

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 30 日(30.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/017599 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/070219
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 25 日(25.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-166053 2012 年 7 月 26 日(26.07.2012) JP
- (71) 出願人: 大鵬薬品工業株式会社(TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018444 東京都千代田区神田錦町 1-2-7 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 原田 崇史(HARADA, Takafumi); 〒3002611 茨城県つくば市大久保 3 番地 大鵬薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 長田 年弘(OSADA, Toshihiro); 〒3002611 茨城県つくば市大久保 3 番地 大鵬薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: NOVEL T CELL EPITOPE PEPTIDE OF JAPANESE CYPRESS POLLEN ALLERGEN

(54) 発明の名称: 新規ヒノキ花粉アレルゲンの T 細胞エピトープペプチド

(57) Abstract: Provided is a novel T cell epitope peptide of Japanese cypress pollen allergen different from known Japanese cypress pollen allergens. A peptide selected from the group consisting of amino acid sequences shown by SEQ ID NO. 3-16, or a peptide having 1-3 amino acids substituted and/or 1-10 amino acids deleted or added in this peptide, the peptide having T cell stimulatory activity.

(57) 要約: 既知のヒノキ花粉アレルゲンとは異なる新規なヒノキ花粉アレルゲンの T 細胞エピトープペプチドの提供。配列番号 3~16 で示されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるペプチド、又は当該ペプチドにおいて 1~3 個のアミノ酸が置換及び/又は 1~10 個のアミノ酸が欠失若しくは付加したペプチドであって、且つ T 細胞刺激活性を有するペプチド。



WO 2014/017599 A1

明 細 書

発明の名称：

新規ヒノキ花粉アレルゲンのT細胞エピトープペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ヒノキ花粉に由来する新規なアレルゲンタンパク質のT細胞エピトープペプチド、及び当該ペプチドを有効成分とする、ヒノキ花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物に関する。

背景技術

[0002] ヒノキ花粉の飛散量は昭和40年代にはわずかであったが、その後の20年ほどの間に3倍以上に増えた。スギの植林は昭和20年代に集中的に行われ、昭和40年代後半には花粉を飛ばし始める壮年期を迎えた。ヒノキはスギ植林の後の昭和30年代に集中的に植林され、スギに遅れて壮年期を迎えたところである。近年の比較では、ヒノキの植生数がスギの植生数に匹敵しつつあり、今後はヒノキ花粉症が増えてくるものと予想されることから、ヒノキ花粉特有の抗原を用いた免疫療法の必要性が指摘されている。

[0003] 免疫療法の大きな問題点はアナフィラキシー反応である。アナフィラキシー反応は抗原特異的IgE抗体と抗原がマスト細胞上で結合することにより放出されるケミカルメディエーターによって引き起こされる。T細胞エピトープを用いたペプチド免疫療法は、IgE抗体に結合する部分を含まず、免疫寛容に関わるT細胞エピトープを有効成分とする免疫療法であり、いままでにネコ、ダニ、スギ花粉、ブタクサ花粉などの抗原から同定されたT細胞エピトープを用いたペプチド免疫療法剤が臨床応用されてきた（非特許文献1及び2）。また、ヒノキ花粉に関しても、主要抗原であるCha o1とCha o2について、T細胞エピトープペプチドが同定されている（特許文献1、非特許文献3及び4）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2008-195718号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Valenta R. et al., Annu. Rev. Immunol., 2010:211-241, 2010

非特許文献2：Casale T. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 127:8-15, 2011

非特許文献3：Sone, T. et al., Clin. Exp. Allergy, 35:664-671, 2005

非特許文献4：Sone, T. et al., Allergol. Int., 58:237-245, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、今後増加すると考えられるヒノキ花粉症に対する免疫療法の有効性向上に貢献すべく、既知のヒノキ花粉アレルゲンとは異なる新規なヒノキ花粉アレルゲンのT細胞エピトープペプチドを提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、ヒノキ花粉の中に多量に存在し、Cha_{o1}やCha_{o2}と同等以上のアレルゲン活性を有する新規ヒノキ花粉アレルゲンを見出し、既に特許出願を行った（PCT/JP2012/052110）。そして、更にスギ花粉症のヒノキ花粉感作症例より、当該ヒノキ花粉アレルゲンに特異的なT細胞ラインを個別に樹立し、その中から主要なT細胞エピトープを決定し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下の1)～4)に係るものである。

1) 配列番号3～16で示されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるペプチド、又は当該ペプチドにおいて1～3個のアミノ酸が置換及び／又は1～10個のアミノ酸が欠失若しくは付加したペプチドであって、且つT細胞刺激活性を有するペプチド。

2) 1～10個のアミノ酸が欠失したペプチドが、当該ペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失したものである、上記1)のペプチ

ド。

3) 配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「F K E K I V Y E G H W」を有するペプチド、配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「P Y Y Q I I Y H P A S」を有するペプチド、又は配列番号15で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「F K V I T T N K Q」を有するペプチドである、上記2)のペプチド。

4) 上記1)～3)のいずれかに記載されたペプチドの1種又は2種以上を有効成分として含有する、ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤。

5) ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤を製造するための、上記1～3のペプチドの1種又は2種以上の使用。

6) ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法に使用するための、上記1～3のペプチドの1種又は2種以上。

7) 上記1～3のペプチドの1種又は2種以上を投与するヒノキ花粉症のペプチド免疫療法。

発明の効果

[0008] 本発明のペプチド群は、単独で又は複数組み合わせることによりヒノキ花粉症に対する免疫療法剤として有用である。さらに、既知のヒノキ花粉アレルゲンであるC h a o 1やC h a o 2のT細胞エピトープペプチドと組み合わせることによって、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法で効果が不十分であったヒノキ花粉感作症例に対して、有用なペプチド免疫療法が可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]各オーバーラップペプチドのT細胞刺激活性を示す。

[図2]本発明ペプチドのヒノキ花粉特異的I g Eとの結合能を示す。

[図3]短縮ペプチド（ペプチド番号：# 5 2）のT細胞刺激活性を示す。

[図4]短縮ペプチド（ペプチド番号：＃２４）のＴ細胞刺激活性を示す。

[図5]短縮ペプチド（ペプチド番号：＃３８）のＴ細胞刺激活性を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書中のアミノ酸配列は、１文字表記で記載している。

