

85115374

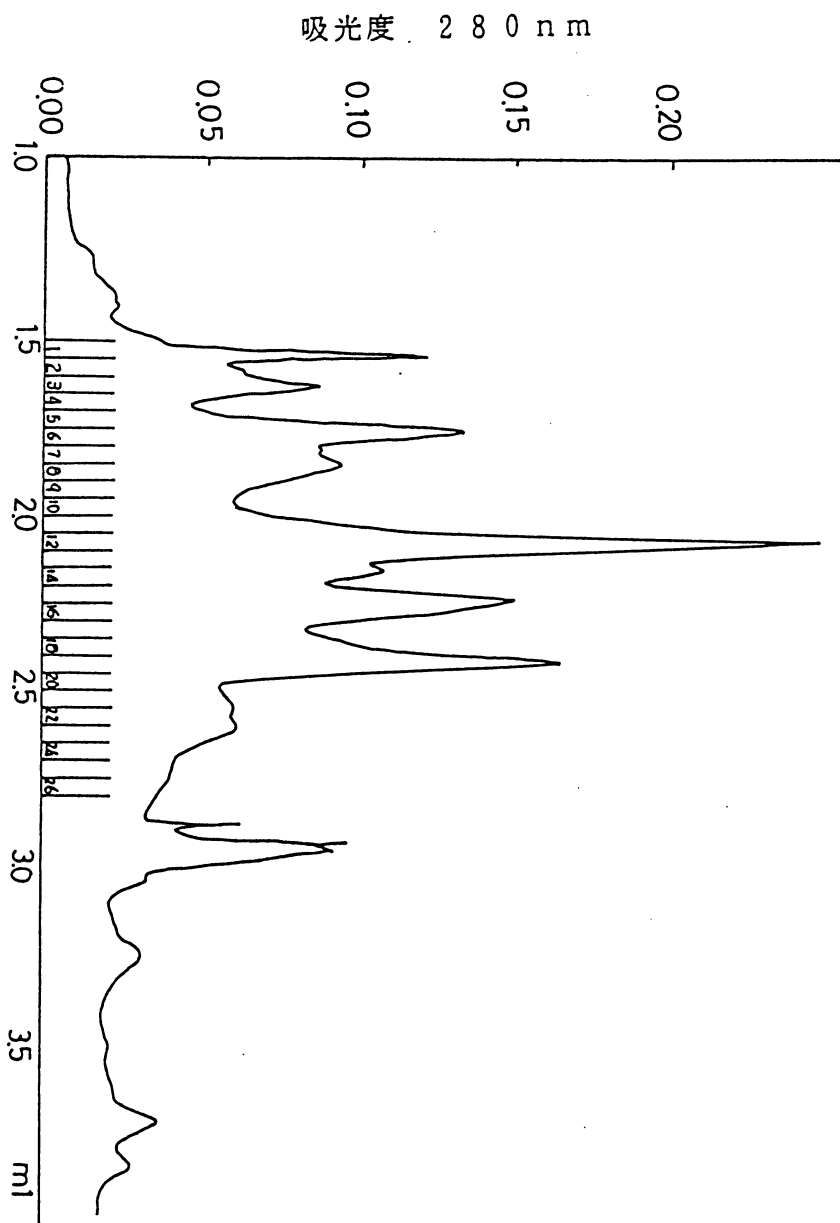


圖 1

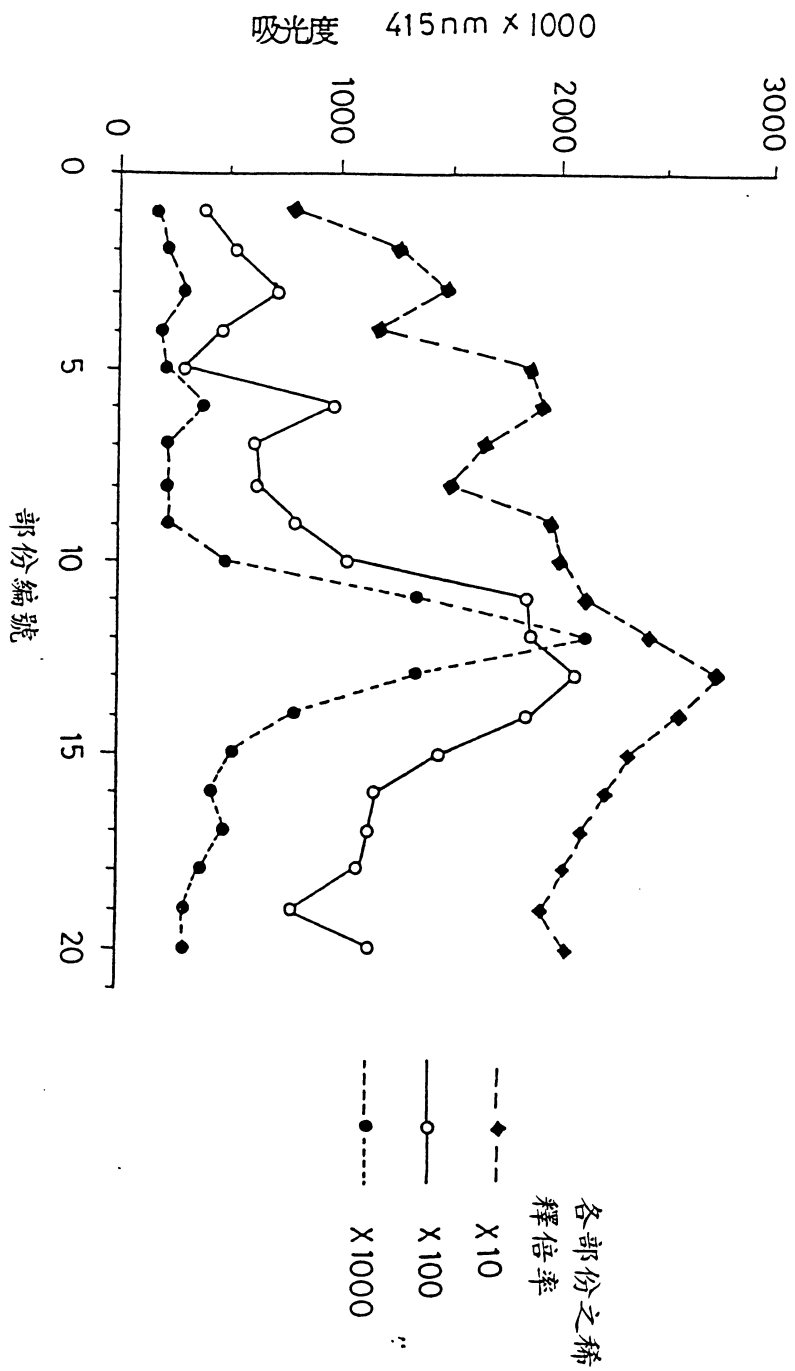


圖 2

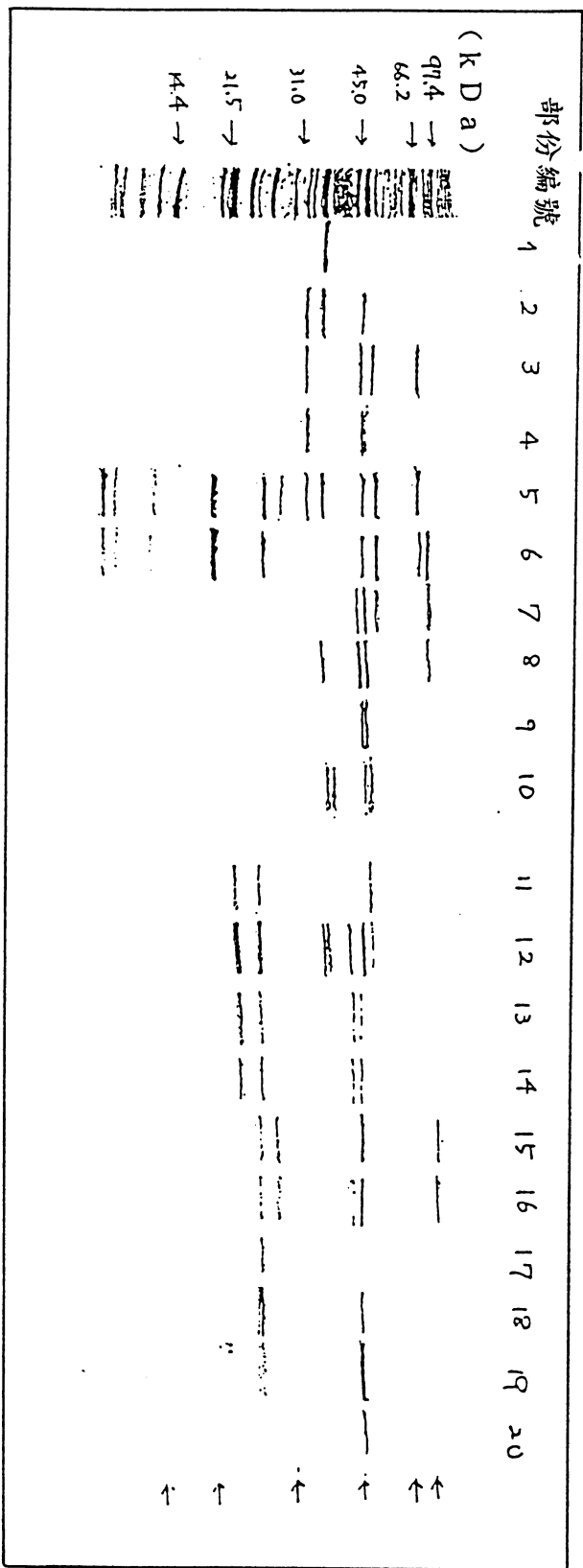


圖 3

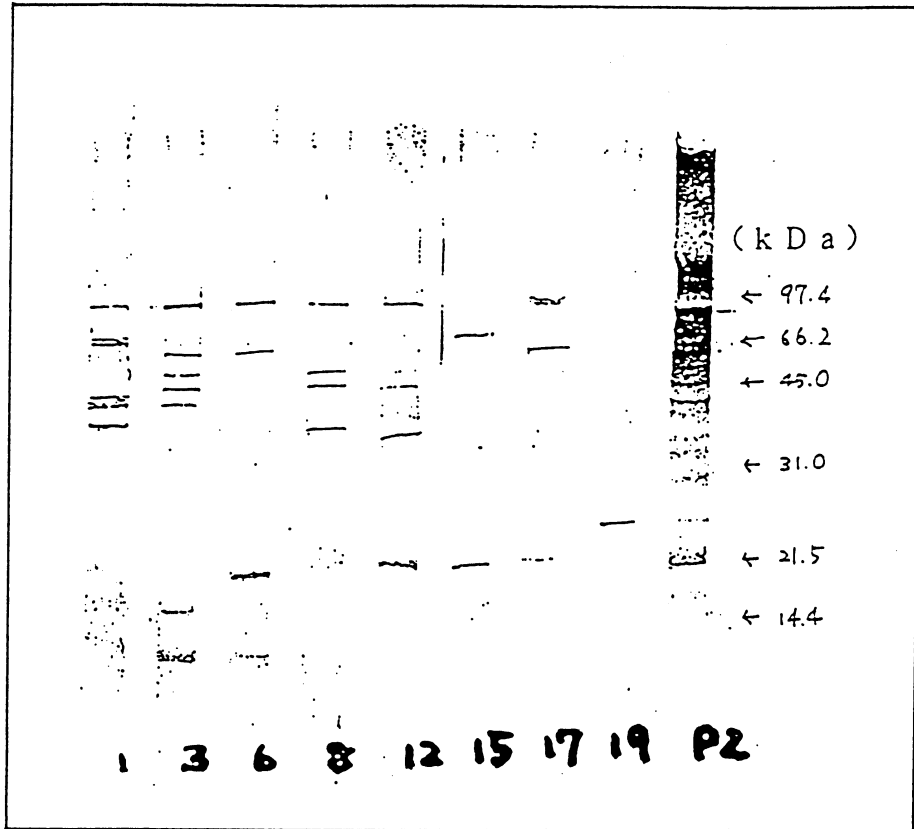


圖 4

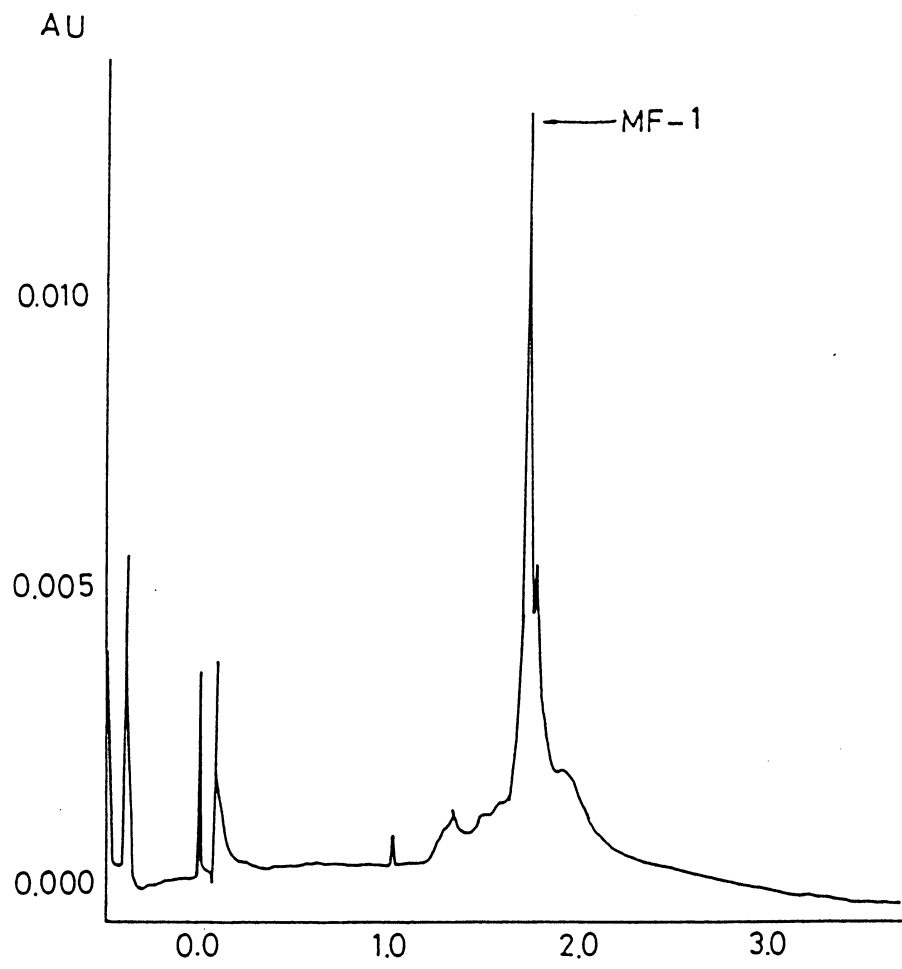


圖 5

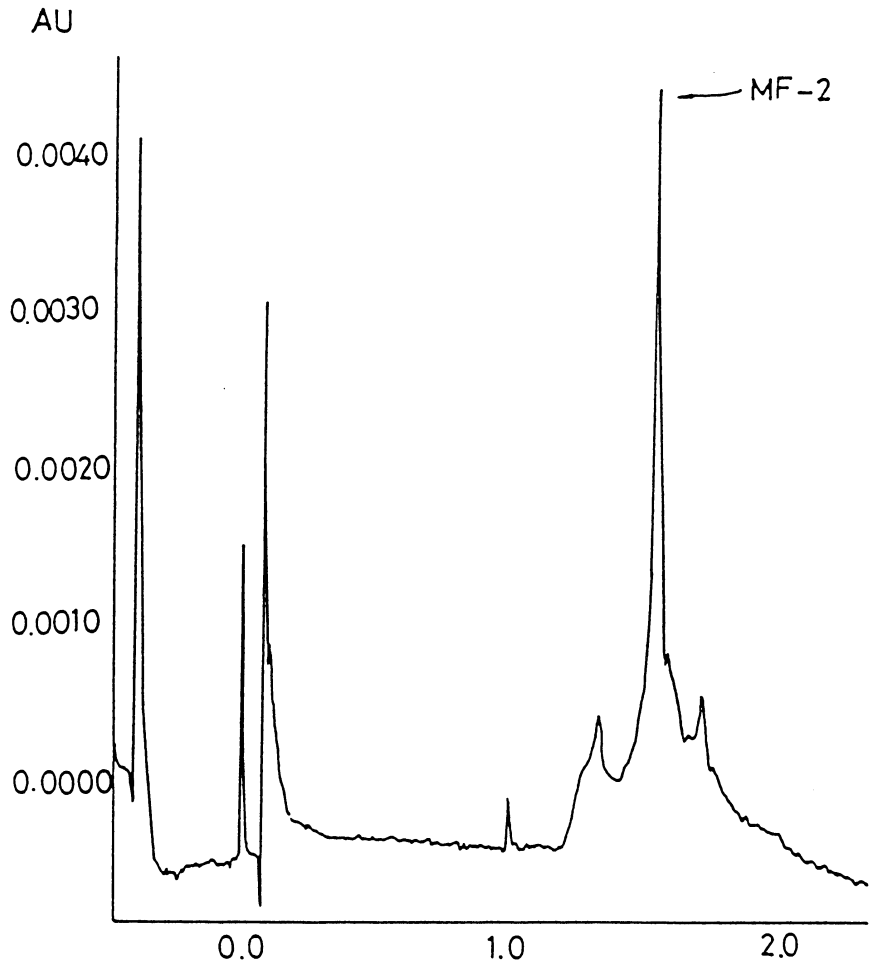


圖 6

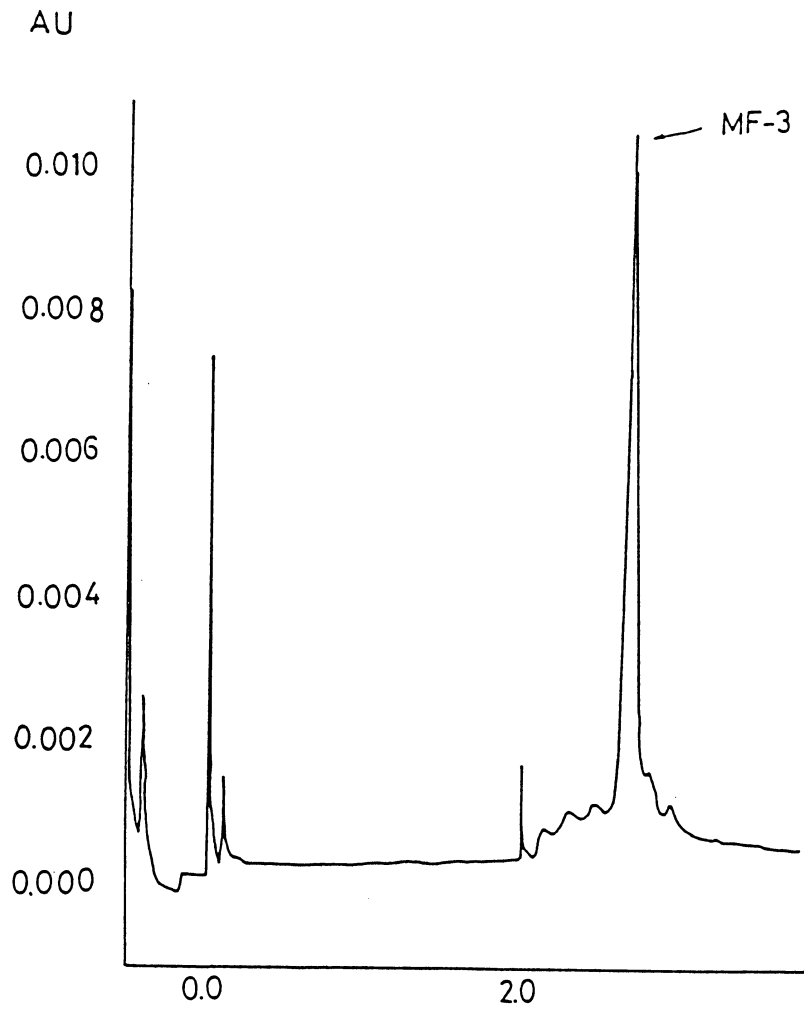


圖 7

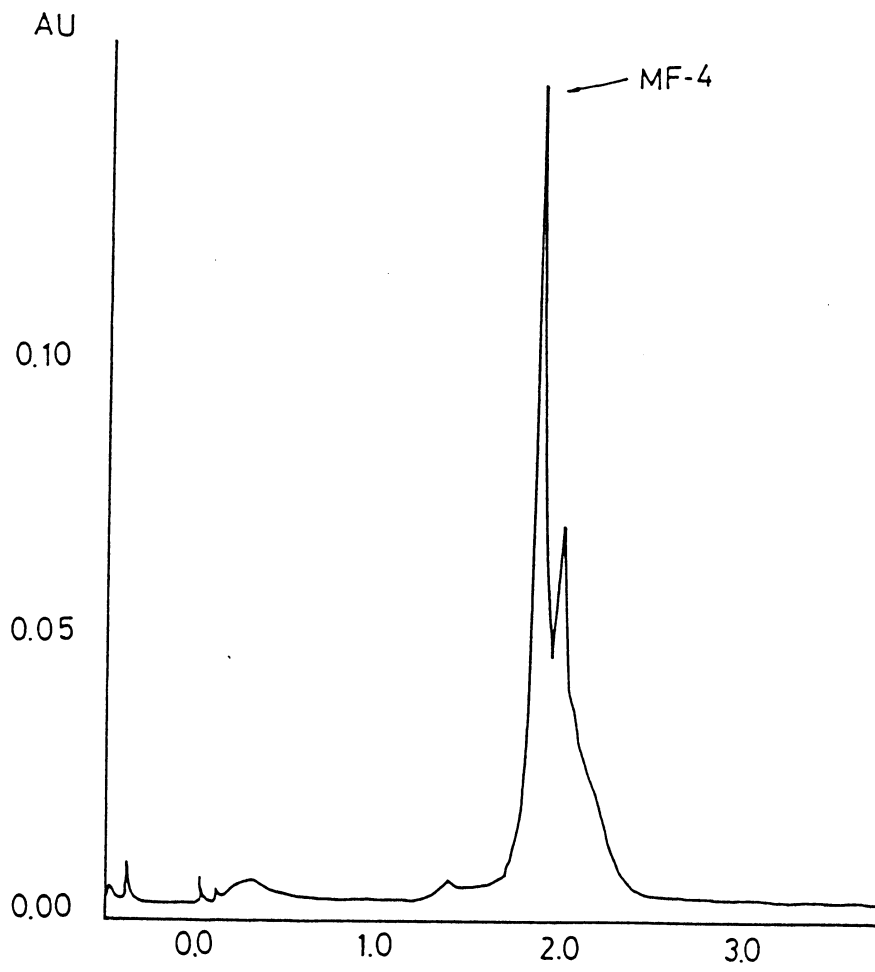


圖 8

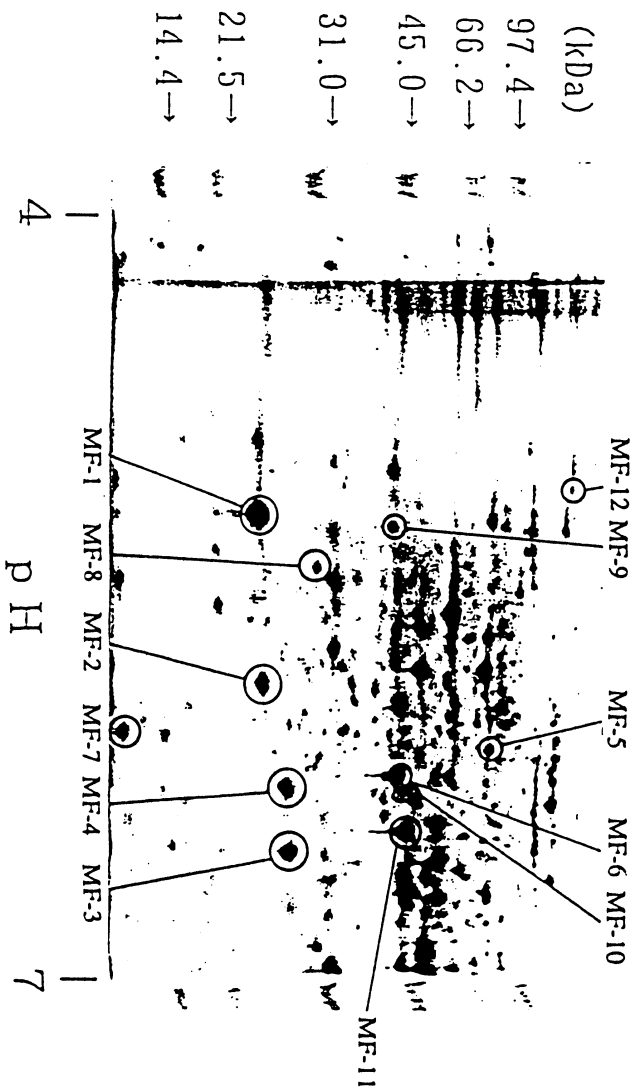


圖 9

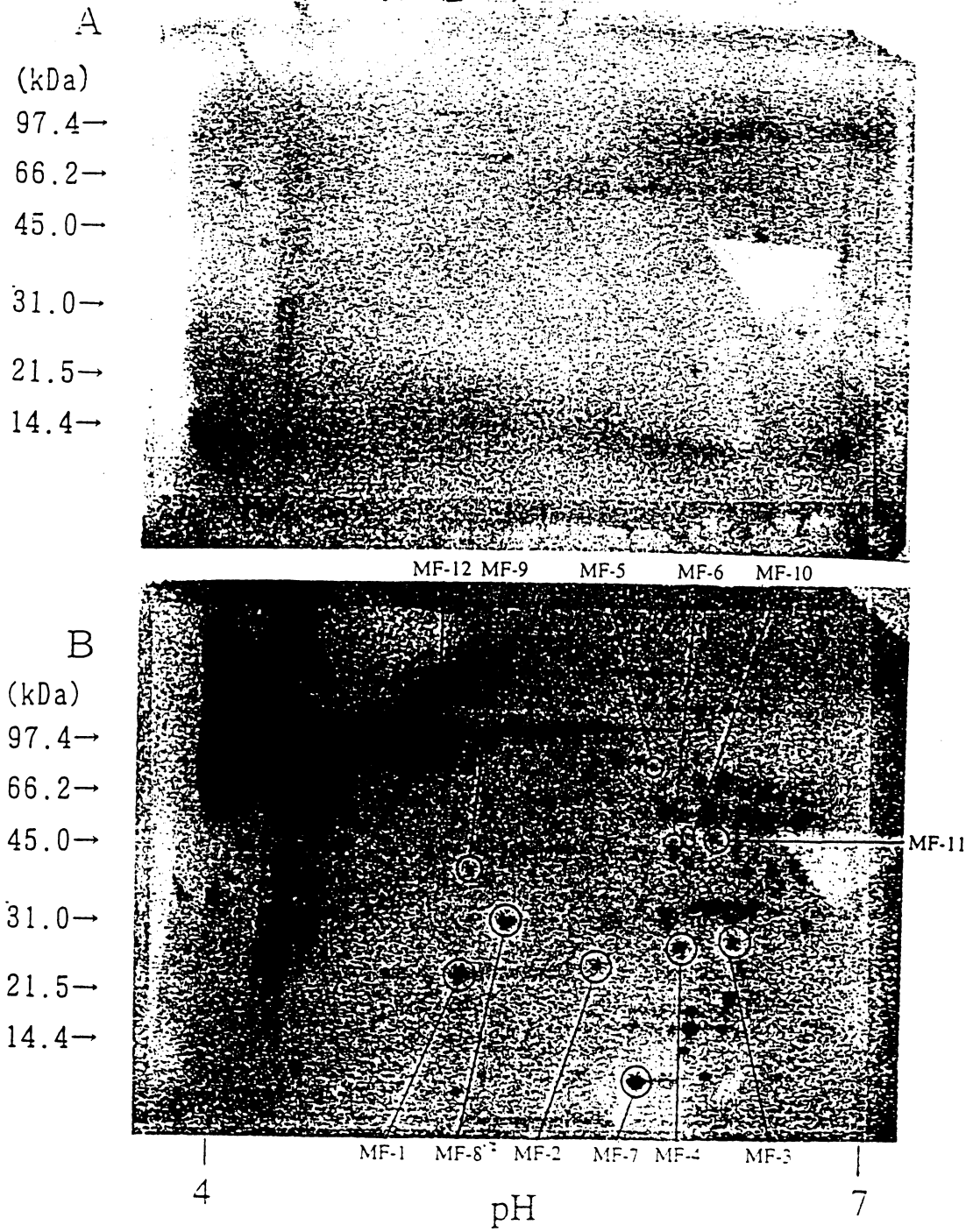


圖 10

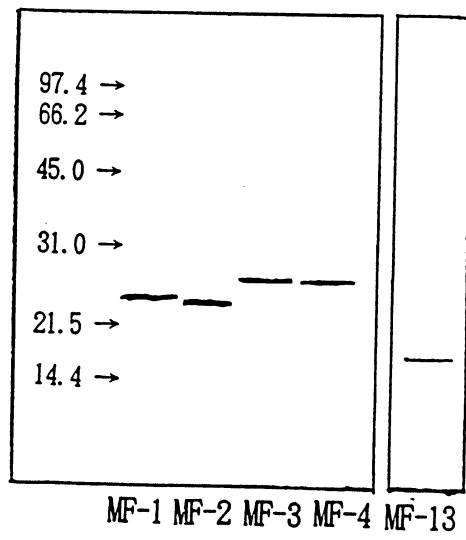


圖 11

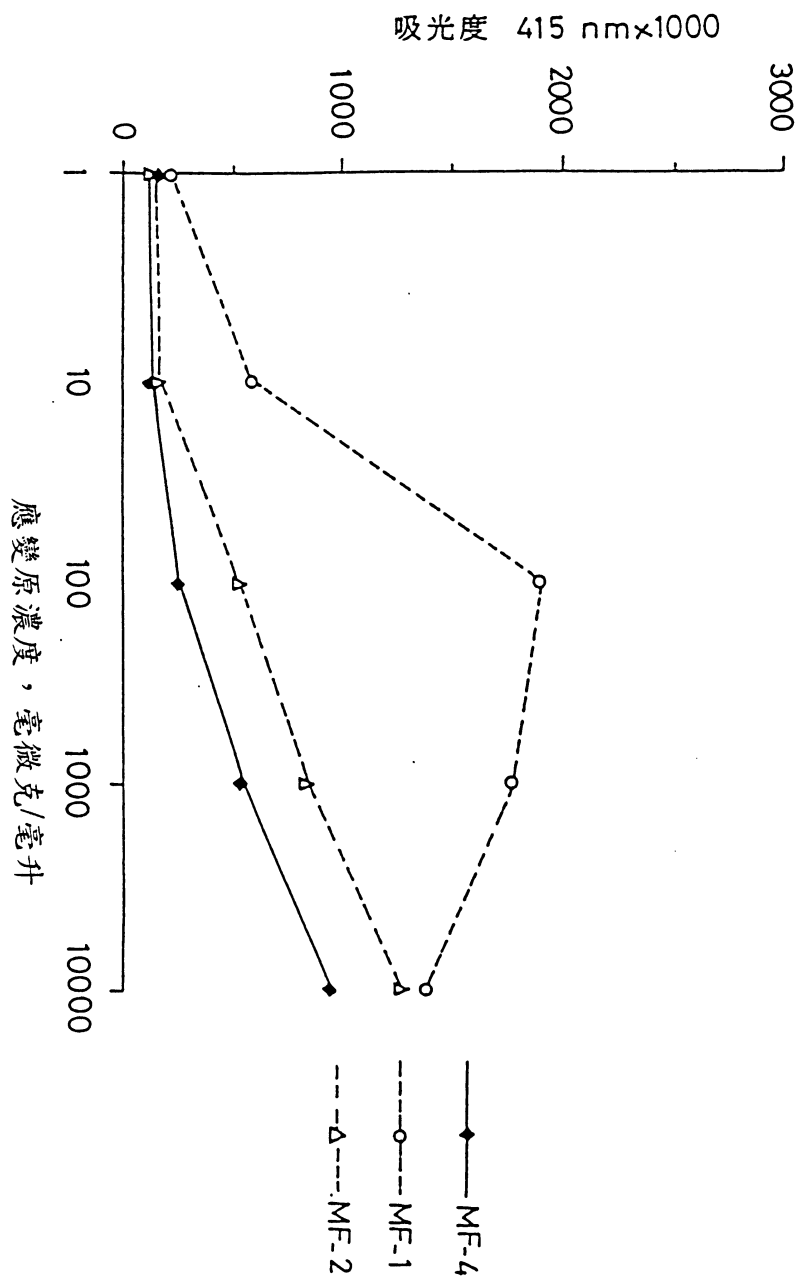


圖 12

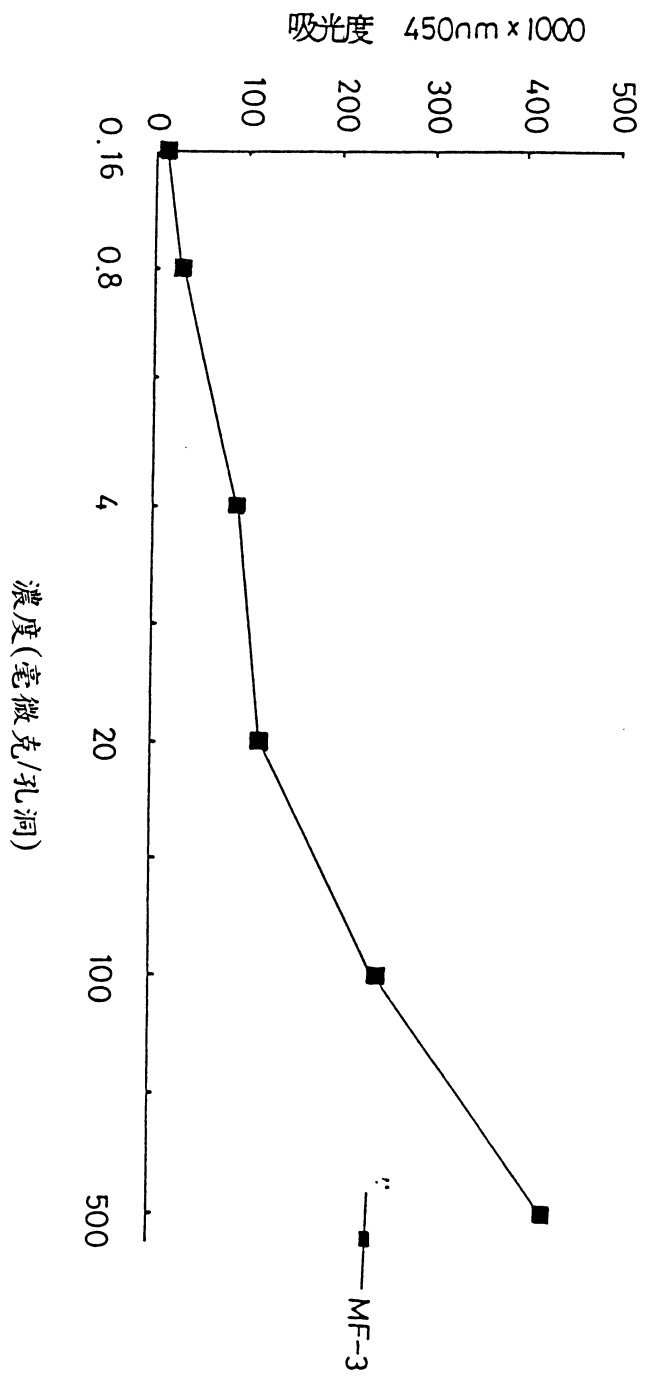


圖 13



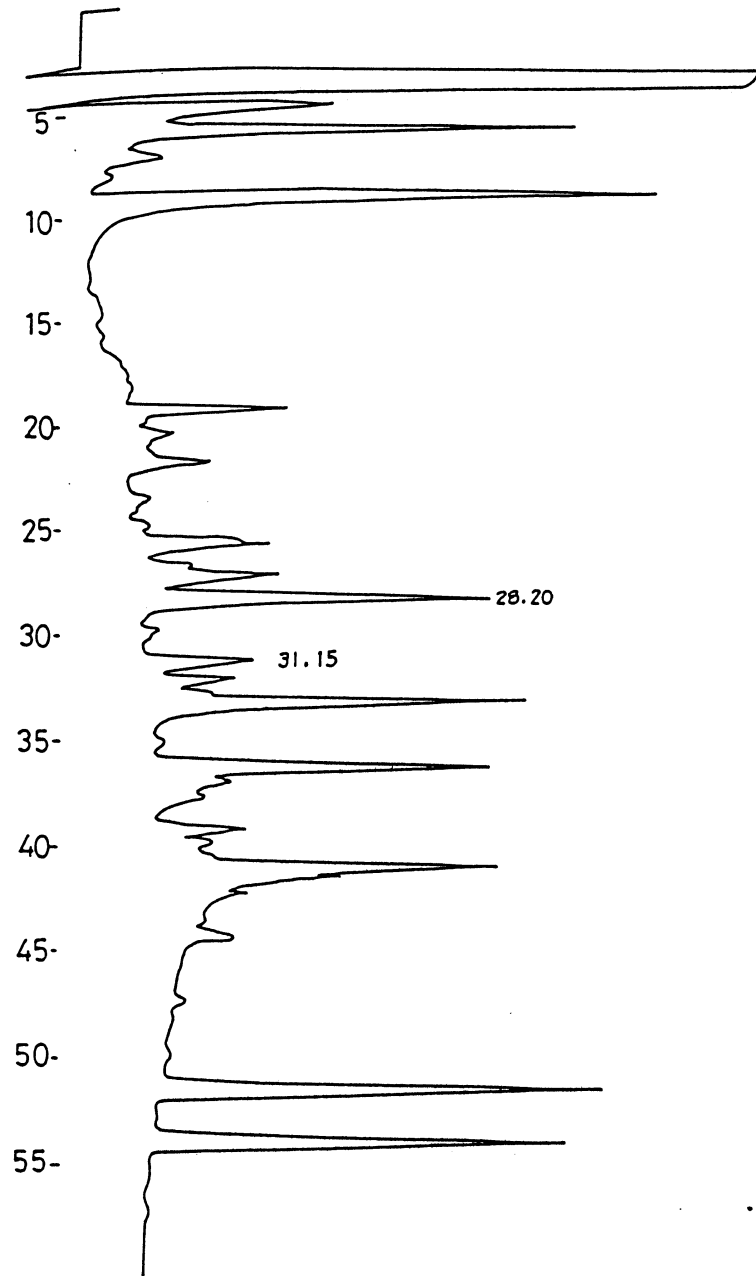


圖 15

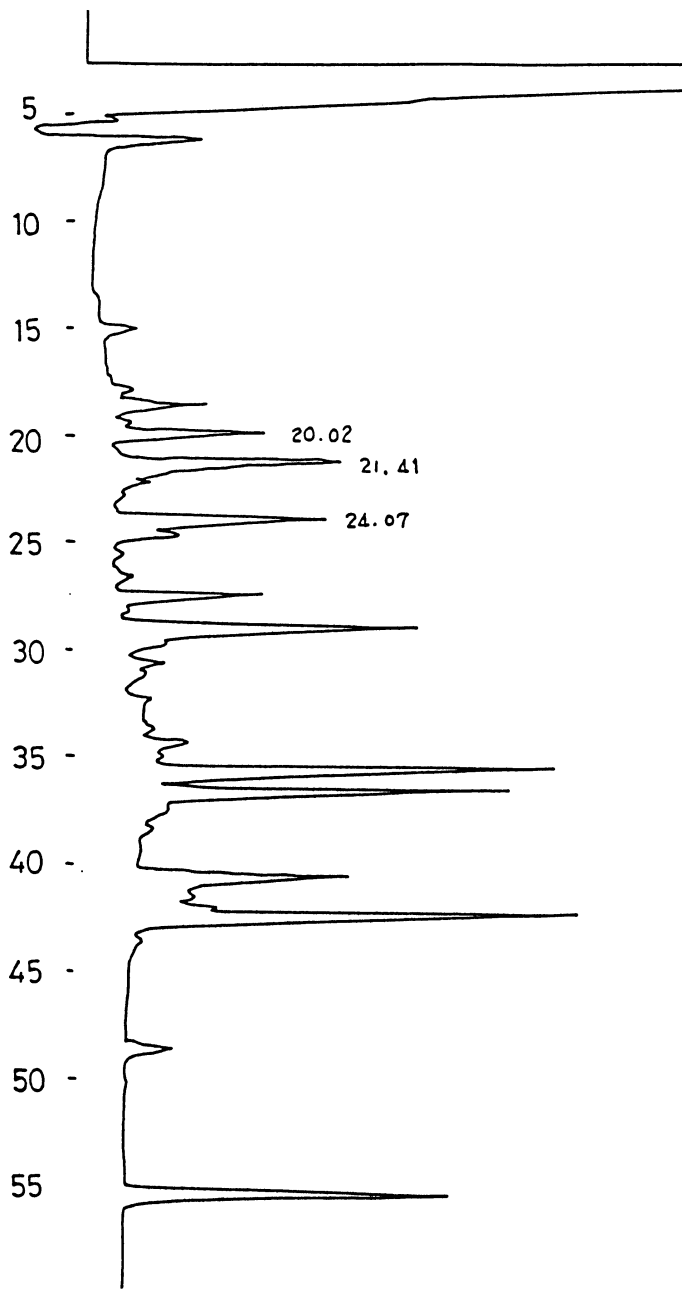


圖 16



1	TTCTG---	50
-1	TTTGAAGAT-TTTTGA	43
51	GTACGACA	120
