and T cell response to 30 kDa ragweed protein allergen.

Accordingly, the present invention provides a method for desensitizing a human allergic to ragweed pollens which comprises administering a desensitizing-effective amount of 30 kDa ragweed protein allergen or at least one fragment or a derivative, homologue, or immunological relative thereof, for a time and under conditions sufficient to effect desensitization of the human to the grass pollen.

The present invention also provides a method of treating sensitivity to ragweed pollen in a mammal sensitive to such pollen, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a therapeutic composition of the invention. The present invention further provides a method of treating sensitivity to ragweed pollen allergen or an allergen immunologically cross-reactive with ragweed pollen allergen comprising administering to a mammal a therapeutically effective amount of the protein preparation of the invention.

Through the use of the peptides and protein of the present invention, preparations of consistent, well-defined composition and biological activity can be made and administered for therapeutic purposes (*e.g.*, to modify the allergic response of a ragweed pollen sensitive individual to pollen of such plants. Administration of such peptides or protein may, for example, modify B-cell response to 30 kDa ragweed protein allergen, T-cell response to 30 kDa ragweed protein allergen, or both responses. Purified peptides can also be used to study the mechanism of immunotherapy of ragweed protein allergy and to design modified derivatives or analogues useful in immunotherapy.

#### **Pharmaceutical Compositions**

The present invention, therefore, provides a pharmaceutical composition comprising a desensitizing or therapeutically effective amount of 30 kDa ragweed protein allergens or derivatives, homologues or immunological relatives thereof and one or more

WO 02/063012

PCT/US02/03346

pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents. The active ingredients of a pharmaceutical composition comprising 30 kDa ragweed protein allergens is contemplated to exhibit excellent therapeutic activity, for example, in the desensitization of humans allergic to ragweed pollen when administered in amount which depends on the particular case. For example, from about 0.5 µg to about 20 mg per kilogram of body weight per day may be administered. Dosage regime may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. The active compound may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal or suppository routes or implanting (e.g., using slow release molecules). Depending on the route of administration, the active ingredients which comprise the pharmaceutical composition of the invention may be required to be coated in a material to protect the ingredients from the action of enzymes, acids and other natural conditions which may inactivate said ingredients. For example, the 30 kDa ragweed protein allergens may be administered in an adjuvant, co-administered with enzyme inhibitors or in liposomes. Adjuvant is used in its broadest sense and includes any immune stimulating compound, such as interferon. Adjuvants contemplated herein include resorcinols, non-ionic surfactants such as polyoxyethylene oleyl ether and n-hexadecyl polyethylene ether. Enzyme inhibitors include pancreatic trypsin. Liposomes include water-in-oil-in-water CGF emulsions as well as conventional liposomes. For purposes of inducing T cell anergy, the pharmaceutical composition is preferably administered in non-immunogenic form (e.g. it does not contain adjuvant).

The active compounds may also be administered parenterally or intraperitoneally. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders of the extemporaneous dispersion. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol,

WO 02/063012

PCT/US02/03346

polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The preventions of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze-drying technique which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from previously sterile-filtered solution thereof.

When at least one 30 kDa ragweed protein allergen family member, or at least one fragment thereof is suitably protected as described above, the active compound may be orally administered, for example, with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or it may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsule, or it may be compressed into tablets, or it may be incorporated directly with food of the diet. For oral therapeutic administration, the active compound may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. Such compositions and preparations should contain at least 1% by weight of active compound. The percentage of the compositions and preparations may, of course, be carried and may conveniently be between about 5 to 80% of the weight of the unit. The amount of active compound in such therapeutically useful compositions is such that a suitable dosage will be obtained. Preferred compositions or preparations according to the present invention

WO 02/063012

PCT/US02/03346

are prepared so that an oral dosage unit form contains between about 10 and 2000 mg of active compound.

The tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the following: A binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain the active compound, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring such as cherry or orange flavor of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compound may be incorporated into sustained-release preparations and formulations.

As used herein "pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, use thereof in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the novel dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (1) the unique characteristics of the active material and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding

WO 02/063012

PCT/US02/03346

such an active material for the treatment of disease in living subjects having a diseased condition in which bodily health is impaired as herein disclosed in detail.

The principal active ingredient is compounded for convenient and effective administration in effective amounts with a suitable pharmaceutically acceptable carrier in dosage unit form as hereinbefore disclosed. A unit dosage form can, for example, contain the principal active compound in amounts ranging from about 10  $\mu$ g to about 2000 mg. Expressed in proportions, the active compound is generally present in from about 10  $\mu$ g to about 2000 mg/ml of carrier. In the case of compositions containing supplementary active ingredients, the dosages are determined by reference to the usual dose and manner of administration of the ingredients.

The present invention is further illustrated by the following non-limiting Example.

#### EXAMPLE

##### A. Materials and Methods

**Pollen grains.** Complete and defatted Giant ragweed (*Ambrosia trifida*) pollen grains were purchased from Greer laboratories (Lenoir, NC). A control pollen extract from giant ragweed was purchased from Bayer, Inc (Spokane WA) and also used for skin tests in dogs; a pollen extract mixture of giant, short and Western ragweed was purchased from Bayer, Inc. for clinical percutaneous skin tests in humans.

**Protein quantification and amino acid sequencing.** Protein was quantified with the Bradford assay using gamma globulin as standard. Bradford, M.A. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. Amino acid sequences were determined with tryptic peptides by mass spectroscopy by the Protein Structure Laboratory, University of California, Davis.

**Protein labeling with monobromobimane (mBBr).** Protein solutions were reduced with 1 mM dithiothreitol at 100°C, 5 min. The sample was cooled to room temperature and labeled with 0.2 mM mBBr by incubating 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 10 mM beta-mercaptoethanol and the proteins were precipitated by adding trichloroacetic acid to 12%. After washing with 100% acetone, the pellet was subjected to SDS-PAGE and the extent of protein labeling was visualized by spectroscopy at 365 nm as

WO 02/063012

PCT/US02/03346

described by Wong et al. Wong, J.H., Kobrehel, K. and Buchanan, B.B. (1995) Thioredoxin and seed proteins. *Methods in Enzymology* 252: 228-240.

**Glycoprotein staining.** After separation by SDS-PAGE, proteins were stained for glycosylation with the in gel GelCode Glycoprotein Staining kit from Pierce (Rockford, IL).

**Gel electrophoresis.** Samples were reduced by 1 mM dithiothreitol at 100°C, 5 min. and after cooling to room temperature were separated in 10-20% SDS-PAGE. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5. After the run, gels were fixed, stained with Coomassie brilliant blue G-250 and destained in 10% acid acetic. We observed that low molecular weight proteins such as Amb t 5 required reduction by dithiothreitol to be stained effectively with Coomassie blue and that the use of methanol for destaining removes them from the gel.

