

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4960102号

(P4960102)

(45) 発行日 平成24年6月27日 (2012.6.27)

(24) 登録日 平成24年3月30日 (2012.3.30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

請求項の数 15 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-544263 (P2006-544263)  
 (86) (22) 出願日 平成16年12月1日 (2004.12.1)  
 (65) 公表番号 特表2008-504004 (P2008-504004A)  
 (43) 公表日 平成20年2月14日 (2008.2.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/013664  
 (87) 国際公開番号 W02005/059136  
 (87) 国際公開日 平成17年6月30日 (2005.6.30)  
 審査請求日 平成19年11月30日 (2007.11.30)  
 (31) 優先権主張番号 10359351.9  
 (32) 優先日 平成15年12月16日 (2003.12.16)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 591032596  
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ  
 ト ベシュレンクテル ハフツング  
 Merck Patent Gesell  
 schaft mit beschräe  
 nkter Haftung  
 ドイツ連邦共和国 デー ー 6 4 2 9 3 ダ  
 ルムシュタット フランクフルター シュ  
 トラーセ 250  
 Frankfurter Str. 25  
 O, D-64293 Darmstadt  
 , Federal Republic o  
 f Germany

(74) 代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 穀物からの4群主要アレルゲンのDNA配列および組換え製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、3、5、7 および 9 による配列の 1 つから選択された Triticeae 花粉主要アレルゲンのヌクレオチド配列を有する、DNA 分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の DNA 分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、Tritic eae からの DNA 配列に由来し、配列番号 2、4、6、8 および 10 による アミノ酸配列 の 1 つを有する ポリペプチド と免疫学的に交差反応する ポリペプチド をコードする、DNA 分子。

【請求項 3】

発現制御配列に機能的に結合している 請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子を含む、組換え DNA 発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子または請求項 3 に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主生物体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の宿主生物体の培養および培養物からの対応するポリペプチドの単離による、請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子 によりコードされたポリペプチドの製造方法。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子によりコードされる、組換えポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の DNA 分子によりコードされた、配列番号 2、4、6、8 および 10 によるアミノ酸配列の 1 つを有する、ポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリペプチドの成熟アレルゲンであるポリペプチドであって、以下の群のアミノ酸配列

- アミノ酸 23 で開始される、配列番号 2、4 および 6 によるアミノ酸配列の 1 つ、
  - アミノ酸 22 で開始される、配列番号 8 および 10 によるアミノ酸配列の 1 つ
- から選択されている、前記ポリペプチド。

10

【請求項 9】

医薬としての、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

イネ科からの 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーの診断および / または処置のための、請求項 9 に記載のポリペプチドおよび随意に他の活性成分および / またはアジュバントを含む、医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のポリペプチドの、イネ科からの 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーの診断および / または処置および / または前記アレルギーの防止のための医薬の製造への使用。

20

【請求項 12】

医薬としての、請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子。

【請求項 13】

医薬としての、請求項 3 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の DNA 分子または請求項 13 に記載の発現ベクター、および随意に他の活性成分および / またはアジュバントを含む、イネ科からの 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーを有する患者の免疫療法的 DNA ワクチン接種および / または前記アレルギーの防止のための医薬組成物。

【請求項 15】

30

請求項 12 に記載の DNA 分子または請求項 13 に記載の発現ベクターの、イネ科からの 4 群アレルゲンが誘発に関与するアレルギーを有する患者の免疫療法的 DNA ワクチン接種および / または前記アレルギーの防止のための医薬の製造への使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本発明は、穀物(Triticeae)からの 4 群主要アレルゲンの DNA 配列を提供することに関する。本発明はまた、低刺激性(hypoallergenic)作用を有する断片、部分配列の新規な組み合わせおよび点突然変異体を包含する。組換え DNA 分子および誘導されたポリペプチド、断片、部分配列の新規な組み合わせおよびバリエーションを、花粉アレルギー疾患の治療のために用いることができる。組換え方法により製造されるタンパク質を、花粉アレルギーのインビトロおよびインビボ診断のために、用いることができる。

40

【背景技術】

【0002】

1 型アレルギーは、世界的に重要である。工業化された国の人口の 20 %までは、アレルギー性鼻炎、結膜炎または気管支喘息などの症状を患っている。これらのアレルギーは、種々の起源、例えば植物花粉、ダニ、ネコまたはイヌの供給源により放出される、空気中に存在するアレルゲン(エアロアレルゲン)により生じる。次に、これらの 1 型アレルギー患者の 40 %までが、花粉アレルゲン、特に穀物花粉アレルゲンとの特異的な I g E