49	GTACGACA	38
101	ACA	150
99	ACA	148
151	GTTCAGCGGCA	200
149	GTTCAGCGGCA	138
201	CGGCA	250
199	CGGCA	248
251	ACCTGCCA	300
249	ACCTGCCA	298
301	ATCTGAA	350
299	ATCTGAA	348
351	GAA	400
349	GAA	398
401	ACACC	450
399	ACACC	448
451	CAGACCA	500
449	CAGACCA	498
501	GCCTCT	550
499	GCCTCT	548
551	AGTACG	600
549	AGTACG	598
601	AAGCC	650
599	AAGCC	648
651	CCCTGT	700
649	CCCTGT	698
701	CCAGT	750
699	CCAGT	748
751	TTCC	800
749	TTCC	798
801	CCTCCC	850
799	CCTCCC	848
851	CCGAC	900
849	CCGAC	898
901	CCCTAA	950
899	CCCTAA	948
951	AAGC	1000
949	AAGC	998
1001	AAAAAAAA	1050
999	AAAAAAAA	1048

MF-1	1	GCCTGGTGATCCTACTGCTACTGCCAAGGGTAACGAGATCCCCGACACCC	50
MF-2	-1	. . C-GGAAAT--TG--GCT-C-G--A-----CGA--TCCCC-A-ACGC	48
	51	T-CATGGGC-TACATCCCCTGGA-CCCCGGAGCTCGA---CTCGGGTGAG	100
	49	TACGTTTGCATACGTGCCGTACAGCCCCG-AGCTCGAGGAC-CACAA-AG	98