**Immunoblots.** Proteins were transferred from 10-20% SDS-PAGE to a nitrocellulose membrane under semi-dry conditions with a 20% methanol solution (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) for 1 h at 4°C. Nitrocellulose membranes were briefly stained with Ponceau Red to verify the extent of transfer and then blocked by incubating twice with a 3% cow's milk solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.2 % Triton X-100) for 30 min at room temperature. Membranes were then incubated in 1 to 10 dilution of sera in the same solution overnight at 4°C. Finally, membranes were incubated at room temperature for 1 h in a 1000-X dilution of secondary anti-human IgE conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) and reactive protein identified with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate kit for peroxidase from Vector laboratories (Burlingame, CA).

**ELISA.** Microplates were coated with 100 µl of each purified allergen (see below) at 1 µg per ml in 10 mM PBS, pH 7.5, by leaving overnight at 4°C. The plates were washed 3 times with 10 mM PBS, pH 7.2, containing 0.05% Triton X-100 (Buffer A), coated a second time with 1% milk in Buffer A for 2 hr at 37°C and washed as before. Serial dilutions (10 - 50-X) of each of 10 different human sera were added in Buffer A and incubation was continued for an additional 2 hr at 37°C. Plates were washed as before and incubated with a 1000-X dilution of secondary anti-human IgE conjugated to peroxidase (Sigma) for 2 hr at 37°C. TMB substrate for measuring the conjugated peroxidase was added according to the manufacturer's instructions and the reaction was monitored for linearity at 650 nm for 1 h

WO 02/063012

PCT/US02/03346

using a microplate reader. The reaction was stopped with 50  $\mu$ l 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance was measured at 450 nm. The experiment was repeated 3 times and the mean was calculated for each allergen with the 10 human sera tested.

**Skin tests.** Procedures to measure the type I hypersensitivity reaction by skin tests with sensitized dogs have been described elsewhere. Ermel, R.W., Kock, M., Griffey, S.M., Reinhart, G.A. and Frick, O.L. (1997) The atopic dog: a model for food allergy. *Laboratory Animal Science* 47: 40-9. In brief, 0.5% Evans blue dye (0.2 mL/kg) was injected intravenously 5 minutes prior to skin testing. Aliquots of 0.1 mL of the test protein solution in half log dilutions were injected intradermally on ventral abdominal skin. Skin tests were read by the same experienced blinded observer scoring the two perpendicular diameters of each blue spot. Appropriate negative controls (diluted in PBS) were included for each animal tested.

**Human sera.** Seven sera from patients with fall pollinosis and a positive prick skin test to a mixture of giant, short and Western ragweed pollen extracts (wheal 3 mm greater than the negative control) and 15 sera from patients with a positive Pharmacia ImmunoCAP specific IgE assay to giant ragweed (IU/kL > 0.35) were used. Many of these subjects were known to have resided in the Midwest, East or Southeast areas of the United States prior to California residence, but full geographic history was not available on all subjects. An additional 20 sera from patients known to be sensitive to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) (by prick skin testing, positive ImmunoCAP and late spring allergic rhinitis) but negative on ImmunoCAP assay to giant ragweed were also included.

**Calculation of Relative allergenicity.** Equal amounts of protein, either purified or in pollen extracts, were injected and assigned a relative value indicating the minimal quantity producing a wheal: 330 ng protein = 1, 100 ng = 2, 33 ng = 3, 10 ng = 4, 3.3 ng = 5, 1 ng = 6 and 0.33 ng = 7. We then summed the values for each purified protein or extract for the two groups of dogs tested [4 old (7-year-old) and 5 young (2-year-old) dogs.]

**Protein extraction and allergen purification.** An adaptation of the method of Marsh et al. 1981 was followed. Marsh, D.G., Belin, L., Bruce, A., Lichtenstein, L.M. and Hussain, R. (1981) Rapidly released allergens from short ragweed pollen. I. Kinetics of release of known allergens in relation to biologic activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 67 (3): 206-16. Hussain, R., Norman, P.S. and Marsh, D.G. (1981) Rapidly

WO 02/063012

PCT/US02/03346

released allergens from short ragweed pollen. II. Identification and partial purification. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 67 (3): 217-22. To work out the procedure, an extract was prepared from 10 g of pollen (complete or defatted) and subjected to different exploration treatments. For the purification of proteins, 100 g of complete pollen was used. In brief, the pollen was suspended at 1 g to 10 ml of cold buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 1  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM EDTA-Na] and stirred gently for 30 min at room temperature. The mixture was centrifuged for 10 min, 25,900 x g, 4°C. The pellet, containing the pollen grains, was set aside and the supernatant fraction was re-centrifuged and filtered through Whatman quantitative filters. Ammonium sulfate was added to 95% saturation yielding a floating pellet that was recovered by centrifugation (10 min, 25,900 x g, 4°C) and resuspended to a minimal volume with 20 mM Tris-HCl pH 7.5, containing 200 mM NaCl. With both complete and defatted pollen, the high quantity of lipids was removed by extraction with an equal volume of petroleum ether. The mixture was centrifuged (10 min, 48,400 x g, 4°C) and the organic fraction was discarded. The petroleum ether step was repeated at least 4 times. The resulting clarified aqueous solution was filtered through a 0.2  $\mu$ M filter and, in the case of 100 g pollen, separated on a Sephadex G-50F gel filtration column (2.1 x 90 cm) equilibrated and eluted with the same buffer used to dissolve the sample. The fractions were analyzed by 10-20% SDS-PAGE, combined according to protein size and dialyzed against 10 mM K-phosphate buffer pH 7.0 overnight at 4°C. The remainder of the procedure is described for 100 g pollen as starting material.

**30 kDa protein.** The combined Sephadex G-50F fractions of the proteins from complete pollen were dialyzed against 10 mM K-phosphate pH 7.0 and applied first to a 6 ml Resource S column and then to a 6 ml Resource Q column, both equilibrated with 20 mM K-phosphate pH 7.0. The 30 kDa protein (known herein as the 30 kDa ragweed protein allergen and the 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen) was not retained in either case and was recovered in the column pass-through fractions. A considerable amount of contaminants was retained on the columns and thus removed from the 30 kDa protein. The fractions containing the 30 kDa protein were subjected to precipitation with ammonium sulfate, 95% saturation, and centrifuged for 10 min, 48,400 x g, 4°C. The supernatant fraction was discarded and the pellet was resuspended in 2-3 ml volume of 50 mM K-phosphate, pH 7.0, containing 2.0 M ammonium sulfate. The fraction was applied to a 1 ml Resource Isopropyl column equilibrated with the same buffer. The 30 kDa protein was eluted at 1.7 M using a 60 ml gradient ranging from 2 to 0 M ammonium sulfate. The

WO 02/063012

PCT/US02/03346

fractions containing the 30 kDa protein were localized by SDS-PAGE (using mBBr labeling and Coomassie blue staining), combined and dialyzed against 5 mM K-phosphate, pH 7.0. Sodium-acetate pH 4.75 was then added to 30 mM and the sample was applied to a 6 ml Resource S equilibrated with the same buffer. The 30 kDa protein was eluted at 100-200 mM NaCl in a 120 ml gradient ranging from 0 to 300 mM NaCl. The fractions were neutralized by adding 50 mM K-phosphate pH 7.0, dialyzed against 10 mM of the same buffer, concentrated by ultrafiltration with a YM-10 Amicon membrane and stored at -70°C. Protein was quantified using the Bradford assay.