50

反応性を示す(Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001)。  
穀物花粉アレルゲンの中で、ライムギのアレルゲンは、特定の重要性を有する。

【 0 0 0 3 】

1 型アレルギーを誘発する物質は、タンパク質、糖タンパク質またはポリペプチドである。粘膜を通過の取り込みの後に、これらのアレルゲンは、感作された個体中の肥満細胞の表面に結合した I g E 分子と反応する。2 つの I g E 分子が、アレルゲンにより互いに架橋された場合には、これにより、エフェクター細胞によるメディエータ (例えばヒスタミン、プロスタグランジン) およびサイトカインの放出並びに従って対応する臨床症状がもたらされる。

【 0 0 0 4 】

個別のアレルゲン分子がアレルギー患者の I g E 抗体と反応する相対的頻度に依存して、主要なアレルゲンと主要でないアレルゲンとの間で、区別がなされる。

【 0 0 0 5 】

草 (イネ科) の族からの種々の種の花粉からのアレルゲンは、互いの中で相同な群に分けられる。

特に、4 群主要アレルゲンの分子は、モノクローナルマウス抗体およびまたヒト I g E 抗体の両方と、互いに高い免疫学的交差反応性を有する (Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic et al., 2000, Invest. A 20  
llergol. Clin. Immunol. 10 (6):361-367; Stumvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383:13 83-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383:1441-1445; Andersson および Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130:87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1):43-51)。

【 0 0 0 6 】

完全な DNA 配列は、4 群主要アレルゲンのいずれについても、現在まで知られていない。

Dactylus glomerata からの 4 群アレルゲンから、現在まで、ペプチドを、酵素的分解により得、配列決定することが可能であるに過ぎなかった：

【表 1】

DIYNYMEPYVSK ( 配列番号 13),

VDPTDYFGNEQ ( 配列番号 14),

ARTAWVDSGAQLGELSY ( 配列番号 15)

及び GVLFNIIQYVNYWFAP ( 配列番号 16, Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

ペプチドはまた、亜熱帯ギョウギシバ (Cynodon dactylon) の 4 群アレルゲンから、タンパク質分解により得られ、配列決定された：

10

20

30

40

## 【表 2】

KTVKPLYIITP ( 配列番号 17),  
 KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS ( 配列番号 18),  
 TVKPLYIITPITAAMI ( 配列番号 19),  
 LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL ( 配列番号 20),  
 KWQTVAPALPDPNM ( 配列番号 21),  
 VTWIESVPYIPMGDK ( 配列番号 22),  
 GTVRDLLXRTSNIKAFGKY ( 配列番号 23),  
 TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS ( 配列番号 24),  
 YRDLDLGVNQVVG ( 配列番号 25),  
 SATPPTHRSGVLFNI ( 配列番号 26)  
 及び AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDLD (SEQ ID NO 27,  
 Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-  
 743).

10

20

## 【 0 0 0 7 】

Lolium perenneについて、以下の配列を有するペプチド断片が、基本的な 4 群アレルゲンについて記載された：F L E P V L G L I F P A G V ( 配列番号 2 8 ) および G L I E F P A G V ( 配列番号 2 9、Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348 )。

4 群アレルゲンの第 1 の配列として、Phleum pratenseからのPhl p 4の未だ刊行されていない配列 ( 配列番号 1 1 ) は、本特許出願の発明者らにより明らかにされ、国際出願WO 04/000881中に記載された。

## 【 0 0 0 8 】

現在まで、穀物(Triceae)からの 4 群主要アレルゲンの配列に関して、何も知られていない。

従って、本発明が基づく目的は、穀物からの 4 群主要アレルゲン、特にライムギ(Secale cereale)からのアレルゲンSec c 4 ( 配列番号 1、3 )、オオムギ(Hordeum vulgare)からのHor v 4 ( 配列番号 5 ) およびコムギ(Triticum aestivum)からのTri a 4 ( 配列番号 7、9 ) の D N A 配列並びにこれに基づいて、アレルゲンが、このようなものとして、または改変された形態でタンパク質として発現され、有用にされ得る対応する組換え D N A 分子を、薬学的に有意義な開発のために提供することにあった。Phl p 4の配列 ( 配列番号 1 1 ) は、本発明のための出発点であった。