	101	GTGTGTGGTATCCCCACCACCTTCAAGACCCGCGACGAG-TGGAAGGGCA	150
	99	-TGTGTGGCATGCCGACGAGCTTCCAGAGCCACGA-GCGCTGGAAGGGCA	148
	151	AGAAGGTGTGATTGTCTCGAT-CCCGGGTGCCTACACCCCCATC-TGCC	200
	149	AGAAGGTGTGATTGTCTCGGTGCCCGG-TGCGTTCACGCCGA-CGTGC-	198
	201	ACCAGCAGCAC-ATCCCCCGCTTGTGAAGCGTGTG----GAT---G-AG	250
	199	ACC-GC-GAACCATGTGCC-GCC-GT-A--CGTG-GAAAAGATCCAGGAG	248
	251	CTCAAG-GCCAAGGGTGTGACGCCGT-GTACGTCAT-TGCGTCAACGA	300
	249	CTCAAGAGC-AAGGGCGTGCAGAGGTGCGTG-GTGATCT-CGGCGAACGA	298
	301	CCCCTTCGT-CATG-GCTGCCTGGGGCA--ACTTCAA-CAACGCCAAGGA	350
	299	CCCGTTGCTGC-TGAGC-GCATGGGGCATCAC--CGAGCA-CGCCAAGGA	348
	351	CAAGGTCGTC-TTTGC-CACCGACATGACCTG-GCCTTCTCCAAGGCTC	400
	349	CAACCT-GACGTTTGCAG-GACGTCAAC-TGCGAGTCTCCAAG-CAC	398
	401	TCGG-CGCGACGATCGACCTGAGCGCC-AAG--CACTTTGG--TGAGCGC	450