**30 kDa protein (alternate procedure).** Following addition of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, the combined Sephadex G-50F fractions were applied to a 18 ml Concanavalin A affinity column (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) equilibrated with the same buffer. The 30 kDa protein was retained and eluted with a solution of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl and 0.5 M methyl-alpha-D-glucopyranoside. The fractions containing the 30 kDa protein were combined and dialyzed against 5 mM K-phosphate buffer pH 7.0 using a membrane with a 25,000 M.W. cutoff pore. Finally, the protein was applied to a 6 ml Resource S column equilibrated with 20 mM Na-acetate, pH 6.0, and was recovered in the pass-through fractions.

**Amb t 5.** Ammonium sulfate was added to 2.6 M to the low molecular weight Sephadex G-50F fractions from complete pollen containing Amb t 5. The resulting solution was fractionated on a 1 ml HiTrap Phenyl Sepharose column equilibrated with 200 mM phosphate buffer, pH 7.0, and eluted with a 50 ml of ammonium sulfate gradient ranging from 2.5 to 0 M in this same buffer. Pure Amb t 5 was recovered in a single peak at approximately 0.8 M ammonium sulfate, dialyzed against 5 mM K-phosphate buffer, pH 7.0, and stored at -70°C for further experiments. Protein was quantified using a molar coefficient of extinction at 278 nm of 5800. Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculations of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182: 319-26.

**Amb t 3 and cytochrome c.** The maximal yield of Amb t 3 was obtained from complete pollen and cytochrome c from defatted pollen. The Sephadex G-50F fractions containing proteins of about 10-20 kDa from the respective pollen preparations were combined and applied to a 6 ml Resource S column equilibrated with 20 mM K-phosphate buffer, pH 7.0. Amb t 3 and cytochrome c were separated with a 120 ml gradient from 0 to

WO 02/063012

PCT/US02/03346

500 mM NaCl in 20 mM K-phosphate buffer pH 7.0. Amb t 3 was eluted at 100-120 mM and cytochrome c at 150-170 mM NaCl. The presence of Amb t 3 was confirmed by adding a crystal of potassium ferricyanide to the fractions to oxidize the copper of Amb t 3, thereby turning the solution blue. Fractions containing Amb t 3 were combined and made 2 M with ammonium sulfate. The final purification of Amb t 3 and cytochrome c was achieved by separation through a 1 ml HiTrap Phenyl Sepharose column equilibrated with 200 mM K-phosphate buffer, pH 7.0. The column was eluted with a 60 ml ammonium sulfate gradient ranging from (1) 1.75 to 0 M for Amb t 3, which was eluted at 1.4 M, and (2) 2.0 to 0 M for cytochrome c, eluted at 1.2 M. The purified proteins were then dialyzed against 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.0 and stored in aliquots at -70°C. Protein content was quantified using the Bradford assay and, in the case of Amb t 3, using a molar coefficient of extinction at 278 nm of 26600. Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculations of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182: 319-26.

**Amb t 1 and 2.** The largest quantity of Amb t 1-2 was obtained from defatted pollen. The Sephadex G-50F fractions containing proteins of 35 kDa and greater were dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, containing 14 mM beta-mercaptoethanol. The following steps were modified from the procedure of King's group. King, T.P. (1972) Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. *Biochemistry* 11: 367-371. Ishizaka, K., Kishimoto, T. Delespesse, G. and King, T.P. (1974) Immunogenic properties of modified antigen E. I. Presence of specific determinants of T cells in denatured antigen and polypeptide chains. *Journal of Immunology* 113: 70-7. King, T.P. Philip, S.N. and Tao, N. (1974) Chemical modifications of the major allergen of ragweed pollen, antigen E. *Immunochemistry* 11:83-92. Ishizaka, K. Okudaira, H. and King T.P. (1975) Immunogenic properties of modified antigen E. II. Ability of urea-denatured antigen and alpha-polypeptide chain to prime cells specific for antigen E. *Journal of Immunology* 114:110-5. King, T.P., Kouchmian, L., Ishizaka, K., Lichtenstein, L. and Norman, P.S. (1975) Immunochemical studies of dextran coupled ragweed pollen allergen, antigen E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 169: 464-473. The protein solution was applied to a 6 ml Resource Q column equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, and eluted with a gradient of 240 ml ranging from 0 to 500 mM NaCl. As described earlier by King's group, the proteins were eluted at about 50 mM NaCl. Ammonium sulfate was added to 2.5 M and the solution was applied to a 1 ml Resource Isopropyl column equilibrated with 100 mM K-phosphate, pH 7.0, containing 2.5 M ammonium sulfate. Amb t 1 and Amb t 2 were eluted at about 1.4

WO 02/063012

PCT/US02/03346

M ammonium sulfate in a 100 ml gradient ranging from 2.5 M to 0 M. The positive fractions were identified as above, combined, concentrated by ultrafiltration through a YM-30 Amicon membrane, dialyzed against 10 mM K-phosphate pH 7.0 and stored in aliquots at -70°C. The positive fractions were shown to have the correct molecular mass by SDS-PAGE; allergenicity was confirmed by skin tests with ragweed-sensitive dogs. Protein was quantified with the Bradford assay.

Immunoblot inhibitions to investigate possible cross-reactivity of other pollens with the 30 kDa protein were performed for 4 patient sera from patients who lived in ragweed endemic areas prior to relocation to California. Complete pollens of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and black walnut (*Juglans nigra*) were purchased from Hollister-Stier (Spokane, WA). In brief, 5 g of pollen were extracted in PBS (1:20 w:v) overnight at 4°C and pelleted by centrifugation as described above. After that, the supernatant was defatted with ether and the organic phase was discarded. Preincubation of sera with 250 µg/ml perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen extract, black walnut (*Juglans nigra*) pollen extract, or ovalbumin (Sigma) as a negative control was done overnight at 4°C. The sera were then incubated with nitrocellulose strips as above, washed, and <sup>125</sup>I-labeled anti-IgE (Hycor Biomedical, Inc., Garden Grove, CA) was used as the secondary antibody for immunoblotting as described by Teuber et al., 1999.