## 【発明の開示】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の配列のリスト

配列番号 1 ~ 1 0 による成熟アレルゲンの D N A およびタンパク質配列に、シグナル配列が先行する。コード領域は、D N A 配列における T G A または T A G 停止コドンで終了する。

## 【 0 0 1 0 】

- Sec c 4の D N A 配列。( a ) アイソフォームSec c 4.01 ( 配列番号 1 )、( b ) アイソフォームSec c 4.02 ( 配列番号 3 )。
- 配列番号 1 および 3 による D N A 配列から誘導されるタンパク質配列 ( 配列番号 2、4 )。

30

40

50

- Hor v 4のDNA配列(配列番号5)。
- 配列番号5によるDNA配列から誘導されるタンパク質配列(配列番号6)。
- Tri a 4のDNA配列。(a)アイソフォームTri a 4.01(配列番号7)、(b)アイソフォームTri a 4.02(配列番号9)。
- 配列番号7および9によるDNA配列から誘導されるタンパク質配列(配列番号8、10)。
- WO 04/000881からの配列番号5によるPhl p 4のDNA配列(配列番号11)。
- WO 04/000881からの配列番号6によるPhl p 4のタンパク質配列(配列番号12)。

#### 【0011】

##### 発明の記載

10

ここで、本発明は、初めて、配列番号1、3、5、7および9による穀物花粉主要アレルゲンSec c 4、Hor v 4およびTri a 4のDNA配列を提供する。

従って、本発明は、配列番号1、3、5、7および9によるヌクレオチド配列から選択されたDNA分子に関する。

#### 【0012】

本発明はさらに、本発明のDNA配列と相同な配列並びに、存在する配列相同性のために、本発明のDNA配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするかまたは、本発明のアレルゲンに関する免疫学的交差反応性を有する、他のイネ科、例えばLolium perenne、Dactylis glomerata、Poa pratensis、Cynodon dactylonおよびHolcus lanatusからの4群アレルゲンの対応するDNA分子に関する。

20

本発明はまた、低刺激性作用を有する断片、部分的配列の新たな組み合わせおよび点突然変異体を包含する。

#### 【0013】

従って、本発明はさらに、イネ科からの4群アレルゲンの、免疫調節性のT細胞反応性の断片をコードする、対応する部分配列、部分配列の組み合わせまたは置換、欠失もしくは付加突然変異体に関する。

天然に存在するアレルゲンのDNA配列の知識を用いて、ここで、これらのアレルゲンを、アレルギー性疾患の診断および療法において用いることができる組換えタンパク質として調製することが、可能である(ScheinerおよびKraft, 1995, Allergy 50: 384-391)。

#### 【0014】

30

アレルギーの有効な治療的処置のための古典的な方法は、特異的免疫療法または減感作である(Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102 (4): 558-562)。この方法において、患者に、天然のアレルゲン抽出物を、増大する用量で皮下注射する。しかし、この方法において、アレルギー反応またはさらにアナフィラキシーショックの危険がある。これらの危険を最小にするために、アレルゴイドの形態での革新的な製剤が用いられる。これらは、未処置の抽出物と比較して顕著に低下したIgE反応性、しかし同一のT細胞反応性を有する、化学的に改変されたアレルゲン抽出物である(Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382)。

#### 【0015】

尚一層実質的な療法の最適化が、組換え方法により調製されたアレルゲンを用いて可能である。随意に患者の個別の感作パターンに整合させた、組換え方法により調製された高純度アレルゲンの所定の混合物は、天然のアレルゲン供給源からの抽出物に代わることができる。その理由は、これらは、種々のアレルゲンに加えて、比較的多数の免疫原性であるが、アレルゲン性ではない二次タンパク質を含むからである。

40

#### 【0016】

発現産物での信頼性のある減感作をもたらし得る現実的な展望は、特異的に突然変異した組換えアレルゲンにより提供され、ここで、IgEエピトープは、療法に必須のT細胞エピトープを損なわずに特異的に欠失している(Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414)。