	399	TTTAACGCGACGCTGGACCTGT-CGTCAAGGGCA-TG-GGCCTG--CGC	448
	451	ACGGCCCGCTACGCTCTGATCATTGA-CGACAACAAGATTGTGCA---CT	500
	449	ACCGCGCGCTACGCGCTGATCGC-GAACGACCTCAAG---GTCGAGTACT	498
	501	TTG-CTTCGGACGAGGGCGA-CACTGGCAAGCTCCAGAACCGCTCGATCG	550
	499	TTGGCATCG-ACGAGGGCGAGC-C-G--AAGC---AGT-CG--TCGGCCG	548
	551	AC-ACGATCCTCACCAGGTCTAAAATGGCGCATGTGCGT--TGT-GTGA	600
	549	-CGACGTGCTGAGCAAGCTGTAG--TGCCG--T-T-C-TACT-TAGTCA	598
	601	CCACTACCTAAAGGGTCCGTAGAGT-TCCAAGTCAAGTCGTATATTTTTT	650
	599	--A--AC--AA----TC-G--G-GTAT--A-GTC--G-CGTA-A-----	648
	651	TTTTAAAAAAAAA.....	700
	649	----AAAAAAA.....	698

圖 19



No.	胺基酸序列	殘基數	HPLC 滯留時間(分)
1	PGDPTATAKGNEIPDT	16	23.5
2	ATAKGNEIPDTLMGY	15	32.4
3	NEIPDTLMGYIPWTPPEL	17	44.0
4	TLMGYIPWTPPELDSG	15	40.8
5	IPWTPPELDSGEVCGI	15	39.4
6	ELDSGEVCGIPTTFK	15	33.0
7	EVCGIPTTFKTRDEW	15	42.1