#### B. Results and Discussion

In a comparative allergen study, Marsh and his colleagues Marsh, et al. (1981), Hussain, et al. (1981) found no significant differences between complete and defatted ragweed pollen. By contrast, our preliminary investigation on the hypersensitivity response of atopic dogs suggested a difference in the allergen profile with complete and defatted pollen Ermel, et al. (1997) and G. del Val, et al., J. Allergy Clin. Immunol. 103, 690 (1999). The results seemed of interest because of possible relevance to the allergenic response to pollen. As demonstrated by Bridger and Protcor, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 80, 445 (1971), albumin beads of the pollen grain size remain in the nose and larynx for about a half-hour prior to being swallowed. A large quantity of pollen protein is, therefore, released during that time. Howlett, et al. J. Cellsci, 13,603 (1973). We have, therefore, focused on the proteins released within the first 20 minutes of extraction, thinking that new allergens could be present in this fraction (the "first released proteins"). This fraction is known to contain several allergens, Amb t 5, Amb t 3 and cytochrome c) Marsh, et al.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

(1981), Hussain, et al. (1981). The major allergen (Amb t 1), however, requires several hours for maximal release King (1972), Ishizaka, et al. (1974), King et al. (1974) and Ishizaka, et al. (1974). Our initial results suggested that defatted pollen differs from its complete counterpart by a deficiency in the first released protein allergens (data not shown).

**Identification of the 30 kDa protein as an allergen.** This finding prompted us to carry out an analysis of the allergens present in the first released proteins of complete and defatted ragweed pollen Bradford (1976). Owing to the large amount of lipid recovered in aqueous extracts of complete pollen grain, we devised a procedure to obtain large quantities of "first released proteins". In the current comparative study, the aqueous solutions obtained after the petroleum ether extraction and filtration steps were applied to a Sephadex G-50F gel filtration column and the fractions probed with sera from ragweed-sensitive patients. The fractions from the two types of pollen preparations were then examined with respect to (a) total protein using Coomassie blue stain (**Figure 3A**); (b) proteins containing sulphydryl groups using a fluorescent probe, monobromobimane (mBBr), applied after reduction with dithiothreitol (9, 24-27) (**Figure 3B**); and (c) allergens using pooled sera from 10 patients with specific IgE directed against giant ragweed (**Figure 3C**). S.S. Teuberm, K.C. Jarvis, A.M. Dandekar, W.R. Peterson, A.A. Ansari, J. Allergy Clin. Immunol. 104, 1311 (1999).

Significant differences were noted between the complete and defatted pollens. Standing out was a 30 kDa protein (identified with a wedge) that contained a sulphydryl component and was delayed in elution from the gel filtration column such that it was recovered with the low molecular weight proteins, e.g., Amb t 5 (**Figures 3A and 3B**). The 30 kDa protein was recognized by IgE in the pool of human sera used (**Figure 3C**). By exposing the gel filtration fractions to individual sera, we found that the 30 kDa protein was recognized by sera of all ten patients tested, whereas the other allergens were not (data not shown). This finding suggested that the 30 kDa protein was a major allergen (see **Figures 5A and 5B** below).

In addition to the 30 kDa protein, several proteins not previously described were found to bind human IgE. These include (i) an 8-10 kDa disulfide protein (G-50F fraction #36) in complete pollen extract, just below Amb t 3 (the 8-10 kDa protein is identified with a star in **Figure 3C**), and (ii) a second 30 kDa protein in the defatted extract that was not delayed by the gel filtration (G-50F fraction #16, identified with a diamond in **Figure 3C**).

WO 02/063012

PCT/US02/03346

Finally, as Marsh and collaborators reported, we found, that unlike Amb t 3 and Amb t 5, the level of the major allergen Amb t 1-2 was low in the protein fraction from complete pollen. A significantly higher quantity of Amb t 1-2, was, however, found in the corresponding fraction from defatted pollen.

**Properties of the 30 kDa protein.** Because of its apparent allergenic properties, we purified the 30 kDa protein from complete pollen to homogeneity as detailed above. In characterizing the protein, we found it to have properties of many known allergens R.D.J. Huby, R.J. Dearman, I. Kimber, *Toxicol. Sci.* 55, 235 (2000). S.B. Lehrer, W.E. Horner, G. Reese, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, S165 (1996). D.D. Metcalfe *et al.*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, S165 (1996). J.D. Astwood, J.N. Leach, R.L. Fuchs, *Nat. Biotechnol.* 14, 1269 (1996); i.e., it (i) was a glycoprotein (**Figure 4A**), (ii) had at least one disulfide bond (**Figure 4B**) and (iii) had a pI about 8.0 (determined by isoelectrofocusing electrophoresis, data not shown). The finding of a glycan moiety in the protein led us to another interesting property. After the gel filtration separation, the 30 kDa protein was strongly retained (>90%) on a glycoprotein affinity column, concanavalin A. This feature simplifies the purification of the protein to a few steps. Further experiments indicated that the 30 kDa protein was also retained at a lower level by lectin affinity columns (data not shown). The affinity data suggest that the glycan moiety is composed mainly of alpha-D-mannose and alpha-D-glucose.

**Importance of the 30 kDa protein as a human allergen.** The next query was to assess the allergenic importance of the 30 kDa protein with ragweed-sensitive patients. An allergen is qualified as being major if recognized immunologically by at least 50% of a minimum of 15 sensitive patients S.B. Lehrer, *et al.* (1966). In our case, we initially screened sera from 7 individuals who had a history of ragweed pollinosis (allergic rhinitis), positive prick skin tests to a mixture of giant, short, and Western ragweed pollen extracts and were positive in an approved in vitro (Pharmacia ImmunoCAP FEIA) test for IgE to giant ragweed (kU/l > 0.35). All seven sera showed IgE binding to the 30 kDa protein. To pursue our study, we blindly analyzed 35 additional sera from patients identified as being allergic to grass and possibly ragweed. Among them, 31 patient sera showed binding to the 30 kDa protein (identified with a “+” in **Figure 5A**). Fifteen of these patient sera had a positive ImmunoCAP to ragweed (kU/l > 0.35) and also showed IgE binding to the 30 kDa protein (identified with a circle and a “+” in **Figure 5A**). Hence, 22 patient sera positive to ragweed

WO 02/063012

PCT/US02/03346

by skin test and/or ImmunoCAP (7 from first group, 15 from grass group) showed IgE binding to the 30 kDa protein, qualifying it as a major allergen (**Figure 5A**). Of the remaining 20 grass allergic control sera, 16 identified with a “+” in Figure 3A showed IgE binding to the 30 kDa protein, some very faintly, but were negative on ImmunoCAP to ragweed. To investigate this point further, immunoblotting was performed against the first released protein fraction from complete pollen containing the 30 kDa protein and against a commercial counterpart. Twenty-two sera were strongly positive to several proteins in the complete pollen extract, whereas only 18 were positive to a commercial ragweed preparation (positive on ImmunoCAP testing). Immunoblots showing sera from 6 patients selected from the group positive to complete pollen extract are shown in Figure 5B. Interestingly, 4 of 22 patient sera (patient nos. 7, 9, 18 and 26) negative with the ImmunoCAP assay for giant ragweed showed IgE binding to the complete pollen extract and the 30 kDa allergen, but not to the commercial counterpart (no. 7 is shown in **Figure 5B**). Two patient sera (nos. 4 and 7) that were barely positive (0.37 kU/l) or negative on ImmunoCAP were negative when tested with the commercial extract, but were positive with the first released proteins of complete pollen as well as with the 30 kDa allergen (**Figure 5B**).