#### 【0017】

50

アレルギー患者における乱されたT H細胞平衡に治療的な影響を与えるためのさらなる可能性は、免疫療法的DNAワクチン接種であり、これは、関連するアレルゲンをコードする発現可能なDNAでの処置を伴う。免疫応答にアレルゲン特異的な影響を与えることの最初の実験的な証拠は、げっ歯動物において、アレルゲンをコードするDNAの注射により提供された(Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544)。

【0018】

従って、本発明はまた、医薬としての本明細書中に記載したDNA分子および医薬としての対応する組換え発現ベクターに関する。

【0019】

組換え方法により調製された対応するタンパク質を、花粉アレルギーの療法並びにインビトロおよびインビボ診断のために用いることができる。

組換えアレルゲンの調製のために、クローン化した核酸を、発現ベクター中に連結し、この構造物を、好適な宿主生物体中で発現させる。生化学的精製の後に、この組換えアレルゲンは、確立された方法によるIgE抗体の検出のために有用である。

【0020】

従って、本発明はさらに、発現制御配列に機能的に結合した、本明細書中に記載したDNA分子を含む組換え発現ベクターおよび、前述のDNA分子または前述の発現ベクターで形質転換した宿主生物体に関する。

【0021】

本発明はまた、上記した少なくとも1種のDNA分子または上記した少なくとも1種の発現ベクターの、イネ科、好ましくはTriticeaeからの4群アレルゲン、特にSec c 4、Hor v 4、Tri a 4が誘発に關与するアレルギーを有する患者の免疫療法的DNAワクチン接種および/またはこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造への使用に関する。

【0022】

すでに述べたように、本発明を、特異的免疫療法のための組換えアレルゲンまたは核酸含有製剤における必須の成分として用いることができる。多くの可能性が、ここで生じる。他方、不変の一次構造を有するタンパク質は、製剤の構成成分であってもよい。他方、本発明において、分子全体のIgEエピトープの特異的な欠失またはT細胞エピトープをコードする個別の断片の産生により、低刺激性(アレルゴイド)形態を、治療に、不所望な副作用を回避するために用いることができる。最後に、核酸自体は、真核性発現ベクターと連結した場合には、直接用いた際に、アレルギー性免疫状態を治療的な意味で調節する製剤を生じる。

【0023】

本発明はさらに、好ましくは医薬としての特性において、上記したDNA分子の1種または2種以上によりコードされたポリペプチドに関する。

これらは、配列番号2、4、6、8または10によるアミノ酸配列に相当するタンパク質である。特に、これらは、アミノ酸23(配列番号2、4および6)並びにアミノ酸22(配列番号8、10)において開始する成熟タンパク質である(シグナル配列成分を含まない)。本発明はさらに、これらのアミノ酸配列またはこれらの配列の一部を含むタンパク質に関する。

【0024】

従って、本発明はまた、宿主生物体の培養および培養物からの対応するポリペプチドの単離によるこのようなポリペプチドの製造方法に関する。

本発明は、同様に、上記した少なくとも1種のポリペプチドの、イネ科、好ましくはTriticeaeからの4群アレルゲン、特にSec c 4、Hor v 4、Tri a 4が誘発に關与するアレルギーの診断および/または処置並びにこのようなアレルギーの防止のための医薬の製造への使用に関する。

【0025】

以下の手順により本発明のタンパク質およびDNA配列を決定した：  
ライムギからのSec c 4

10

20

30

40

50

1. Phl p 4 (配列番号 12、WO 04/000881) の DNA 配列から開始して、Phl p 4 配列から誘導された特異的プライマー (表 1) を発生させた。5 種のクローンを、ライムギ花粉 DNA から、プライマー # 87 および # 83 を用い PCR により得た。これらのクローンに相当する増幅させた Sec c 4 遺伝子断片 1 は、Phl p 4 (配列番号 12) のアミノ酸 68 ~ 401 に相当するポリペプチドをコードする。

【0026】

2. EST データベース検索を、部分的 Sec c 4 配列について行った。しかし、相同性の配列は、ライムギに特化した EST データベースにおいて見出されなかった。代わりに、個別の相同性の重複しない EST 断片が、オオムギおよびコムギに特化した EST データベースにおいて見出された。個別の EST 断片は、5' - UTR 領域中にわたり、他のものは、対応する遺伝子の 3' - UTR 領域 (UTR = 非翻訳領域) 中にわたる。