8	PTTFKTRDEWKGKKV	15	22.9
9	TRDEWKGKKVVIVSI	15	29.9
10	KGKKVVIVSIPGAYT	15	29.9
11	VIVSIPGAYTPICHQ	15	34.0
12	PGAYTPICHQQHIPPLV	17	44.6
13	PICHQQHIPPLVKRV	15	27.7
14	QHIPPVVKRVDELKA	15	29.9
15	LVKRVDELKAKGVDA	15	23.3
16	DELKAKGVDAVYVIA	15	31.3
17	KGVDVAVYVIASNDPFVM	17	39.8
18	VYVIASNDPFVMAAW	15	43.2
19	SNDPFVMAAWGNFNNA	16	39.1
20	VMAAWGNFNNAKDKV	15	30.4
21	GNFNNAKDKVVFATD	15	26.8
22	AKDKVVFATDIDLAF	15	37.4
23	VFATDIDLAFSKALG	15	39.6
24	IDLAFSKALGATIDL	15	40.3
25	SKALGATIDLSAKHF	15	29.8
26	ATIDLSAKHFGERTA	15	26.3
27	SAKHFGERTARYALI	15	28.4
28	GERTARYALIIDDNK	15	27.5
29	RYALIIDDNKIVDFA	15	35.7
30	IDDNKIVDFASDEGD	15	29.3
31	IVDFASDEGDTGKLO	15	28.1
32	SDEGDTGKLONASID	15	22.6
33	TGKLONASIDTILYKV	16	34.8

HPLC分析條件: TSK-ge10DS4.6  $\phi \times 250\text{mm}$ 、UV210nm、0 $\rightarrow$ 60%含0.5% TFA