本発明の配列番号３～１６で示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、配列番号１で示されるアミノ酸配列からなるヒノキ花粉アレルゲンタンパク質、又はそのアイソフォーム（配列番号１で示されるアミノ酸配列において、２番目のＰｒｏがＴｈｒに、２３０番目のＶａｌがＩｌｅに、２７１番目のＶａｌがＩｌｅにそれぞれ置換）である配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の一次構造よりシグナルペプチドであるＮ末端から２８アミノ酸を除いた、Ｎ末端ＬｅｕよりＣ末端Ｌｅｕに至る全５２８アミノ酸からなるタンパク質の、２０アミノ酸残基（一部１８アミノ酸残基）からなる部分ペプチドである。本発明の各ペプチドの配列番号１又は２で示されるアミノ酸配列上の位置は、後記表１～３に示すとおりであり、すなわち、配列番号３（ペプチド番号：＃１２）：配列番号１の１１１～１３０番目、配列番号４（ペプチド番号：＃１３）：配列番号１の１２１～１４０番目、配列番号５（ペプチド番号：＃２０）：配列番号１の１９１～２１０番目、配列番号６（ペプチド番号：＃２１）：配列番号１の２０１～２２０番目、配列番号７（ペプチド番号：＃２４）：配列番号１の２３１～２５０番目、配列番号８（ペプチド番号：＃３１）：配列番号１の３０１～３２０番目、配列番号９（ペプチド番号：＃３７）：配列番号１の３６１～３８０番目、配列番号１０（ペプチド番号：＃３８）：配列番号１の３７１～３９０番目、配列番号１１（ペプチド番号：＃３９）：配列番号１の３８１～４００番目、配列番号１２（ペプチド番号：＃４１）：配列番号１の４０１～４２０番目、配列番号１３（ペプチド番号：＃４２）：配列番号１の４１１～４３０番目、配列番号１４（ペプチド番号：＃４９）：配列番号１の４８１～５００番目、配列番号１５（ペプチド番号：＃５２）：配列番号１の５１１～

528番目、配列番号16（ペプチド番号：#56）：配列番号2の261～280番目である。

[0011] 本発明の上記ペプチドは、スギ花粉症のヒノキ花粉感作症例より、当該配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるヒノキ花粉アレルゲンタンパク質に特異的なT細胞ラインを個別に樹立し、当該タンパク質又はそのアイソフォームの一次構造の全域をカバーする20残基からなる57種類のオーバーラップペプチドに対する増殖活性を評価することにより、T細胞エピトープとして同定されたものである（実施例2～4参照）。したがって、本発明のペプチドには少なくとも一つのT細胞エピトープが存在し、本発明のペプチドはT細胞刺激活性を有するものである。

ここで、T細胞刺激活性とは、T細胞増殖又はリンホカイン分泌等のT細胞応答を誘導する活性をいい、ヒトや動物に投与することによってT細胞の免疫寛容を誘導し得る作用を意味する。ここで、T細胞刺激活性は、例えば、細胞内への $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを測定し、刺激係数を算出することにより決定できる。ここで用いるT細胞応答の刺激係数（S. I. 値）は、ペプチド存在下で細胞内へ取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの放射能のc p mを、ペプチド非存在下（対照）のc p mで除したものとして計算する。本発明のペプチドは、平均S. I. 値が2.0以上のものである。

このうち、あるペプチドの平均S. I. 値に、当該ペプチドにT細胞応答を示す患者の出現頻度（%）を乗じた「重要度指数」が、少なくとも70以上のものが好ましく、斯かるペプチドとしては、配列番号4（ペプチド番号：#13）、配列番号5（ペプチド番号：#20）、配列番号7（ペプチド番号：#24）、配列番号8（ペプチド番号：#31）、配列番号10（ペプチド番号：#38）、配列番号11（ペプチド番号：#39）、配列番号12（ペプチド番号：#41）及び配列番号15（ペプチド番号：#52）で示されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。斯かるペプチドは、スギ花粉やヒノキ花粉のアレルゲンに特異的なIgE抗体に結合せずアナフィラキシーを引き起こすことがないことから、ヒノキ花粉アレルゲンに特

異的なT細胞に対して免疫寛容を誘導することができる免疫療法剤として特に好適である。

[0012] また、本発明においては、上記配列番号3～16で示されるアミノ酸配列からなるペプチドの他に、当該ペプチドにおいて1～3個のアミノ酸が置換及び／又は1～10個のアミノ酸が欠失若しくは付加したペプチドであって、且つT細胞刺激活性を有するペプチドが包含される。

ここで、1～10個のアミノ酸が欠失したペプチドとしては、例えばN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失したペプチドが包含され、例えばN末端側のアミノ酸0～10残基、C末端側のアミノ酸0～10残基、合計で1～10個のアミノ酸を欠失したものが挙げられる。

具体的には、例えば、配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド(#24)の場合、N末端側のアミノ酸1～3残基及び／又はC末端側のアミノ酸1～6残基が欠失し、少なくとも「FKEKIVYEGHW」を有するペプチド、配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるペプチド(#38)の場合、N末端側のアミノ酸6～8残基及び／又はC末端側のアミノ酸1残基が欠失し、少なくとも「PYYQIIYHPAS」を有するペプチド、配列番号15で示されるアミノ酸配列からなるペプチド(#52)の場合、N末端側のアミノ酸1～2残基及び／又はC末端側のアミノ酸1～7残基が欠失し、少なくとも「FKVITTNKQ」を有するペプチドが挙げられる。

[0013] また、1～10個のアミノ酸が付加したペプチドとしては、N末端側及び／又はC末端側に1～10のアミノ酸が付加されたペプチドが包含され、この場合、付加されるアミノ酸残基としては、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列において、当該ペプチドに対応するアミノ酸配列のN末端側又はC末端側に隣接する1～10個のアミノ酸残基が挙げられる。

また、ここで「T細胞刺激活性を有する」とは、配列番号3～16で示されるアミノ酸配列からなるペプチドと同等以上のT細胞刺激活性を有することを意味する。尚、T細胞刺激活性の意味は上述したとおりである。

[0014] 本発明のT細胞エピトープペプチドは、一般的なペプチドの合成に用いられている固相合成、液相合成、或いはこれらを組み合わせたペプチド合成法によって合成できる。また、本発明のT細胞エピトープペプチドを組換えDNA技術で合成する場合は、当該ペプチドをコードする配列を有する核酸で形質転換した宿主細胞をその細胞に適した培地で培養し、その培養上清から又は宿主細胞から当該ペプチドを当業者に公知の技術を用いて合成することができる。宿主としては、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞等を用いることができる。