Briefly, of the 42 patient sera tested we found: 22 positive by the Pharmacia ImmunoCAP assay or skin tests, 29 positive to first released proteins of complete ragweed pollen extract, and 39 positive to the purified 30 kDa protein.

To summarize, the IgE immunoblots using sera from patients with a positive ImmunoCAP or positive skin tests to ragweed indicate that the 30 kDa protein is a major allergen. Furthermore, our study suggests that use of commercial defatted extracts may give false negatives. That is, we identified patients whose sera were positive to complete pollen extract, but were negative by the ImmunoCAP assay. Thus, there were at least 4 strong reactors to complete pollen extract (patient sera nos. 7, 9, 18 and 26) who failed to react with the ImmunoCap screen (**Figure 5B** for no. 7, other data not shown). Based on this finding, the ImmunoCap assay may miss about 18% of ragweed-sensitive patients (4 of the 22 patients whose sera IgE bound proteins in the complete pollen extract). However, this point would need to be correlated clinically by challenge testing in those negative by ImmunoCAP (defatted pollen is used in its preparation) but positive to complete pollen. In addition, we identified 16 out of the 20 grass allergic sera that were reactive to the 30 kDa protein (sera from patients nos. 1, 6, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 31 and 34) and were not

WO 02/063012

PCT/US02/03346

detected with the other tests. The clinical history in regard to ragweed sensitivity was not known for these patients.

The finding that 80%(16 of 20) of grass allergic patient sera (negative to ragweed by ImmunoCAP) showed binding to the 30 kDa protein raised the possibility that this protein cross-reacts with a counterpart protein in other allergen sources. To test this possibility, immunoblot inhibition was performed using two sera that strongly (nos. 2, 20) and two that weakly bound the 30 kDa protein (nos. 33, 35) from patients in the group of 35 grass allergic patients whose clinical and geographic history supported a diagnosis of ragweed pollinosis. **Figure 6A** (left panel) shows that while the control protein ovalbumin (O) was inactive and resembled the control treatment without added inhibitor (C). By contrast, treatment of sera with extracts from complete pollens of black walnut (W) and perennial ryegrass (R) partially or totally inhibited IgE binding to the 30 kDa protein. An additional 17 patient sera were screened for cross-reactivity between the 30 kDa protein and ryegrass pollen extract. In each case, ryegrass extract either partially or totally absorbed IgE directed to the 30 kDa protein (**Figure 6B** right panel). These results suggest that the 30 kDa protein from ragweed pollen cross reacts with a counterpart in other pollens (walnut and rye grass).

A comparative assessment of allergenicity using an ELISA protocol (38) with sera from 10 ragweed-sensitive patients (same as for **Figure 3C**), confirmed the immunoblot results in identifying the 30 kDa protein as an allergen (**Figure 7**). Moreover, the data indicated that the 30 kDa protein bound a higher percentage of human IgE from these patients than any of the known allergens tested (39,40) including Amb t 1, the allergen proposed to be the strongest in ragweed (t test, p = 0.02). The results provide further evidence that the 30 kDa protein is a major allergen in ragweed pollen.

A remaining question was whether the allergenicity of the 30 kDa protein could be detected *in vivo*. To this end, we tested the purified protein with an atopic dog colony Ermel, et al. (1997) sensitized to giant ragweed pollen and observed a hypersensitive response (41). We obtained positive results with 16 of the 19 animals tested (**Table 1**). The old dogs were more sensitive to the 30 kDa protein (by 10-fold) than their young counterparts. In addition, whereas the old dogs were uniformly sensitive to the new allergen, 20% of the young dogs were not. These results indicate that the low level of 30 kDa protein present in commercial preparations is sufficient to sensitize dogs if injected repeatedly over an extended period.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

This observation also supports the conclusion that the defatted commercial extract is deficient in major allergens.

Table 1: Average of minimum amount of 30 kDa protein from complete ragweed pollen producing a wheal.

Old Dogs, n =5*	1 ng
Young Dogs, n=14**	10 ng

\* 5 dogs positive

\*\*11 dogs positive

The next question was to determine whether the 30 kDa protein had been described. We therefore obtained partial amino acid sequences by mass spectrometry. The results indicated that aside from marginal similarity to envelop glycoproteins, the 30 kDa protein had not been previously described from pollen or other sources.

- Amino acid sequence of tryptic peptidase
1. L/I L/I SGISINTVYANPK (SEQ ID NO: 1)
  2. PTSFN L/I ATK (SEQ ID NO: 2)
  3. L/I YGLVQFN (SEQ ID NO: 3)
  4. FY L/I FSTK (SEQ ID NO: 4)
  5. FYATEV L/I D L/I D\*(SEQ ID NO: 5)
  6. LLDNLHQQTQPDGFG (SEQ ID NO: 6)
  7. MYATEVLDLDGSK (SEQ ID NO: 7)
  8. YSDGNFFGAGLDHQ (SEQ ID NO: 8)
  9. LLNNMR (SEQ ID NO: 9)
  10. VEASAELR (SEQ ID NO: 10)
  11. LLSGLSDTV (SEQ ID NO:11)

\* Homology with envelope glycoproteins

We have developed a simple procedure to extract allergens associated with the extracellular lipid layer of pollen. The procedure has yielded a major new allergen, a 30 kDa protein, that is released from complete ragweed pollen within minutes and is discarded in the

WO 02/063012

PCT/US02/03346

commercial defatting process. The protein is glycosylated, has a molecular mass of 30 kDa, is water soluble and has at least one disulfide bond. Sequence data are forthcoming. The finding of the 30 kDa protein, as well as other uncharacterized allergens among proteins released in minutes from ragweed pollen grains, suggests that these allergens are in close association with the appearance of the first allergic symptoms to pollen. We propose to name the new allergen Amb t 7 (submitted to the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee).