乙腈之60分鐘線性梯度溶離、1.0毫升/分、40°C

圖 21

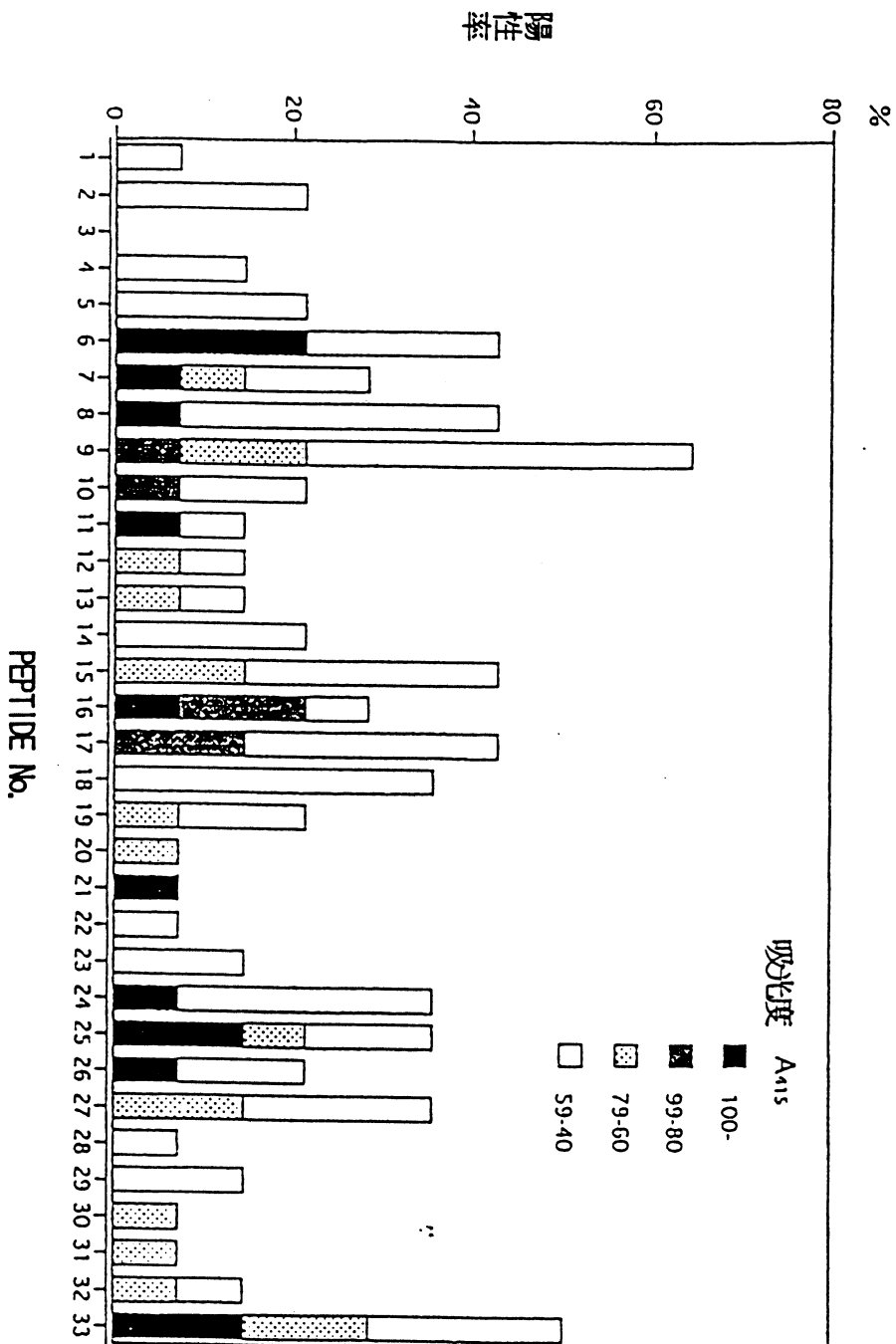


圖 22

ADNA	1	AGACAGCAGGGACATGGTTT	TAGAAGCACAATTCGCGGTAGCTGGCGCTGAAGCGATACTC	60
cDNA	1			1
	61	GCTGAGAAATTCACTTT	CCCCCGCTGACGGCCAGACCCCCGAACTGTCCCGAATTACCA	120
	1			1
	121	AGCAAATGCACGTGACGTT	TGTGGAGGCTCGGGGATTATCAGGCCACGTATCAGTGAGCC	180
	1			1
	181	GAGCACCGCTGGCTTCGG	CTGGCTGCATATAAAGCCGGTGGGCCGTGCTCACAGCTTC	240
	1			1
	241	ATCTTCCACGACAATCATT	ATGCCTGGTGTAGGTACCGGAAGTGACACGCATGCTGACC	300
	1		M P G	1
	301	ATCAGGATCCTACTGCTACT	GCCAAGGGTAACGAGATCCCCGACACCCTCATGGGCTACA	360
	1		D P T A T A K G N E I P D T L M G Y	18
	361	<u>TCCCCTGGACCCCGGAGCT</u>	<u>CGACTCGGGTGAGGTGTGTGGTATCCCCACCACCTTCAAGA</u>	420
	19	I P W T P E L D S G E V C G I P T T F K		38
	421	<u>CCCGCAGCAGTGGGAAGGG</u>	<u>CAAGAAGGTTGTGATTGTCTCGATCCCGGTGCCTACACC</u>	480
	39	T R D E W K G K K V V I V S I P G A Y T		58
	481	<u>CCATCTGCCACCAGCAGCA</u>	<u>CATCCCCCGCTTGTGAAGCGTGTGGATGAGCTCAAGGCCA</u>	540
	59	P I C H Q Q H I P P L V K R V D E L K A		78
	541	<u>AGGGTGTGACGCCCGTGT</u>	<u>ACGTTCATGCGTCAAGCACCCTTCGTCAATGGGTATGTA</u>	600
	79	K G V D A V Y V I A S N D P F V M		95
	601	GCTCTGTCATTTCTTTAT	GCTAACCGACAGCTGCCTGGGCAACTTCAACAACGCCAAGG	660
	95		A A W G N F N N A K	10
	661	<u>ACAAGGTCGTCTTTGCCAC</u>	<u>CGACATTGACCTGGCCTTCTCCAAGGCTTCGGCGCGACGA</u>	720
	11	D K V V F A T D I D L A F S K A L G A T		30
	721	<u>TCGACCTGAGCGCCAAGCA</u>	<u>CTTGGTGAGCGCACGGCCCGCTACGCTCTGATCATGACG</u>	780
	31	I D L S A K H F G E R T A R Y A L I I D		50
	781	<u>ACAACAAGATTGTCGACT</u>	<u>TTGCTTCGGACGAGGGCGACACTGGCAAGCTCCAGAACCGGT</u>	840
	51	D N K I V D F A S D E G D T G K L Q N A		70
	841	<u>CGATCGACACGATCCTCAC</u>	<u>CAAGGTCTAAAATGGCGCATGTGCGTTGTGTGACCACTACC</u>	900
	71	S I D T I L T K V *		80
	901	<u>TAAAGGTCGGTAGAGTTC</u>	<u>CAAGTCAAGTCGTATATTTTTTTTTACAGGATGGTGTGTA</u>	960
	80			80
	961	CTGCCACCTGCCTTTGAG	CAAGGCGTGCCAG	991
	80			80

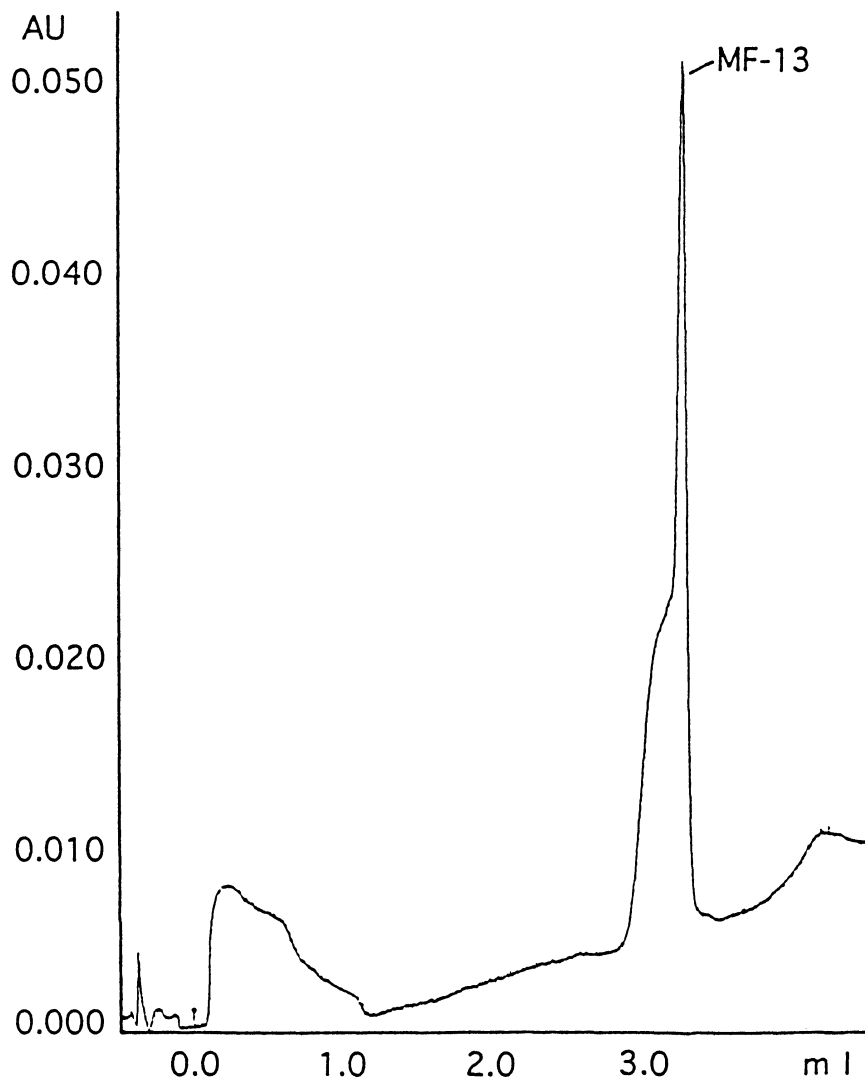


圖 24

申請日期	85. 12. 12
案 號	085115374
類 別	C07K14/37, C12N <sup>15/31</sup> , G01N <sup>33/53</sup>

92.8.01 修正  
年 月 日 補充

本  
A4  
C4  
公告本

(以上各欄由本局填註) A61K 39/35

中文說明書替換頁(92年8月)

發 明 專 利 說 明 書		565567
發 新 型		
一、發明 名稱	中 文	得自鱗斑霉菌(Malassezia)之抗原性蛋白質
	英 文	ANTIGENIC PROTEIN ORIGINATING IN MALASSEZIA
二、發明 創作人	姓 名	1. 竹迫 一任 2. 大門 尚志 3. 八木原 朋子 4. 黑田 正伸 5. 大西 佳美 6. 加藤 郁之進 7. 秋山 一男 8. 安枝 浩 9. 山口 英世
	國 籍	均日本
住、居所	住、居所	1. 日本國滋賀縣大津市秋葉台4丁目20番208號 2. 日本國京都府相樂郡木津町木津川台2丁目2番5號 3. 日本國滋賀縣彥根市中藪町601番地1號 4. 日本國滋賀縣大津市瀨田2丁目1番15號 5. 日本國京都府京都市伏見區下板橋町598番地1號 6. 日本國京都府宇治市南陵町1丁目1番150號 7. 日本國神奈川縣川崎市宮前區樺平1丁目 10番402號 8. 日本國神奈川縣相模原市櫻台18番地1號 9. 日本國神奈川縣川崎市多摩區栗谷2丁目15番5號
	姓 名 (名稱)	日商寶酒造股份有限公司
三、申請人	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	日本國京都府京都市伏見區竹中町609番地
代 表 人 名 姓	大宮 久	

第085115374號專利申請案

承辦人代碼：中文說明書替換頁(92年8月)

A6

B6

(由本局填寫)

大類：

IPC分類：

本案已向：

國(地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995.12.12	7-346627	
日本	1996.9.5	8-257612	
日本	1996.9.5.	8-257613	

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝訂線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(1)

(相關之日本專利案係分別於1995.12.12, 1996.9.5及  
1996.9.5提出申請)

### 技術範圍

本發明係有關以鱗斑霉菌為原因菌之可利用於過敏疾病及感染症之診斷、治療、預防之藉由鱗斑霉菌單離精製之新穎之抗原性蛋白質，其之抗原性片段，對該抗原性蛋白質或抗原性片段之抗體等。