[0015] 本発明のT細胞エピトープペプチドは、ヒトに投与したとき、好ましくはヒノキ花粉アレルゲンに感作されている個人に投与したとき、その個人のアレルゲンに対するアレルギー応答を調節することができるので、ペプチド免疫療法に有用である。さらに、他のヒノキ花粉アレルゲンであるCha 1やCha 2のT細胞エピトープペプチドに加え、スギ花粉アレルゲンであるCry j 1やCry j 2のT細胞エピトープペプチド（特開平7-118295号公報、特開平8-47392号公報、Sone, T. et al., J. Immunol., 161:448-457, 1998）と組み合わせて用いることで、スギ・ヒノキに代表される春季樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用である。

[0016] 本発明のヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤は、注射（皮下、静脈注射等）、点眼、点鼻、経口、吸入、経皮など、通常の投与経路で投与することができ、投与形態に合わせて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ、舌下錠、シロップ剤、注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤、鼻腔内噴霧剤、湿布剤、パップ剤、軟膏、ローション、クリーム等の各種剤形の製剤として調製され得る。

この場合、本発明のT細胞エピトープペプチドをそのまま、或いは乾燥して粉末状とし、希釈剤、添加剤等の担体、例えば安定剤、賦形剤、溶解補助剤、乳濁化剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤、着色剤等を常法により添加した配合剤として調製されるのが好ましい。

[0017] 本発明のヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤の投与量は、例えば、注射による場合、本発明のペプチドを1投与量単位当たり約1 μ g~30mg、好ましくは20 μ g~10mgとすることができる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例

[0018] 実施例1 ヒノキ花粉アレルゲンタンパク質の精製

ヒノキ花粉50g花粉に抽出緩衝液(25mM Tris緩衝液、pH8.0)1000mlを加え、10分間攪拌後、15分間超音波処理した。得られた懸濁液を遠心分離(3,000rpm、15分)して上清を得、これをフィルトレーションすることで抽出液を得た。この抽出液を10mM Tris緩衝液(pH8.0)で平衡化させたDE52陰イオン交換カラムに添加し、非吸着画分を集めた。続いて20mM酢酸緩衝液(pH5.2)で平衡化させたCM52陽イオン交換カラムに吸着させ、NaCl含10mM Tris緩衝液(pH7.8)でグラジエント溶出したものをフラクションに分割して回収した。各フラクションの一部をSDS-PAGEにより解析し、分子量66kDa付近のタンパク質を含むフラクションを合一した。

[0019] 実施例2 オーバーラップペプチドの合成

オーバーラップペプチドは、PepTrack Peptide Libraryサービス(JPT Peptide Technologies)にて委託合成した。実施例1で得られたヒノキ花粉アレルゲンタンパク質(以下、「Protein X」と称する)(配列番号1)の一次構造を基にして、N末端1番目のLeuから始まり、C末端のLeuまで、10残基のオーバーラップ部分を含む20残基のオーバーラップペプチド(#52(配列番号52)は18残基)52種類(#1~#52)を合成した(表1~2)。なお、本タンパク質のアイソフォームとして、配列番号1で示されるアミノ酸配列において、2番目のProがThrに、230番目のValがIleに、271番目のValがIleに、それぞれ置換したタンパク質が存在し(配列番号2)、これらについても同様にオーバー

ラップペプチド5種類（#53～#57）を作製した（表3）。

[0020] [表1]

ペプチド 番号	配列番号1の アミノ酸番号	アミノ酸配列	配列番号
#1	(1-20)	LPLLTRGRWIVDEATGLRVK	配列番号17
#2	(11-30)	VDEATGLRVKLACVNWVGH	配列番号18
#3	(21-40)	LACVNWVGHLEPGLPEGLNR	配列番号19
#4	(31-50)	EPGLPEGLNRLPVATVAHTI	配列番号20
#5	(41-60)	LPVATVAHTISSLGFCVRL	配列番号21
#6	(51-70)	SSLGFCVRLTYSIHMLTRT	配列番号22
#7	(61-80)	TYSIHMLTRTSYTNATVAQT	配列番号23
#8	(71-90)	SYTNATVAQTFARLNLTEAA	配列番号24
#9	(81-100)	FARLNLTEAASGIEHNNPEL	配列番号25
#10	(91-110)	SGIEHNNPELLDLGHVAAHY	配列番号26
#11	(101-120)	LDLGHVAAHYHVVAALSEAG	配列番号27
#12	(111-130)	HVVAALSEAGVMVILDNHVS	配列番号3
#13	(121-140)	VMVILDNHVS KPWCCAVDD	配列番号4
#14	(131-150)	KPWCCAVDDGNGFFGDRYF	配列番号28
#15	(141-160)	GNGFFGDRYFNPNTWVEGLG	配列番号29
#16	(151-170)	NPNTWVEGLGLMATYFNNT	配列番号30
#17	(161-180)	LMATYFNNTPNVAMSLRNE	配列番号31
#18	(171-190)	NVAMSLRNELRGNRSTPIS	配列番号32
#19	(181-200)	LRGNRSTPISWSRHMWGAA	配列番号33
#20	(191-210)	WSRHMWGAA TVHKANPKVL	配列番号5
#21	(201-220)	TVHKANPKVLVILSGLQFDT	配列番号6
#22	(211-230)	VILSGLQFDTDL SFLPVL	配列番号34
#23	(221-240)	DL SFLPVLPTLPFKEKIVY	配列番号35
#24	(231-250)	TLPFKEKIVYEGHWYSFGVP	配列番号7
#25	(241-260)	EGHWYSFGVPWRTGLPNDVC	配列番号36
#26	(251-270)	WRTGLPNDVCKNETGRFKSN	配列番号37
#27	(261-280)	KNETGRFKSNVGFVTSSANA	配列番号38
#28	(271-290)	VGFVTSSANATAAPLFMSEF	配列番号39
#29	(281-300)	TAAPLFMSEFGIDQRYVNDN	配列番号40
#30	(291-310)	GIDQRYVNDNDRYLNCILA	配列番号41
#31	(301-320)	DRYLNCILAYLA EEDLDWA	配列番号8
#32	(311-330)	YLA EEDLDWALW TMGGSYYY	配列番号42
#33	(321-340)	LW TMGGSYYYRSDKQPVKDF	配列番号43
#34	(331-350)	RSDKQPVKDFEETYGFNHD	配列番号44

[0021]

[表2]