The data at hand indicate that up to 18% of patients sensitive to ragweed pollen by IgE immunoblotting are not diagnosed owing to deficiency of the Amb t 7 protein and possibly other allergens in current clinical preparations used for skin testing and in vitro specific IgE assays. Allergists encounter occasional patients who show typical seasonal variation in allergic rhinitis symptoms, but who are negative on prick skin testing to the usual allergen panels. Recognition that aqueous extracts from complete pollen contain an allergen such as the 30 kDa protein may be useful in producing improved formulas for diagnosing these patients and for immunotherapy. Skin test studies may be utilized to compare patients having known ragweed allergy with immunotolerant counterparts in order to correlate reactivity of Amb t 7 with the classical ragweed allergy syndrome.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

We claim:

1. An isolated protein comprising an amino acid sequence wherein said amino acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.
2. A pharmaceutical composition comprising the protein of claim 1.
3. A diagnostic composition for detecting pollen allergy comprising the protein of claim 1.
4. The diagnostic composition of claim 3 wherein said pollen is ragweed pollen.
5. A method of treating pollen allergy in a mammal comprising administering a pharmaceutically effective amount of the protein of claim 1 to said mammal.
6. The method of claim 5 wherein said pollen is ragweed pollen.
7. The method of claim 5 wherein said mammal is a human.
8. A method of treating sensitivity to pollen in a mammal sensitive to pollen comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of the protein of claim 1.
9. The method of claim 8 wherein wherein said pollen is ragweed pollen.
10. The method of claim 8 wherein said mammal is a human.
11. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence wherein said amino acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.
12. An expression vector comprising a nucleic acid of claim 11.
13. A host cell comprising an expression vector of claim 11.
14. An isolated pollen allergen substantially free of any other pollen proteins characterized by the following physiochemical and biological properties: a) being contained

WO 02/063012

PCT/US02/03346

in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity.

15. The allergen of claim 14 wherein said pollen is ragweed pollen.
16. A pharmaceutical composition comprising the allergen of claim 14.
17. A diagnostic composition for detecting allergic diseases which comprises as the active ingredient a diagnostically effective amount of the allergen of claim 14.
18. The diagnostic composition of claim 17 wherein said allergen is ragweed pollen.
19. A method of treating pollen allergy in a mammal comprising administering a pharmaceutically effective amount of the allergen of claim 14 to said mammal.
20. The method of claim 19 wherein said mammal is a human.
21. The method of claim 19 wherein said pollen allergy is ragweed pollen allergy.
22. A therapeutic composition comprising an antigenic fragment of a ragweed pollen allergen Ambt 7 wherein said antigenic fragment comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11 wherein said antigenic fragment comprises at least one epitope of said pollen allergen and a pharmaceutically effective carrier.
23. The therapeutic composition of claim 22 wherein said epitope is a T cell epitope.
24. The therapeutic composition of claim 22 wherein said epitope is a B cell epitope.
25. A method of treating pollen sensitivity in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of the therapeutic composition of claim 22 to a mammal.
26. The method of claim 25 wherein said mammal is a human.
27. The method of claim 25 wherein said pollen sensitivity is ragweed pollen sensitivity.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

28. A therapeutic composition comprising an Ambt7 pollen allergen which is a polymorphic variant of a ragweed Ambt7 pollen allergen wherein said polymorphic variant comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11 and a pharmaceutically acceptable carrier.

29. A method of treating pollen sensitivity in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of the therapeutic composition of claim 28 to a mammal.

30. The method of claim 29 wherein said mammal is a human.

31. The method of claim 29 wherein said pollen sensitivity is ragweed pollen sensitivity.

32. A kit for detecting Ambt7 pollen allergen comprising one or more proteins wherein said one or more proteins comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.

33. The kit of claim 32 further including protein detection components.

34. The kit of claim 32 wherein said protein detection components include antibodies.

35. The kit of claim 32 further including directions for use of the kit.

36. A method of purifying a pollen allergen, comprising:

- a) suspending said pollen in a liquid to form a pollen solution;
- b) centrifuging said pollen solution to produce a pollen protein supernatant;
- c) precipitating said protein in said pollen protein supernatant to form a protein precipitate;
- d) resuspending said protein precipitate in a protein precipitate buffer to form a resuspended protein mixture;
- e) extracting said resuspended protein mixture in organic solvent to form an aqueous phase and an organic phase; and

WO 02/063012

PCT/US02/03346

- f) purifying said pollen allergen from said aqueous phase.
37. The method of claim 36 wherein protein in said pollen solution is precipitated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
38. The method of claim 36 wherein said organic solvent is petroleum ether.
39. The method of claim 36 wherein said pollen allergen is purified from said aqueous phase by chromatography or electrophoresis procedures.
40. The method of claim 39 wherein said chromatography procedure is gel filtration or affinity chromatography.
41. An isolated antibody that binds specifically to a protein comprising an amino acid sequence wherein said amino acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:11.
42. The antibody of claim 41 wherein said antibody is a polyclonal antibody.
43. The antibody of claim 41 wherein said antibody is a monoclonal antibody.
44. An isolated antibody that binds specifically to a pollen allergen substantially free of any other pollen proteins wherein said pollen allergen is characterized by the following physiochemical and biological properties: a) being contained in pollen extracts, b) a glycoprotein, c) a sulfhydryl group containing protein, d) a molecular weight about 30,000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and e) possessing allergen activity.
45. The antibody of claim 44 wherein said antibody is a polyclonal antibody.
46. The antibody of claim 44 wherein said antibody is a monoclonal antibody.

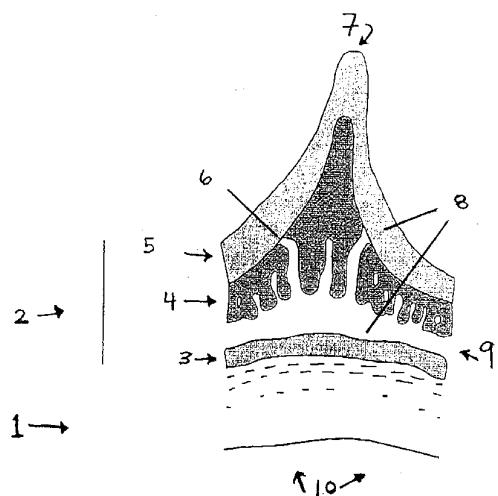


Figure 1.

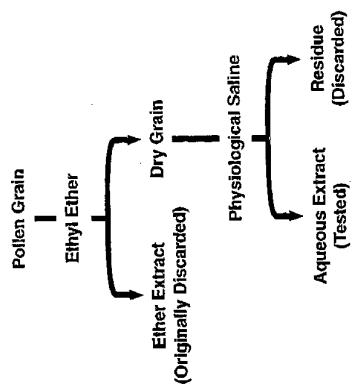


Figure 2a.