另外，本發明係有關重組之鱗斑霉菌抗原性蛋白質，編碼該抗原性蛋白質之基團，以及其蛋白質之抗原決定部位等。

### 背景技術

過敏疾病中許多由於受其疾病之原因抗原敏化作用，於血清及組織產生對抗原(應變原)特異性之IgE抗體(反應抗體)，藉由再度暴露於其抗原，組合與肥大細胞或鹼性球結合之IgE為特異性之應變原，則IgE於細胞表面上交聯，產生IgE-抗原相互作用之生理學上效果。此等生理學上效果，可舉組織胺、5-羥色胺、肝素、嗜酸性球遊走因子，或各種白三烯素等之放出。因此藉由彼等，引起長期間之支氣管平滑肌之收縮。放出之此等物質，為化學介體，引起由IgE與特定之應變原組合所引起之過敏症狀。應變原之效果透過彼等而顯現。此等效果依抗原進入體內之途徑及於肥大細胞或嗜鹼性球上IgE沈著之樣式而定發生於全身或局部。局部性症狀一般於應變原進入體內之位置之上皮表面發生。全身性效果，為IgE-嗜鹼性球對血管內之抗原應答之結果，過敏性休克為與其典型。於此等一連之反應，採取行竹動者為輔助T(Th)細胞。藉由抗原刺激產生經活

## 五、發明說明(2)

化之Th細胞之種種細胞素中，IL4促進IgE產生。

於人類引起過敏性症狀之物質橫跨多方面，迄今應變原，以代表花粉或室內灰塵之許多物質之集合體處理。近年來，分離精製技術及應變原活性評估法進展之結果，明白應變原為單獨或數種之主要物質為其本體。特別是，於杉花粉、壁蝨、貓應變原等達急速之進步，自杉花粉單離Cry j 1，Cry j 2，自壁蝨單離Der f 1，Der f 2，Der f 3，自貓單離Fel d 1之主要應變原。另外，亦單離編碼彼等之應變原蛋白質之基因，藉基因工程之手法，可大量製備純之應變原蛋白質。

於過敏性疾病之診斷，首先必須鑑定為原因之抗原，為此，首先使用超過100種之市售抗原抽提物，有時對自製者使用可疑抗原抽提物，藉皮內試驗進行試驗。找到作為原因抗原可能性高之抗原，則藉由RAST法等之血清中之IgE抗體價之測定，誘發試驗，或使用全血及淋巴球之組織胺游離試驗，可將抗原特定化。然而，由於於此等抗原抽提物中，無規定明確之力價，所以使用時，有注意所伴隨之誘發過敏性之危險性之必要。過敏疾病之治療法使用抗組織胺藥、類固醇性抗發炎藥、介體游離抑制藥等，但藉由診斷使用經特定化之抗原之減敏療法為優越之治療法。然而，現在之減敏療法將抗原液1週1~2次，各小量投予皮內，經3~4個月增量，提高維持量，必須再連續投予1~3年。若增量為容易，則可期待可容易地得到優越之療效。但是，如前記由於使用之抗原之力價並不清楚，而且，其抗原伴隨許多不純物，所以引起重大之副作用，對使用有

## 五、發明說明(3)

大之限制。

屬於鱗斑霉菌(*Malassezia*，以下略為M.)屬之菌，已知有秕糠狀鱗斑霉(*M. furfur*)(亦稱為瓶形酵母及正圓瓶形酵母)。*M. pachydermatis*，*M. sympodialis*等。據稱鱗斑霉菌常在各種動物及人類之體表，對於其病原性及於過敏疾病之任務，自古即已在研究。對於病原性，懷疑為皮膚炎、癬虱、手包炎、頭皮屑等之原因菌。又，亦懷疑與異位性皮膚炎等之過敏性疾病之關連，關於作為原因菌之可能性高。

現在，得自鱗斑霉菌之抗原抽提物有市售，這些為自秕糠狀鱗斑霉(以下記為*M. furfur*)之培養物所得之未精製或部分精製物，當然，可想為以蛋白質、糖、脂質為始之複雜混合物。

從來，作為含於如此所得之抗原抽提物中之得自鱗斑霉菌之應變原性蛋白質，藉由SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳(PAGE)分離後，藉由使用過敏性患者之血清中IgE抗體之免疫墨點法有檢出之87，76，67，45，37，28，25，14，13 kDa等之許多之IgE結合性蛋白質為應變原性物質之報告(SivJohansson等，*Acta Derm Venereol*，71卷，11-16頁，1991年；E. Jensen-Jarolim等，*J. Allergy Clin Immunol.*，89卷，44-51頁，1992年；Zargari等，*Allergy*，49卷，50-56頁，1994年)。如此，鱗斑霉菌產生之蛋白質，由於跨許多方面，所以只藉SDS-PAGE分離並不充分，於從來所報告之SDS-PAGE之單一蛋白環帶；到底不能認為均一之蛋白質。亦即，SDS-PAGE上，由於顯示為同一

## 五、發明說明(4)

之蛋白環帶之蛋白質通常有複數個存在，所以即使IgE結合性蛋白質顯示單一之蛋白環帶，亦有必要分離含於其環帶中之其他許多蛋白質，為此，有組合其他效果之分離方法之必要。另外，為利用於診斷、治療之目的，將抗原性蛋白質單離，使用複數之患者血清，使明白抗原性、使明白為主要應變原，另外有確立供給蛋白化學上品質明確之抗原性蛋白質用之製造法之必要。為此，藉由層析法，反覆分離、抗原活性之測定，有單離均一且單一之抗原性蛋白質之必要，最後對所得之蛋白質，除了SDS-PAGE之單一性以外，有確認藉由離子交換層析法之單一性、等電點電泳上之單一性之必要。

然而，根據前記各種之報告，於彼等之SDS-PAGE上觀察之物質，好像當作各個單一之IgE結合性蛋白質處理。然而，實際上，於彼等之單離精製，誰也未成功，對於其環帶如何互相無關係，又是否為許多蛋白質之混合物，完全無考察。因而，當然，自其複雜之混合物中單離IgE結合性蛋白質，另外作為單離之蛋白質使用過敏性患者血清，進行抗原性之確認之例全無。另外，有關其蛋白化學上之性質，胺基酸序列全新報告。因此，對於上記之報告所見到之IgE結合性蛋白質相互之異同、關連性(一方為另一方之藉由蛋白質之分解物)等，全不明白。

如此，儘管鱗斑霉菌被作為以異位性皮膚炎為始之過敏性疾病之原因真菌而受注目，自彼等之複雜蛋白質混合物之粗抽提物，單離精製IgE結合性蛋白質，誰也未成功。不用說作為單離之蛋白質，使用過敏性患者血清之抗原性之

## 五、發明說明(5)

確認亦無進行。另外，有關其蛋白質化學上之性質，胺基酸序列全未報告。又，亦無編碼其蛋白質之基因之單離之報告例。

## 發明之揭示

為診斷原因菌之可能性，微生物學上之培養試驗以外，藉使用如上記之為鱗斑霉菌菌體抽提物之粗抗原之皮膚試驗、誘發試驗、RAST法及組織胺游離測定等之各種IgE抗體之定量試驗等進行診斷。然而，由於此粗抗原含多種不純物，所以無法正確診斷。又，使用皮膚試驗，誘發試驗時。有產生副作用等之危險。另外，為使用於為過敏疾病有用之治療法減敏療法，由於伴隨誘發過敏性之危險性，此粗抗原之投予量極度受限，無法期待治療效果，又為預防感染，亦難以利用疫苗。迄今，得自此鱗斑霉菌之經精製之純的抗原之單離並無成功之例子，對受鱗斑霉菌感染及過敏疾病之診斷、治療產生非常大之困難。

從而，考慮此現狀，本發明達成下面之目的。

- (1)本發明之第1目的，提供得自鱗斑霉菌屬之真菌之實質上為純的，經單離之抗原性蛋白質，亦即經精製之鱗斑霉菌應變原，較佳為對鱗斑霉菌過敏患者之主要應變原，使明白彼等之蛋白化學上之性質。另外，亦提供具有與該抗原性蛋白質免疫學上同等之性質之機能性同等之抗原性蛋白質。
- (2)本發明之第2目的，為提供具有含於此等經精製之抗原性蛋白質之抗原決定部位之抗原性片段。
- (3)本發明之第3目的為提供對於前記之抗原性蛋白質或抗原

## 五、發明說明(6)

性片段之抗體或抗體片段。

(4)本發明之第4目的為提供以前記之抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之以鱗斑霉菌為原因菌之過敏疾病等之疾病之診斷藥。

(5)本發明之第5目的為提供以前記之抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之以鱗斑霉菌為原因菌之過敏疾病等之疾病之診斷藥。

(6)本發明之第6目的為提供鱗斑霉菌應變原之免疫學上定量方法。

(7)本發明之第7目的為提供具與前記(1)之精製抗原性蛋白質同等之免疫學上性質之新穎之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

(8)本發明之第8目的為提供新穎之重組之編碼鱗斑霉菌抗原性蛋白質之聚核苷酸。

(9)本發明之第9目的為提供具有含於重組之鱗斑霉菌抗原性蛋白質之抗原決定部位之抗原性片段。

(10)本發明之第10目的為提供特異性地結合於前記重組之鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段之抗體或抗體片段。

(11)本發明之第11目的為提供與前記聚核苷酸雜交之合成寡核苷酸探針或合成寡核苷酸引子。

(12)本發明之第12目的為提供以前記重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之診斷藥。

(13)本發明之第13目的為提供以前記重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之治療藥。

## 五、發明說明(7)

本發明者等以單離有用於過敏患者之診斷、治療之鱗斑霉菌應變原為目的，著眼於為屬於鱗斑霉菌屬之一菌株之秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之菌體內之成分，使用用菌體抽提物之粗抗原之皮膚試驗為陽性，RAST陽性之患者血清探索之結果，成功地單離命名為MF-1~13之13種抗原性蛋白質，同時對於此等抗原性蛋白質之任何一者，亦成功地決定部分胺基酸序列。又，使用基於單離之鱗斑霉菌抗原性蛋白質之部分胺基酸序列之資訊，成為合成之引子之聚核苷酸，以來自秕糠狀鱗斑霉菌之mRNA之cDNA為材料，進行聚合酶·鏈·反應(PCR)，得編碼作為目的之鱗斑霉菌抗原性蛋白質之基團之一部分。其次，用此PCR片段之全部或一部分為探針，自秕糠狀鱗斑霉菌細胞之cDNA基因庫，單離作為目的之基因。又，基於MF-1之胺基酸序列，合成重疊肽，使用此，對於患者血清之IgE抗體進行抗原決定部位之檢索，進行對MF-1單源抗體之抗原決定部位之檢索，明白可找到T細胞抗原決定部位及B細胞抗原決定部位，完成本發明。