ペプチド 番号	配列番号 1 の アミノ酸番号	アミノ酸配列	配列番号
#35	(341-360)	EETYGFFNHDWSRIRNPDI	配列番号 4 5
#36	(351-370)	WSRIRNPDI SRLKEIQQPI	配列番号 4 6
#37	(361-380)	SRLKEIQQPIQDPYLAPGPY	配列番号 9
#38	(371-390)	QDPYLAPGPYYQIIYHPASG	配列番号 1 0
#39	(381-400)	YQIIYHPASGLCVESGIGNT	配列番号 1 1
#40	(391-410)	LCVESGIGNTVHLGSCQSVR	配列番号 4 7
#41	(401-420)	VHLGSCQSVRSRWNYDASVK	配列番号 1 2
#42	(411-430)	SRWNYDASVKGPIGLMGSSS	配列番号 1 3
#43	(421-440)	GPIGLMGSSSCISTQGNGLP	配列番号 4 8
#44	(431-450)	CISTQGNGLP AIMTENC SAP	配列番号 4 9
#45	(441-460)	AIMTENC SAPNNTLWSTVSS	配列番号 5 0
#46	(451-470)	NNTLWSTVSSAQLQLGTRVL	配列番号 5 1
#47	(461-480)	AQLQLGTRVLGKDGKEK WMC	配列番号 5 2
#48	(471-490)	GKDGKEK WMC LDGSKSPLIS	配列番号 5 3
#49	(481-500)	LDGSKSPLISTNECICITDS	配列番号 1 4
#50	(491-510)	TNECICITDSHCYPKLNPEK	配列番号 5 4
#51	(501-520)	HCYPKLNPEKQWFKVITTNK	配列番号 5 5
#52	(511-528)	QWFKVITTNKQLLHQLQL	配列番号 1 5

[0022] [表3]

ペプチド 番号	配列番号 2 の アミノ酸番号	アミノ酸配列	配列番号
#53	(1-20)	LTLTRGRWIVDEATGLRVK	配列番号 5 6
#54	(211-230)	VILSGLQFDTL SFLPVLPI	配列番号 5 7
#55	(221-240)	DLSFLPVLPI TL PFKEKIVY	配列番号 5 8
#56	(261-280)	KNETGRFKSNIGFVTSSANA	配列番号 1 6
#57	(271-290)	IGFVTSSANATAAPLFMSEF	配列番号 5 9

[0023] 実施例 3 新規ヒノキ花粉特異的 T 細胞ラインの樹立

スギ花粉症でヒノキ花粉に感作されている患者 20 名の末梢血からリンパ球を通常用いられている Ficoll-paque 比重遠心法で単離し、一部を液体窒素に保存した。末梢血リンパ球 (1.2×10^7 個) を、6 ml の自己血漿 10% を添加した RPMI-1640 に懸濁し、ヒノキ花粉から精製した Protein X と共に 24 穴培養プレート上で 7~8 日間培養し

た。抗原刺激を受けて活性化されたT細胞が顕微鏡下で確認できた時点で20 Unit/mlのIL-2を添加し、一晚培養した。翌日からは、20 Unit/mlのIL-2、10%自己血漿を添加したRPMI-1640で毎日培養液を変えながら、10-12日間培養したものをT細胞エピトープの同定用のT細胞ラインとした。

[0024] 実施例4 T細胞エピトープを含むペプチドの同定

20名の花粉症患者から樹立したT細胞ラインについて、それぞれ合成したオーバーラップペプチドとともに培養し、Protein X特異的T細胞エピトープペプチドの同定を行った。すなわち、抗原提示細胞として、T細胞ラインと同一の患者から凍結ストックした末梢血単核球を融解後、X線照射(36 Gy)し、10%自己血漿を添加したRPMI-1640に懸濁した。この抗原提示細胞を96穴平底プレートに播種(1×10^5 cells/well)した後、Protein X(最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$)あるいは各ペプチド(最終濃度 $2 \mu\text{M}$)を各々のウェルに添加した。次いで、10%自己血漿を添加したRPMI-1640に懸濁したT細胞ライン(2×10^4 cells/well)を各ウェルに播種し、37℃、5% CO₂条件で48時間培養の後、 $1 \mu\text{Ci}$ [³H]チミジンをウェルに添加し、さらに16時間培養した。細胞をハーベスターを用いてガラスフィルター上に捕集し、乾燥してから、細胞内に取込まれた [³H]チミジンの放射活性(cpm)をトップカウント(パーキンエルマー製)で測定した。増殖活性の指標として、ペプチド刺激によるT細胞ラインの放射活性を、ペプチド非添加の放射活性(対照)で割った値をS.I.値として算出し、S.I.値が2以上の値を示したペプチドを、T細胞エピトープペプチドとして同定した。図1は、全てのオーバーラップペプチドの「平均S.I.値」(20名のS.I.値の平均値)と「出現頻度(%)」(20名中のS.I.値が2以上であった割合)及び「重要度指数」(平均S.I.値と出現頻度を乗じた値)を示している。

[0025] 実施例5 ヒノキ花粉特異的IgEとの結合能の確認

5名のヒノキ花粉症患者血清を用いて、ヒノキ花粉特異的IgEとの結合能を確認した。本発明の好適なT細胞エピトープペプチド（重要度指数が100以上）あるいはヒノキ花粉アレルゲンをMaxisorp 96穴プレート（ヌンク）に $1\mu\text{g}/50\mu\text{L}/\text{well}$ となるように添加後、一晚4℃で静置することにより固相化した。翌日プレートを洗浄後、1%牛血清アルブミン含有PBSを添加、1時間室温静置することでブロッキングを実施した。プレート洗浄後、5倍希釈した患者血清又は陰性対照血清を添加し2時間室温静置させた。陰性対照にはhealthy donor血清（ヒノキRAST Score=0）を用いた。プレート洗浄後、1%牛血清アルブミン含有PBSで7000倍希釈した2次抗体（HRP標識ヤギ抗ヒトIgE抗体、Novus）を添加して、40分間室温静置した。プレートを洗浄後、TMB Substrate Reagent Set（BD Biosciences）にてTMB発色を室温静置、遮光状態で20分間実施した。終了後、1N 硫酸を添加することで発色を停止させ、マイクロプレートリーダーにて波長450nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示す。尚、図2において、V012、V014、V031、V047、V051は、それぞれ5名のヒノキ花粉症患者IDを示す。