10

【0027】

3. しかし、コムギまたはオオムギからの完全な 4 群遺伝子を、データベースにおいて見出された EST 配列から構成することはできない。その理由は、これらの配列は、重複せず、相同性の 4 群遺伝子は知られていないからである。しかし、これらの EST 配列を、段階 1 において得られた Phl p 4 配列 (配列番号 11) および Sec c 4 断片を参照して割り当てることが可能であり、これらは、PCR プライマーの調製のための鋳型として作用した。

【0028】

4. このようにして調製されたプライマー # 195 および # 189 を用いて、3 種のクローンを、PCR により得た。プライマー # 195 は、オオムギ EST 配列から誘導されており、プライマー # 189 は、Phl p 4 特異的プライマーであり、Phl p 4 停止コドンおよび 10 個の C 末端 Phl p 4 アミノ酸のコドンと重複している。このようにして増幅された Sec c 4 遺伝子断片 2 は、シグナル配列内で開始し、Phl p 4 の位置 490 に相当する位置で終了するポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、Sec c 4 の N 末端をカバーする。

20

【0029】

5a. 3 種のさらなるクローンが、プライマー # 195 および # 202 での PCR により得られた。両方のプライマーは、オオムギ EST 配列から誘導された。増幅された Sec c 4 遺伝子 3 は、シグナル配列内で開始し、Sec c 4 の C 末端で終了する対応するアミノ酸をコードする。従って、成熟した Sec c 4 の完全な配列は、決定された配列中に存在する。

30

【0030】

次の 2 つの段階 5b および 5c は、段階 5a において得られた結果を二重チェックする作用を奏する：

5b. さらなるクローンを、プライマー # 195 および # 203 での PCR により得た。プライマー # 195 は、オオムギ EST 配列から誘導されており、プライマー # 203 は、コムギ EST 配列から誘導された。増幅された Sec c 4 遺伝子は、シグナル配列内で開始し、Sec c 4 の C 末端で終了する対応するアミノ酸をコードする。従って、成熟した Sec c 4 の完全な配列は、決定された配列中に存在する。

40

【0031】

5c. さらなるクローンを、プライマー # 195 および # 198 を用い PCR により得た。またプライマー # 198。増幅された Sec c 4 遺伝子は、シグナル配列内で開始し、Sec c 4 の C 末端で終了する対応するアミノ酸をコードする。従って、成熟した Sec c 4 の完全な配列は、決定された配列中に存在する。

【0032】

2 種のアイソフォーム Sec c 4.01 および 4.02 が見出された。成熟したアレルゲンは、配列番号 2、4 および 6 による配列のアミノ酸 23 で開始する。

【0033】

オオムギからの Hor v 4

上記したように得られた Sec c 4 配列を用い、相同性の EST 断片が、Hordeum vulgare

50

のESTデータベースにおいて見出された。これらの断片は重複しているが、完全な遺伝子を付与するためではない。しかし、見出されたEST配列を参照して、Hor v 4特異的プライマーを生成することが可能であり、これを、ゲノムDNAからのHor v 4遺伝子の増幅のために用いた。

【0034】

合計で、15種のクローンを、分析した。

4種のクローンが、プライマー#195および#198を用いたPCRにより得られた

。

4種のクローンが、プライマー#195および#202を用いたPCRにより得られた

。

3種のクローンが、プライマー#194および#198を用いたPCRにより得られた

。

4種のクローンが、プライマー#194および#202を用いたPCRにより得られた

。

【0035】

誘導されたタンパク質配列は、Hor v 4のシグナル配列内で開始し、タンパク質のC末端端部まで及ぶ(配列番号6のアミノ酸23から)。

【0036】

コムギからのTri a 4

上記したように得られたSec c 4配列の補助により、相同性のEST断片が、Triticum aestivumのESTデータベースにおいて見出された。これらの断片は重複しているが、完全な遺伝子を付与するためではない。しかし、見出されたEST配列を参照して、Tri a 4特異的プライマー#199、#203、#204および#206を生成することが可能であり、これを、ゲノムDNAからのTri a 4遺伝子の増幅のために用いた。