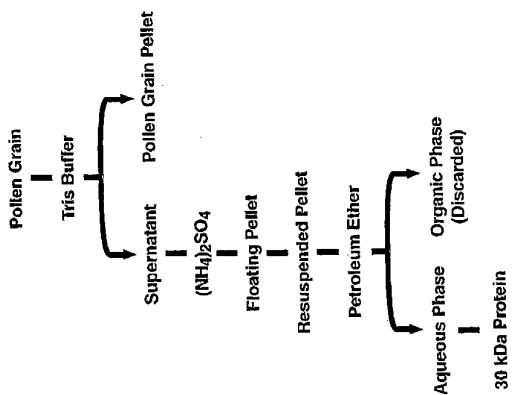


Figure 2 b.

WO 02/063012

PCT/US02/03346

4/7

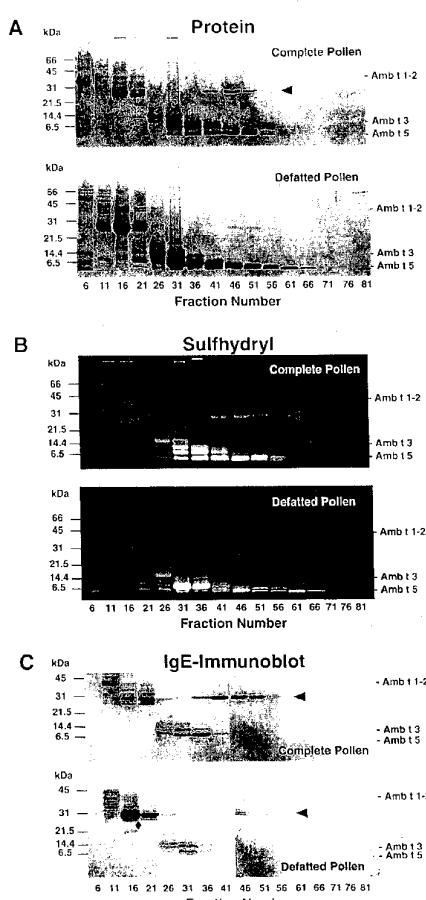


Figure 3

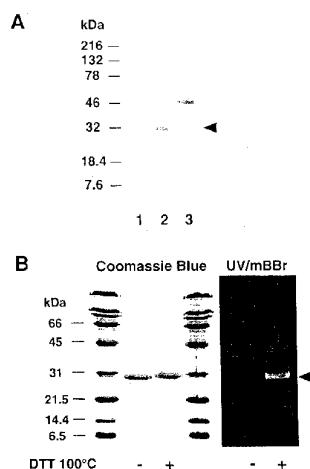


Figure 4

WO 02/063012

PCT/US02/03346

6/7

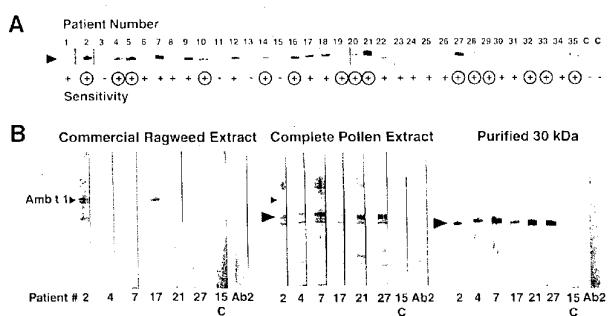


Figure 5

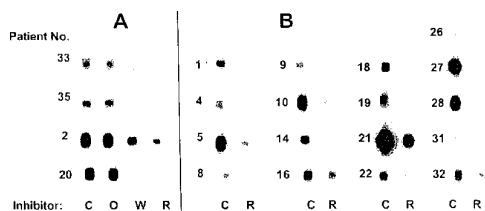


Figure 6

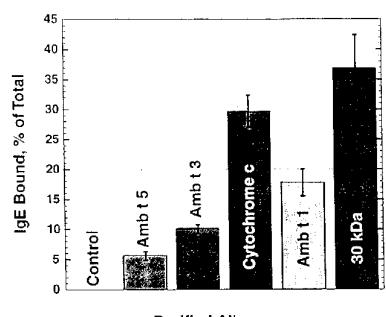


Figure 7

WO 02/063012

PCT/US02/03346

## SEQUENCE LISTING

<110> Buchanan, Bob B.  
      del Val, Gregorio  
      Frick, Oscar L.  
      Regents of the University of California

<120> RAGWEED ALLERGENS

<130> 416272000240

<150> US 60/266,686

<151> 2001-02-05

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<220>

<221> VARIANT  
<222> 1,2  
<223> Xaa = Leucine or Isoleucine

<400> 1  
Xaa Xaa Ser Gly Ile Ser Asn Thr Val Tyr Ala Asn Pro Lys  
1                  5                         10

<210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<220>

<221> VARIANT  
<222> 6  
<223> Xaa= Leucine or Isoleucine

<400> 2  
Pro Thr Ser Phe Asn Xaa Ala Thr Lys  
1                  5

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<220>

<221> VARIANT  
<222> 1  
<223> Xaa= Leucine or Isoleucine

WO 02/063012

PCT/US02/03346

<400> 3  
Xaa Tyr Gly Leu Val Gln Phe Asn Arg  
1 5  
  
<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Ragweed  
  
<220>  
  
<221> VARIANT  
<222> 3  
<223> Xaa= Leucine or Isoleucine  
  
<400> 4  
Phe Tyr Xaa Phe Ser Thr Lys  
1 5  
  
<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Ragweed  
  
<220>  
  
<221> VARIANT  
<222> 7,9  
<223> Xaa= Leucine or Isoleucine  
  
<400> 5  
Phe Tyr Ala Thr Glu Val Xaa Asp Xaa Asp  
1 5 10  
  
<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Ragweed  
  
<400> 6  
Leu Leu Asp Asn Leu His Gln Gln Thr Pro Pro Asp Gly Phe Gly Arg  
1 5 10 15  
  
<210> 7  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Ragweed  
  
<400> 7  
Met Tyr Ala Thr Glu Val Leu Asp Leu Asp Gly Ser Lys  
1 5 10  
  
<210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Ragweed  
  
<400> 8  
Tyr Ser Asp Gly Asn Phe Phe Gly Ala Gly Leu Asp His Gln  
1 5 10

WO 02/063012

PCT/US02/03346

<210> 9  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<400> 9  
Leu Leu Asn Asn Met Arg  
1 5

<210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<400> 10  
Val Glu Ala Ser Ala Glu Leu Arg  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Ragweed

<400> 11  
Leu Leu Ser Gly Leu Ser Asp Thr Val  
1 5

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/063012 A3(51) International Patent Classification<sup>1</sup>: C12N 15/29, C07K 14/415, 16/16, A61K 39/36(72) Inventors and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): BUCHANAN, Bob, B, [US/US]; 19 Tamalpais Road, Berkeley, CA 94708 (US); DEL VAL, Gregorio [CH/US], 5727 Birlanger Street, San Diego, CA 92122 (US); FRICK, Oscar, L, [US/US], 370 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94117 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/03346

(74) Agents: WARD, Michael, R, et al.; Morrison &amp; Foerster

(22) International Filing Date: 4 February 2002 (04.02.2002)

I.I.P., 425 Market Street, San Francisco, CA 94105-2482 (US).