本発明のT細胞エピトープペプチドは、ヒノキ花粉特異的IgEと結合しないことが確認された。

[0026] 実施例6 20merエピトープ特異的T細胞ラインの樹立

スギ花粉症でヒノキ花粉に感作されている患者末梢血からリンパ球を、通常用いられているFicoll-paque比重遠心法で単離し、一部を液体窒素に保存した。末梢血リンパ球を、自己血漿10%を添加したRPMI-1640に懸濁し、最終濃度 $1\mu\text{M}$ の20merエピトープペプチドと共に96穴培養プレート上で（ $1.5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$ ）7～8日間培養した。並行して培養6～7日目には以下の通り継代に必要な抗原提示細胞を調製した。すなわち、同一の患者から凍結ストックした末梢血単核球を起眠し、10%自己血漿を添加したRPMI-1640培地に懸濁後、最

終濃度 $10 \mu\text{M}$ の 20mer エピトープペプチドを添加し 24 穴培養プレート上で一晩培養した。翌日それら細胞を X 線照射 (45 Gy) 後、培地中の 20mer エピトープペプチドを洗浄・除去したものを継代用抗原提示細胞とした。リンパ球培養 7～8 日目に、96 穴培養プレートに播種されているリンパ球のうち各ウェル 1/3 ずつを、最終濃度 100 Unit/ml の human IL-2、最終濃度 50 ng/ml の human IL-4 および 10% 自己血漿を添加した RPMI-1640 培地に懸濁した継代用抗原提示細胞とともに 96 穴培養プレート上で 7 日間培養した。残るリンパ球各ウェル 2/3 については、抗原特異性の評価に用いた。IL-2、IL-4 および継代用抗原提示細胞とともに 7 日間培養したリンパ球のうち、20mer エピトープペプチド特異的 T 細胞陽性と判定したウェルのリンパ球を全て集め、最終濃度 100 Unit/ml の human IL-2、最終濃度 50 ng/ml の human IL-4 および 10% 自己血漿を添加した RPMI-1640 培地に懸濁し、前述の方法で調製した継代用抗原提示細胞とともに 24 穴培養プレートにて 7 日間拡大培養した。以後、7 日毎に継代用抗原提示細胞にて拡大培養を続け、20mer エピトープペプチド特異的な細胞増殖を示す細胞集団を 20mer エピトープペプチド特異的 T 細胞ラインとした。

[0027] 実施例 7 エピトープコア配列の推定

エピトープ 20mer の C 末端より 1 アミノ酸残基ずつアミノ酸が欠失したペプチド (#52-1～#52-8、#24-1～#24-8、#38-1～#24-3)、N 末端より 1 アミノ酸残基ずつアミノ酸が欠失したペプチド (#52-9～#52-13、#24-9～#24-13)、及び N 末端より 6～9 アミノ酸残基が欠失したペプチド (#38-4～#24-7) を合成した。樹立した 20mer エピトープペプチド特異的 T 細胞ラインについて、上記短縮ペプチドとともに培養することで、エピトープコア配列の推定を行った。すなわち、抗原提示細胞として、T 細胞ラインと同一の患者から凍結ストックした末梢血単核球を融解後、X 線照射 (45 Gy) し、1

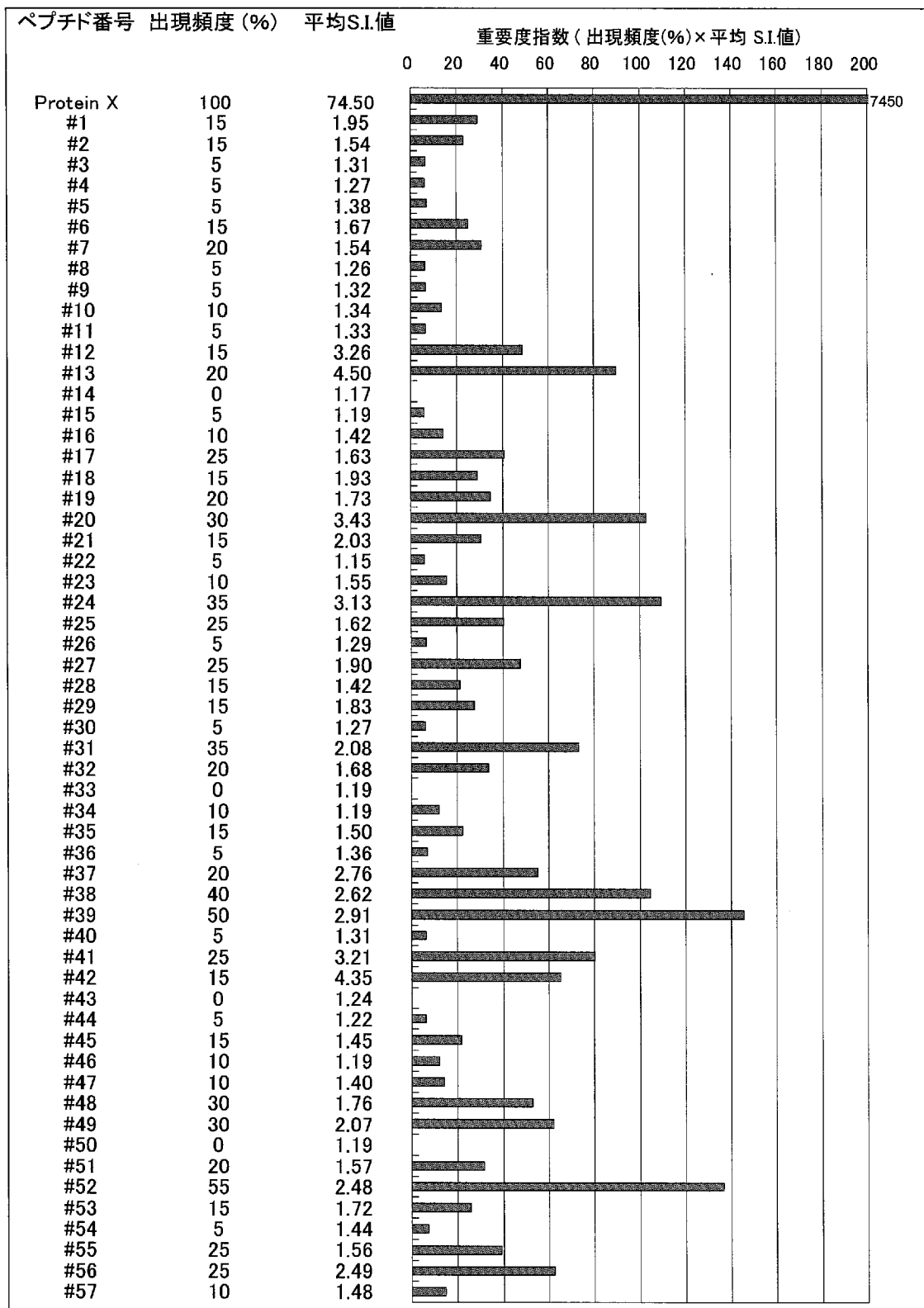
0%自己血漿を添加したRPMI-1640に懸濁した。この抗原提示細胞を96穴平底プレートに播種 (1×10^5 cells/well) した後、20merペプチドあるいは各短縮ペプチド (最終濃度 $2 \mu\text{M}$) を各々のウェルに添加した。次いで、10%自己血漿を添加したRPMI-1640に懸濁したT細胞ライン (2×10^4 cells/well) を各ウェルに播種し、 37°C 、5% CO_2 条件で48時間培養の後、 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] チミジンをウェルに添加し、さらに16時間培養した。細胞をハーベスターを用いてガラスフィルター上に捕集し、乾燥してから、細胞内に取込まれた [^3H] チミジンの放射活性 (cpm) をトップカウント (パーキンエルマー製) で測定した。増殖活性の指標として、ペプチド刺激によるT細胞ラインの放射活性を、ペプチド非添加の放射活性 (対照) で割った値をS.I. 値として算出した。その結果の一例を図3～図5に示す。