【0037】

合計で、13種のクローンを、分析した。

4種のクローンが、プライマー#204および#203を用いたPCRにより得られた

。

4種のクローンが、プライマー#204および#199を用いたPCRにより得られた

。

3種のクローンが、プライマー#206および#203を用いたPCRにより得られた

。

4種のクローンが、プライマー#206および#199を用いたPCRにより得られた

。

【0038】

誘導されたタンパク質配列は、Tri a 4のシグナル配列内で開始し、タンパク質のC末端端部まで及ぶ。

2種のバリエーションTri a 4.01(配列番号8のアミノ酸22から)およびTri a 4.02(配列番号10のアミノ酸22から)が見出された。

【0039】

本発明の組換えアレルゲンを調製するために、配列番号1、3、5、7および9によるDNA配列を、発現ベクター(例えばpProEx、pSE380)中に導入した。大腸菌により最適化されたコドンを、タンパク質配列決定から知られているN末端アミノ酸のために用いた。

【0040】

大腸菌における形質転換、種々の分離手法による本発明の組換えアレルゲンの発現および精製の後に、得られたタンパク質に、再折り畳みプロセスを施した。

両方のアレルゲンを、花粉アレルギーの高度に特異的な診断のために用いることができる。この診断を、特異的抗体(IgE、IgG1~4、IgA)の検出およびIgE負荷エフェクター細胞(例えば血液からの好塩基球)との反応によりインビトロで、または皮

10

20

30

40

50



膚試験反応および反応器官における誘発によりインビボで行うことができる。

【0041】

本発明のアレルゲンの、花粉アレルギー患者からのＴリンパ球との反応を、増殖のためのＴリンパ球のアレルゲン特異的刺激、並びに新たに調製した血液リンパ球におけるＴ細胞との、およびまた、確立されたnSec c 4、nHor v 4またはnTri a 4反応性Ｔ細胞系およびクローンにおけるサイトカイン合成により検出することができる。

【0042】

システインをコードするトリプレットを、部位特異的変異導入により、これらが、他のアミノ酸、好ましくはセリンをコードするように改変した。個々のシステインを置換したバリエーションおよび、２つのシステイン残基の種々の組み合わせまたはすべてのシステインを改変したバリエーションの両方を、製造した。これらのシステイン点突然変異体の発現されたタンパク質は、アレルギー患者からのIgE抗体との大幅に低減したか、またはゼロの反応性を有するが、これらの患者からのＴリンパ球と反応する。

従って、本発明はさらに、対応するポリペプチドの１つ、複数またはすべてのシステイン残基が、他のアミノ酸で、部位特異的変異導入により置換されている、本明細書中に記載したDNA分子に関する。

【0043】

Ｔ細胞エピトープを有するポリペプチドおよび低アレルゲン性点突然変異体（例えばシステイン置換）のポリペプチドに対応する低アレルゲン性断片の免疫調節活性を、花粉アレルギー患者からのＴ細胞とのこれらの反応により検出することができる。

【0044】

このような低アレルゲン性断片またはシステインの点突然変異体を、アレルギー患者の減感作のための製剤として用いることができる。その理由は、これらがＴ細胞と、等しい有効性を伴って反応するが、低減されたかまたは全く存在しないIgE反応性のために、IgEを介する副作用が低減するからである。

【0045】

本発明の低アレルゲン性アレルゲンバリエーションをコードする核酸または本発明の未改変DNA分子を、ヒト発現ベクターと連結する場合には、これらの構築物を、同様に、免疫療法（DNAワクチン接種）のための製剤として用いることができる。

【0046】

最後に、本発明は、上記した少なくとも１種のDNA分子または上記した少なくとも１種の発現ベクター、および随意に他の活性成分および／またはアジュバントを含む、イネ科、好ましくはTriticeaeからの４群アレルゲン、特にSec c 4、Hor v 4、Tri a 4が誘発に関与するアレルギーを有する患者の免疫療法的DNAワクチン接種および／またはこのようなアレルギーの防止のための医薬組成物に関する。

【0047】

本発明の他の群の医薬組成物は、上記した少なくとも１種のポリペプチドをDNAの代わりに含み、前述のアレルギーの診断および／または処置に適する。

【0048】

本発明の意味における医薬組成物は、活性成分として、本発明のポリペプチドまたは発現ベクターおよび／またはすべての比率での混合物を含む、それぞれの薬学的に使用可能な誘導体を含む。本発明の活性成分を、ここで、少なくとも１種の固体、液体および／または半液体賦形剤またはアジュバントと共に、および随意に１種または２種以上の他の活性成分と組み合わせて、好適な投薬形態とすることができる。