(25) Filing Language: English

(76) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

(26) Publication Language: English

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(30) Priority Data: 60/266,686 5 February 2001 (05.02.2001) US

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EL, ES, H, GB, GD, GE, GH,

(71) Applicant (for all designated States except US): THE

GM, HR, HU, ID, H, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L, C,

REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
[US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA

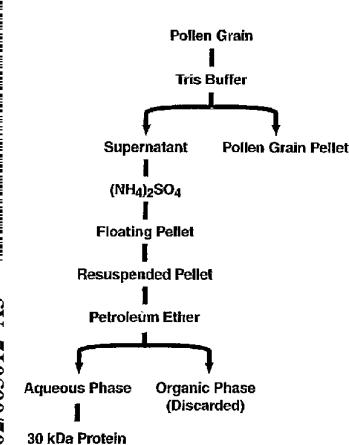
TK, L, S, IT, LU, LV, MA, MD, MG, MR, MN, MW,

94607-5200 (US).

MX, MZ, NO, NZ, OM, PT, PI, RO, RU, SD, SE, SG,

*[Continued on next page]*

(54) Title: RAGWEED ALLERGENS



(57) **Abstract:** A 30 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein allergen has been purified from ragweed pollen. IgE immunoblots with sera of ragweed sensitive patients indicated that the 30 kDa protein is a major allergen. The 30 kDa protein finds use in allergy testing and immunotherapy regimens. In addition to the 30 kDa disulfide protein isolated from complete ragweed pollen, an 8-10 kDa ragweed complete pollen extract disulfide protein and a 30 kDa ragweed defatted pollen extract disulfide protein and fragments, derivatives and homologues thereof are described.

WO 02/063012 A3

WO 02/063012 A3



(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(88) **Date of publication of the international search report:**  
13 March 2003

*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.*

**Published:**  
— with international search report

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/03346
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/29 C07K14/15 C07K16/16 A61K39/36		
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) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of database and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEL VAL GREG ET AL: "A major new allergen from ragweed pollen." JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 107, no. 2, February 2001 (2001-02), page S318 XP009002383 57th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology-New Orleans, Louisiana, USA; March 16-21, 2001 ISSN: 0891-6749 the whole document --	1-46 --
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may further doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim 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>*X* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but which is considered the principle or theory underlying the invention</p> <p>*Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*YY* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken together with one or more other prior art documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*A* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 9 December 2002	Date of mailing of the international search report 20/12/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5518 Patentlan 2 NL-2233 AH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 esp nl Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Dumont, E	

Form PCT/ISA210 (second edition) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No
		PCT/US 02/03346
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOUNT DAVID B ET AL: "Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 23, 4 June 1999 (1999-06-04), pages 16355-16362, XP002224013 ISSN: 0021-9258 mKCC3 protein sequence figure 2	1,11-13, 41-43
X	WO 00 44781 A (UNIV CALIFORNIA) 3 August 2000 (2000-08-03) page 145, line 15 - line 18; figure 15	14-21, 44-46
X	DEL VAL G ET AL: "Reevaluation of the allergenicity of proteins from the lipid-soluble fraction of ragweed pollen." JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY., vol. 105, no. 1 part 2, January 2000 (2000-01), page S332 XP009002382 56th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.; San Diego, California, USA; March 03-08, 2000 ISSN: 0091-6749 the whole document	36-40
X	US 3 148 122 A (STRAUSS MARGARET B) 8 September 1964 (1964-09-08) column 1, line 33 -column 2, line 10; claims 1-15	36-40
X	US 5 384 395 A (BERRENS LUBERTUS) 24 January 1995 (1995-01-24) column 9, line 23 - line 28 column 11, line 46 -column 12, line 14; example IV	36-40
A	BROWN H M ET AL: "Rapid extraction of grass pollen allergens and separation of their active fractions." ACTA ALLERGOLOGICA. DENMARK FEB 1976, vol. 31, no. 1, February 1976 (1976-02), pages 22-34, XP009002542 ISSN: 0001-5148 the whole document	1-46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) July 1992

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 02/03346
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: _____ because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</li> <li>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: _____ because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</li> <li>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).</li> </ol>		
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p> </p> <p> </p> <p> </p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</li> <li>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.</li> <li>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.: _____</li> <li>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.: _____</li> </ol>		
<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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (\*)) (July 1996)

International Application No. PCT/US 02/03346

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claims 5-10, 19-21, 25-27 and 29-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.

## Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## Continuation of Box I.2

Present claims 14, 16, 17, 19, 20, 44-46 relate to an extremely large number of possible compounds, or to methods involving such compounds. 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 compounds claimed. 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 carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to a pollen allergen from ragweed having the claimed properties and to antibodies binding such a ragweed allergen.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. 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.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/US 02/03346

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044781	A 03-08-2000	AU 2738300 A CN 1350547 T EP 1147131 A1 WO 0044781 A1 US 2002098277 A1	18-08-2000 22-05-2002 24-10-2001 03-08-2000 25-07-2002
US 3148122	A 08-09-1964	NONE	
US 5384395	A 24-01-1995	NL 8900652 A AT 127348 T DE 69022086 D1 EP 0387952 A1 GR 3018280 T3 DE 69022086 T2 DK 387952 T3 ES 2077011 T3	16-10-1990 15-09-1995 12-10-1995 19-09-1990 31-03-1996 15-02-1996 23-10-1995 16-11-1995

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## 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)
C 0 7 K 14/415	C 0 7 K 14/415	
C 0 7 K 16/16	C 0 7 K 16/16	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	Q
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(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,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,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 ブカナン, ボブ, ビー.

アメリカ合衆国 9 4 7 0 8 カリフォルニア州, バーカリー, タマルパイス ロード 19

(72)発明者 デル ヴァル, グレゴリオ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州, サンディエゴ, アーランガー ストリート 5  
7 2 7

(72)発明者 フリック, オスカー, エル.

アメリカ合衆国 9 4 1 1 7 カリフォルニア州, サンフランシスコ, パルナッサス アヴェニュ  
- 3 7 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 GA11  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA26X AA72X AA88Y AA90X BA02 CA26 CA44 CA46  
4C085 AA13 AA14 BB04 CC21 EE01 EE06 FF24 GG01 GG08  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA53 CA30 DA75 DA76 EA20 EA50 GA06  
GA26 GA30 HA05 HA32