N末端ならびにC末端を欠失させた短縮ペプチドにてT細胞増殖活性を示した (S.I. 値が2以上) 最小の配列を元に両末端を決定したものをコア配列とした。上記手法により推定できた#24エピトープペプチド、#38エピトープペプチドおよび#52エピトープペプチドにおけるコア配列は、#24エピトープペプチド (配列番号7) では、4～14番目の「FKKKIVYEGHW」であり、#38エピトープペプチド (配列番号10) では、9～19番目の「PYYQIIYHPAS」であり、#52エピトープペプチド (配列番号15) では、3～11番目の「FKVITTNKQ」である。

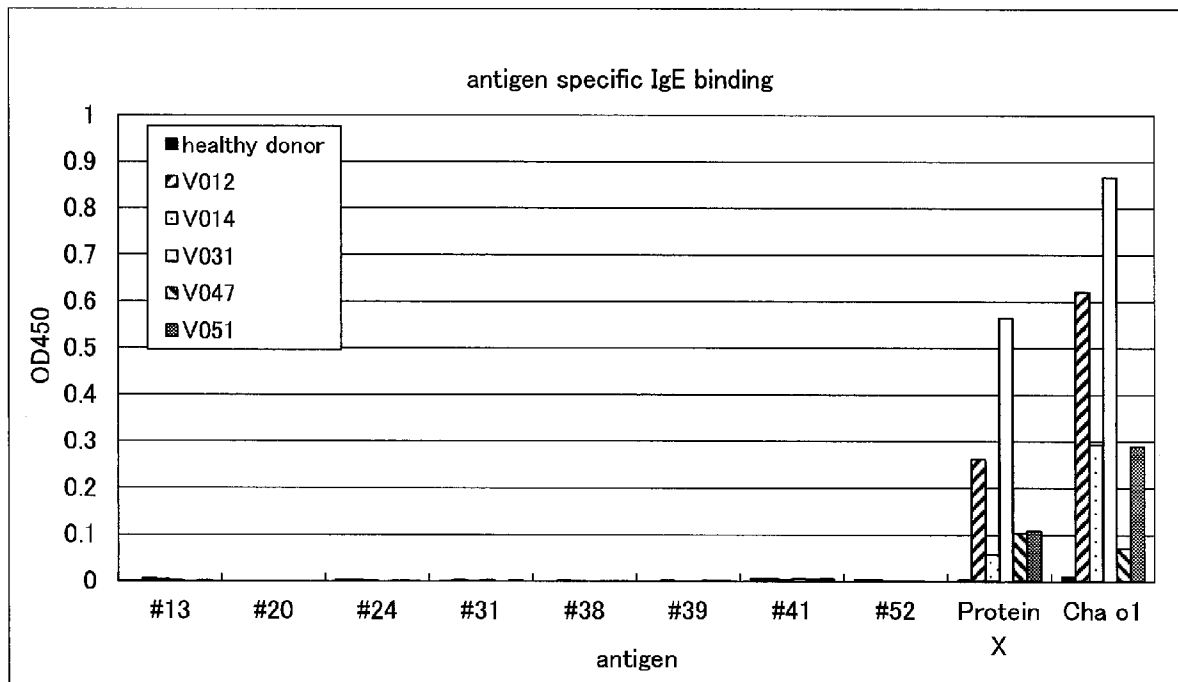
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号3～16で示されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるペプチド、又は当該ペプチドにおいて1～3個のアミノ酸が置換及び／又は1～10個のアミノ酸が欠失若しくは付加したペプチドであって、且つT細胞刺激活性を有するペプチド。
- [請求項2] 1～10個のアミノ酸が欠失したペプチドが、当該ペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失したものである、請求項1記載のペプチド。
- [請求項3] 配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「FKEKIVYE GHW」を有するペプチド、配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「PYYQIIYHPAS」を有するペプチド、又は配列番号15で示されるアミノ酸配列からなるペプチドのN末端側及び／又はC末端側のアミノ酸が欠失し、少なくとも「FKVITTNKQ」を有するペプチドである、請求項2記載のペプチド。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載されたペプチドの1種又は2種以上を有効成分として含有する、ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤。
- [請求項5] ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法剤を製造するための、請求項1～3のいずれか1項に記載されたペプチドの1種又は2種以上の使用。
- [請求項6] ヒノキ花粉症のペプチド免疫療法に使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載されたペプチドの1種又は2種以上。
- [請求項7] 請求項1～3のいずれか1項に記載されたペプチドの1種又は2種以上を投与するヒノキ花粉症のペプチド免疫療法。