特に好適なアジュバントは、CpGモチーフを有する免疫賦活性DNAまたはオリゴヌクレオチドである。

【0049】

これらの組成物を、ヒト医学または獣医学における治療剤または診断剤として用いることができる。好適な賦形剤は、非経口投与に適し、本発明の活性成分の作用に悪影響を生じない有機または無機物質である。非経口的使用に適するのは、特に、溶液、好ましくは

10

20

30

40

50

オイルベース、または水性の溶液、さらに懸濁液、エマルジョンまたはインプラントである。本発明の活性成分を、また、凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を、例えば、注射製剤を製造するために用いることができる。示した組成物を、滅菌し、および／またはこれは、補助剤、例えば保存剤、安定剤および／または湿潤剤、乳化剤、浸透圧を調整するための塩、緩衝物質および／または複数の他の活性成分を含むことができる。

さらに、持続放出製剤を、本発明の活性成分の対応する処方により、- 例えば水酸化アルミニウム上への吸着により得ることができる。

【 0 0 5 0 】

従って、本発明はまた、アレルゲン成分が誘発する患者に特異的な感作範囲の同定の一部として、インビトロ診断を改善するのに役立つ。本発明は、同様に、花粉アレルギーの特異的な免疫療法のための顕著に改善された製剤を製造するのに役立つ。

【 0 0 5 1 】

## 【表 3】

表 1 用いたプライマー

## a) Sec c 4

プライマー 番号	配列番号	配列
#0083	30	GGCTCCCGGGGCGAACCAGTAG
#0087	31	ACCAACGCCTCCCACATCCAGTC
#0189	32	GATAAGCTTCTCGAGTGATTAGTACTTTTTGAT CAGCGGCGGGATGCTC
#0195	33	GCTCTCGATCGGCTACAATGGCG
#0198	34	CACGCACTACAAATCTCCATGCAAG
#0202	35	CATGCTTGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC
#0203	36	TACGCACGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC

10

## b) Hor v 4

プライマー 番号	配列番号	配列
#0194	37	GCCTTGTCCTGCCACCACGCCGCCGCCACC
#0195	38	GCTCTCGATCGGCTACAATGGCG
#0198	39	CACGCACTACAAATCTCCATGCAAG
#0202	40	CATGCTTGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC

20

## c) Tri a 4

プライマー 番号	配列番号	配列
#0199	41	CACGCACTAAATCTCCATGCAAG
#0203	42	TACGCACGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC
#0204	43	AAGCTCTATCGCCTACAATGGCG
#0206	44	GGTGCTCCTCTTCTGCGCCTTGTC

30

## 【配列表】

0004960102000001.xml

40

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>		<b>C 1 2 P 21/02</b>	<b>C</b>
<b>C 0 7 K 14/415 (2006.01)</b>		<b>C 0 7 K 14/415</b>	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 37/02</b>	
<b>A 6 1 K 39/35 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 39/35</b>	
<b>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 37/08</b>	
<b>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 31/713</b>	

(74)代理人 100135943

弁理士 三橋 規樹

(74)代理人 100133134

弁理士 高河原 芳子

(72)発明者 フィービク, ヘルムート

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

(72)発明者 ナンディー, アンドレーアス

ドイツ連邦共和国 2 2 1 7 5 ハンブルク、ニュッスレルカンブ 8 9

(72)発明者 クロムウェル, オリヴァー

ドイツ連邦共和国 2 3 7 0 1 ズーゼル - ファッセンドルフ、アム ブルック 1 7

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表平 0 9 - 5 0 4 1 6 7 ( J P , A )

特表平 0 6 - 5 0 9 9 4 1 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 0 8 8 1 ( W O , A 1 )

国際公開第 0 3 / 0 0 0 8 9 8 ( W O , A 1 )

FISCHER, S. et al., "Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen.", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 1 9 9 6 年 7 月, Vol.98, No.1, P.189-198STUMVOLL, S. et al., "Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential.", BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 2 年 9 月, Vol.383, No.9, P.1383-1396SCHEINER, O. et al., "cDNA cloning, of the major pollen allergens from timothy grass (*Phleum pratense*) and rye (*Secale cereale*). Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant allergens.", MOLECULAR BIOLOGY AND IMMUNOLOGY OF ALLERGENS, 1 9 9 3 年, P.153-156

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

Science Direct

WPI