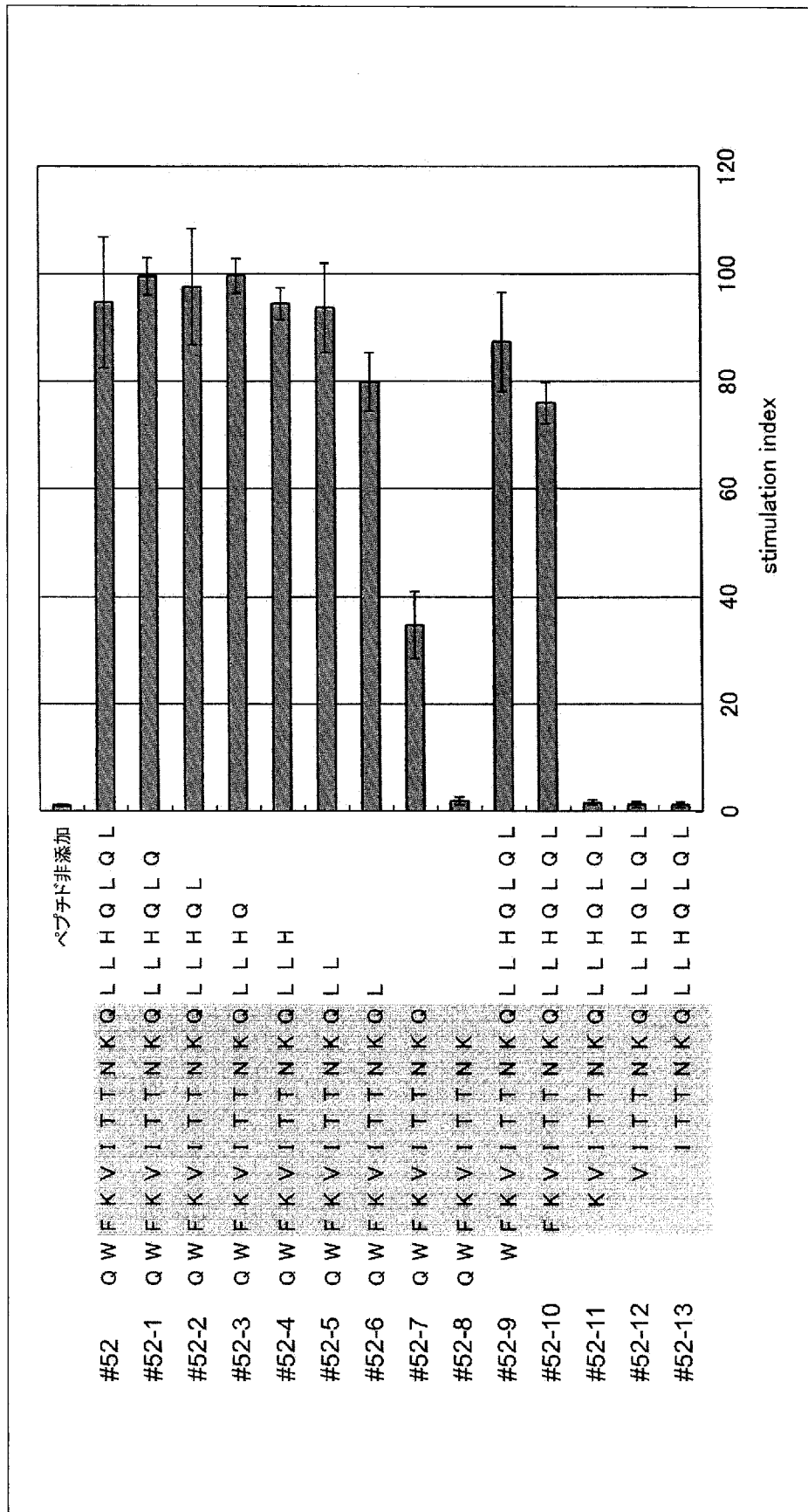
[図1]



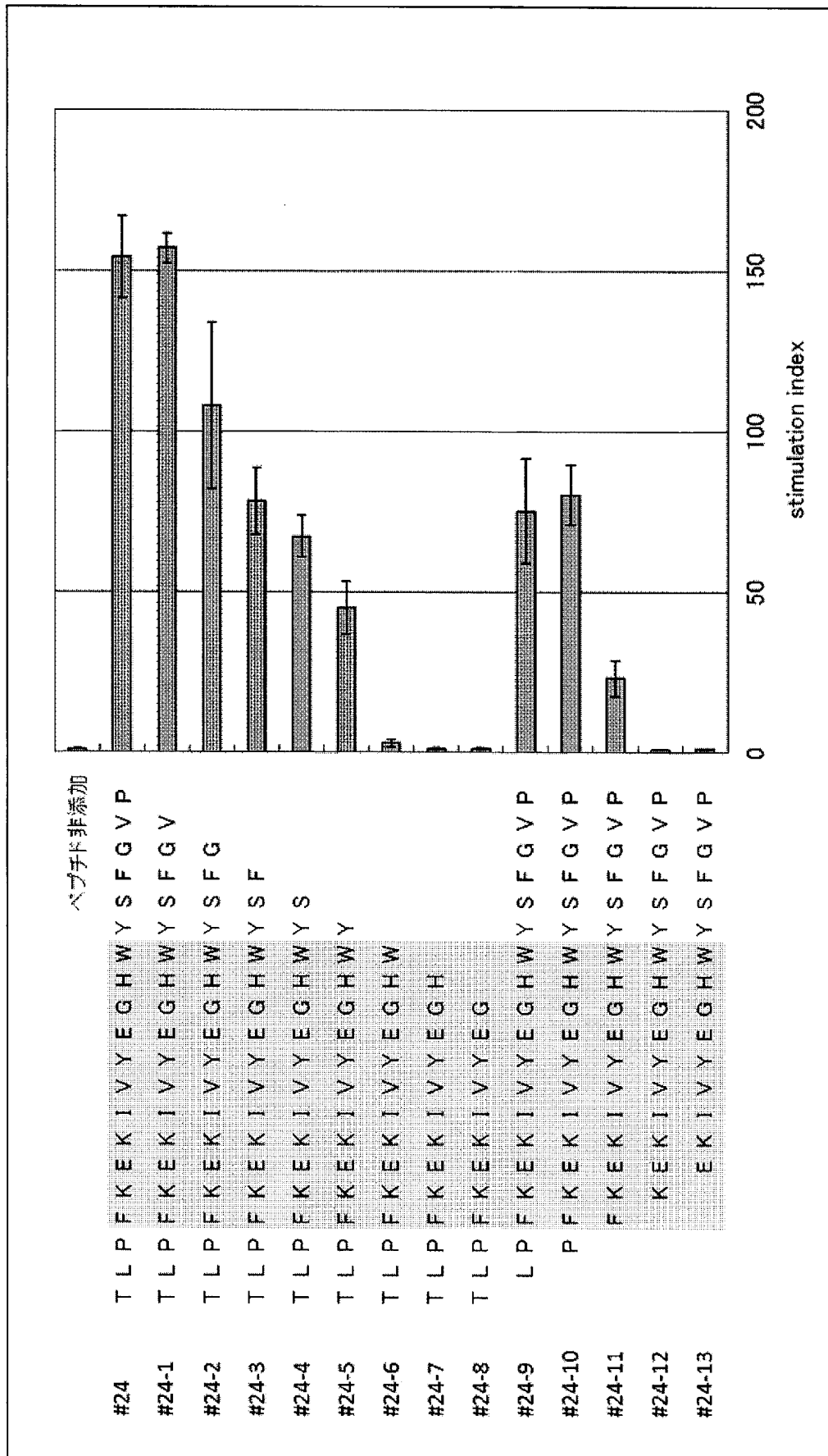
[図2]



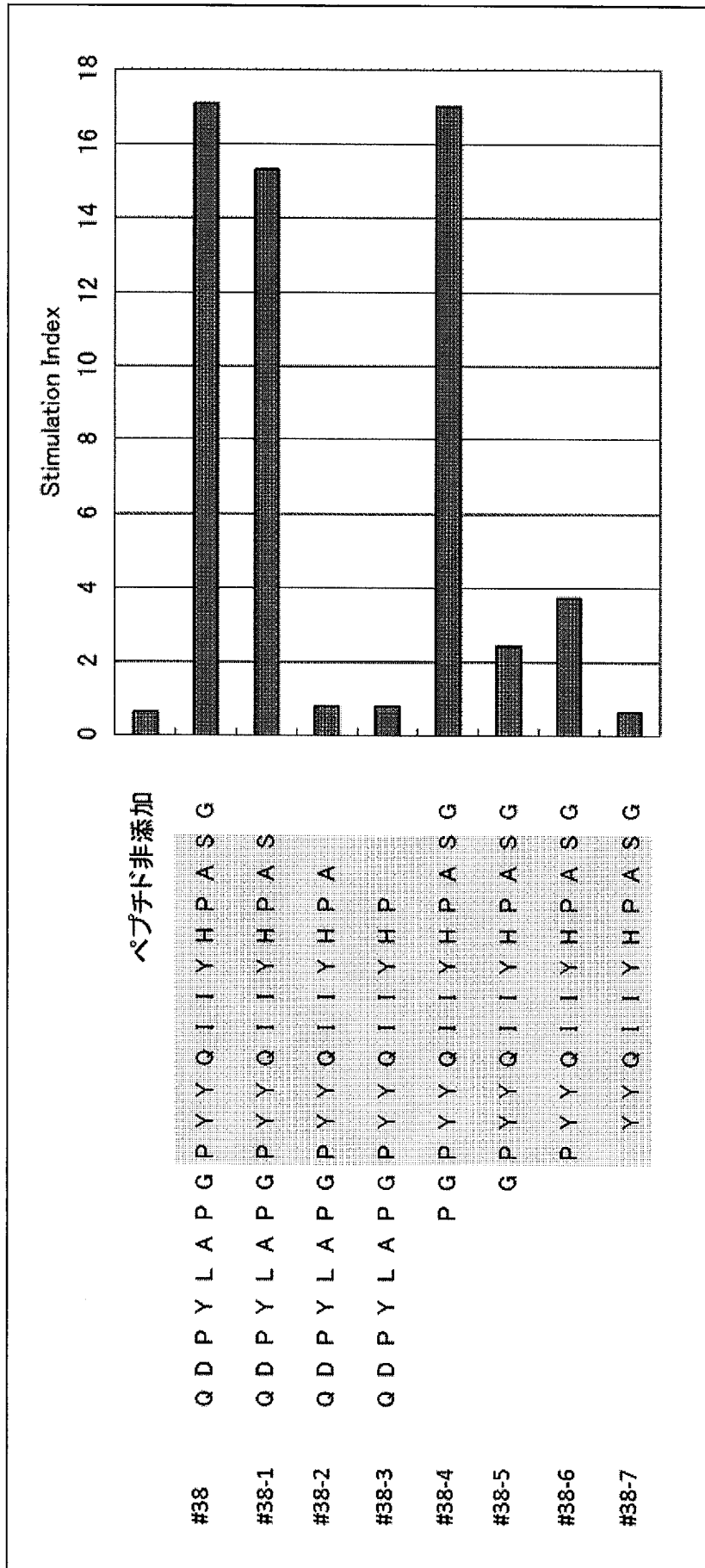
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

C07K7/06, A61K38/00, A61P37/08, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SONE T., et al., Recognition of T cell epitopes unique to Cha o 2, the major allergen in Japanese cypress pollen, in allergic patients cross-reactive to Japanese cedar and Japanese cypress pollen, Allergol. Int., 2009, vol.58, no.2, p.237-245	1-6
A	SONE T., et al., Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level, Clin. Exp. Allergy, 2005, vol.35, no.5, p.664-671	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 October, 2013 (01.10.13)

Date of mailing of the international search report

08 October, 2013 (08.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 1997/047648 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 18 December 1997 (18.12.1997), & EP 0960887 A1 & US 7112329 B1	1-6
A	WO 1997/032600 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 12 September 1997 (12.09.1997), & EP 0923940 A1 & US 6719976 B1	1-6
A	ITO H., et al., Analysis of the allergenic components of Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>) pollen by immunoblotting with the sera from patients with Japanese cedar pollinosis, Allergol. Int., 1996, vol.45, no.4, p.181-186	1-6
P,A	WO 2012/105541 A1 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 09 August 2012 (09.08.2012), & TW 201309723 A	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070219

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention set forth in claim 7 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ 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:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ 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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K7/06, A61K38/00, A61P37/08, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	SONE T., et al., Recognition of T cell epitopes unique to Cha o 2, the major allergen in Japanese cypress pollen, in allergic patients cross-reactive to Japanese cedar and Japanese cypress pollen, Allergol. Int., 2009, vol.58, no.2, p.237-245	1 - 6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 1 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

池上 文緒

4 B

3 7 6 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	SONE T., et al., Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level, Clin. Exp. Allergy, 2005, vol.35, no.5, p.664-671	1 - 6
A	WO 1997/047648 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.) 1997.12.18 & EP 0960887 A1 & US 7112329 B1	1 - 6
A	WO 1997/032600 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.) 1997.09.12 & EP 0923940 A1 & US 6719976 B1	1 - 6
A	ITO H., et al., Analysis of the allergenic components of Hinoki cypress (<i>Chamaecyparis obtusa</i>) pollen by immunoblotting with the sera from patients with Japanese cedar pollinosis, Allergol. Int., 1996, vol.45, no.4, p.181-186	1 - 6
P A	WO 2012/105541 A1 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2012.08.09 & TW 201309723 A	1 - 6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項7に記載された発明は、治療による人体の処置方法に関するものであるから、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT 規則 39.1(iv)により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。