亦即，本發明之一型態係有關以對於得自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能為特徵之得自鱗斑霉菌屬之真菌之實質上為純的、經單離之抗原性蛋白質或其之抗原性片段。

本發明之其他型態，係有關以具有與本發明之單離精製之抗原性蛋白質同等之免疫學上之性質為特徵之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其之抗原性片段。

本發明之其他型態係有關編碼本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其之抗原性片段之聚核苷酸。

## 五、發明說明(8)

本發明之其他型態係有關對本發明之單離精製之抗原性蛋白質或其之抗原性片段或本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其之抗原性片段之抗體或抗體片段。

本發明之其他型態係有關與本發明之聚核苷酸雜交之合成寡核苷酸探針或合成寡核苷酸引子。

本發明之其他型態係有關以本發明之單離精製之抗原性蛋白質或其之抗原性片段，或本發明重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其之抗原性片段為有效成分為特徵之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之診斷藥。

本發明之其他型態係有關以本發明之單離精製之抗原性蛋白質或其抗原性片段，或本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其抗原性片段，為有效成分為特徵之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之治療藥。

本發明之其他型態係有關以本發明之單離精製之抗原性蛋白質或本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質為鱗斑霉菌應變原之標準品，以使用對於該抗原性蛋白質之抗體進行鱗斑霉菌應變原之免疫學上定量為特徵之鱗斑霉菌應變原之定量方法。

## 附圖之簡單說明

第1圖為顯示鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之藉由Mono Q之層析法之結果之圖。

第2圖為顯示對於鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之藉由Mono Q部分，與患者血清中之IgE抗體之結合性之圖。

第3圖為於鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之藉由Mono Q部分之SDS-PAGE後，進行CBB染色之電泳圖。

## 五、發明說明(9)

第4圖為於鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之藉由Mono Q部分之SDS-PAGE後，進行免疫墨點法之電泳圖。

第5圖為表示藉由Mono Q層析法之MF-1之圖峯之圖。

第6圖為表示藉由Mono Q層析法之MF-2之圖峯之圖。

第7圖為表示藉由Mono Q層析法之MF-3之圖峯之圖。

第8圖為表示藉由Mono Q層析法之MF-4之圖峯之圖。

第9圖為鱗斑霉菌粗抗原2782之二次元電泳之照片，藉由克馬西亮藍色染色檢出蛋白質。

第10圖為鱗斑霉菌粗抗原2782之二次元電泳之照片，使用健康正常者IgE抗體(A)及過敏患者IgE抗體(B)，藉由免疫墨點法檢出墨點。

第11圖為MF-1、MF-2、MF-3、MF-4及MF-13之SDS-PAGE(還原條件下)之電泳相片。

第12圖為表示抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4之IgE結合性之濃度依賴性之圖。

第13圖為表示MF-3之IgE結合性之濃度依賴性之圖。

第14圖為表示MF-3之吡啶乙基化物之藉由HPLC之精製之圖。

第15圖為表示MF-2(吡啶乙基化物)之離胺醯肽鏈內切酶消化物之HPLC分析結果之圖。

第16圖為表示MF-3(吡啶乙基化物)之離胺醯肽鏈內切酶消化物之HPLC分析結果之圖。

第17圖為2種MF-5 cDNA之核苷酸序列之比較圖。

第18圖為2種MF-6 PCR片段之核苷酸序列之比較圖。

第19圖為MF-1 cDNA與MF-2 cDNA之核苷酸序列之

## 五、發明說明( 10 )

比較圖。

第20圖為MF-3 cDNA與MF-4 cDNA之核苷酸序列之比較圖。

第21圖為MF-1重疊之肽之胺基酸序列。

第22圖為MF-1重疊之肽與秕糠狀鱗斑霉菌RAST陽性患者血清之反應。

第23圖為MF-1 cDNA與MF-1基因組DNA之比較圖。

第24圖為表示藉由Phenyl Superrose層析法之MF-13之圖峯之圖。

為實施本發明之最佳形態

以下就本發明加以詳細說明。

(1)本發明之精製抗原性蛋白質及與其機能上同等之抗原性蛋白質

本發明之抗原性蛋白質為以對來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能為特徵之來自鱗斑霉菌屬之真菌之實質上為純的、經單離之抗原性蛋白質(以下，有時只略為「來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質」、或「精製抗原性蛋白質」)。於此，「實質上為純的、經單離」係指作為蛋白質實質上為均一的，實質上不含其他之不純之蛋白質，於SDS-PAGE及於等電點電泳皆被認為單一之物質之經單離之蛋白質。

又，本發明之精製抗原性蛋白質為以對於鱗斑霉菌粗抗原皮膚反應為陽性之過敏疾病患者反應之來自鱗斑霉菌之主要應變原為特徵之蛋白質。

又，本發明之精製抗原性蛋白質為存在於鱗斑霉菌屬之

## 五、發明說明 ( 11 )

真菌細胞內之抗原性蛋白質。

又，本發明之精製抗原性蛋白質為以具有由來自過敏疾病患者之IgE抗體，尤其是來自鱗斑霉菌過敏疾病患者之IgE抗體所識別之抗原決定部位為特徵之蛋白質。

又，作為為得本發明之精製抗原性蛋白質所用之菌株，只要為屬於鱗斑霉菌之菌株之任何菌株皆可，作為其具體實例可舉例如秕糖狀鱗斑霉菌TIMM2782株。

於本說明書中所謂來自鱗斑霉菌之主要應變原為與鱗斑霉菌過敏患者(對於為市售之鱗斑霉菌粗抗原之抗原抽提物皮膚反應為陽性之過敏疾病患者)之50%以上反應之由IgE抗體識別之精製抗原性蛋白質。

於本說明書中所謂之來自過敏疾病患者之對於IgE抗體之結合能，係指藉使用<sup>125</sup>I標記抗IgE血清之RAST法使用酵素標記IgE血清之直接-RAST RIA法及ELISA法測定，與標準血清等比較，可得更有意性之結合。

本發明之來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質為分子量10000~100000(SDS-PAGE，還原條件下或非還原條件下)，等電點(未變性下或8M尿素變性下)為4~10，存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內者。具體言之，可舉以下之MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-8、MF-9、MF-10、MF-11、MF-12、MF-13。以下，對於這些就分子量、等電點、部分胺基酸序列陳述。

(I)MF-1含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約21 kDa，於非還原條件下顯示約40 kDa之分子量，未變性下

## 五、發明說明 ( 12 )

之等電點約4.8及8M尿素變性下之等電點約5.3，以序列表之序列編號：45表示之胺基酸序列。

(II)MF-2含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約20 kDa，於非還原條件下顯示約40 kDa之分子量，未變性下之等電點約4.8及8M尿素變性下之等電點約5.8，以序列編號：46，序列編號：47及序列編號：48表示之胺基酸序列，N末端受封阻。

(III)MF-3含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約27kDa，非還原條件下亦約27kDa之分子量，未變性下之等電點約5.2及8M尿素變性下之等電點約6.5，以序列編號：49，序列編號：50及序列編號：51表示之胺基酸序列，N末端受封阻。

(IV)MF-4含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約26kDa，非還原條件下亦約26kDa之分子量，未變性下之等電點約5.2及8M尿素變性下之等電點約6.3，以序列編號：52表示之胺基酸序列。

(V)MF-5含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約66kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約6.1，以序列編號：53表示之胺基酸序列。

(VI)MF-6含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約43kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約6.2，以序列編號：54表示之胺基酸序列。

(VII)MF-7含藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約15kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約6.0，以序列編號：55表示之胺基酸序列。

## 五、發明說明 ( 13 )

(VIII)MF-8為藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約30kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約5.4，N末端受封阻。

(IX)MF-9為藉由SDS-PAGE，於還原條件下，顯示約40kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約5.3。

(X)MF-10為藉由SDS-PAGE，於還原條件下，顯示約44kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約6.2，以序列編號：56表示之胺基酸序列。

(XI)MF-11為藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約45kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約6.4，N末端受封阻。

(XII)MF-12為藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約100kDa之分子量，8M尿素變性下之等電點約5.0。

(XIII)MF-13含，藉由SDS-PAGE，於還原條件下顯示約16kDa之分子量，未變性下之等電點約8.1，以序列編號：57表示之胺基酸序列。

作為本發明之來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質，只要為來自鱗斑霉菌作為以人類為始之哺乳類之抗原被識別之蛋白質即可，並不限於上記所示之13種之精製抗原性蛋白質。

另外，使用此等之精製抗原性蛋白質之診斷，與藉由使用為從來之鱗斑霉菌粗抗原之抗原抽提物之皮膚試驗及RAST法之診斷結果相關。亦即，於使用粗抗原之皮膚試驗為陽性之患者中，許多對鱗斑霉菌粗抗原之IgE抗體價為陽性。而，對於此等之粗抗原之IgE抗體價陽性之患者之

## 五、發明說明 ( 14 )

50%以上，對於上記之單離精製之本發明之精製抗原性蛋白質，具高之IgE抗體價(參照於後述之實施例)。

又，本發明之精製抗原性蛋白質，投予鱗斑霉菌過敏患者時，可減輕對於被投予之患者之鱗斑霉菌之過敏反應。

另外，於本發明亦提供具與如前記之精製抗原性蛋白質免疫學上同等性質之機能同等之抗原性蛋白質。例如，作為具與上記13種之精製抗原性蛋白質免疫學上同等性質之機能上同等物，例如各種秬糠狀鱗斑霉菌；另外秬糠狀鱗斑霉菌以外之鱗斑霉菌屬真菌之機能上同等物亦包含於本發明。亦即，MF-2與為過氧化物酶體膜蛋白質之PMP-20 [L. Garrard等，J. Biol. Chem. 第23卷，第13929-13937頁(1989年)]具同質性，具同樣之免疫學上性質之來自鱗斑霉菌之蛋白質含於本發明。又，MF-3及MF-4為不同之蛋白質，任何一者皆與鐵／錳超氧化物歧化酶具同質性 [T. Matsumoto等，Biochemistry，第30卷，第3210-3216頁(1991)；M.L. Ludwig等，J. Mol. Biol.，第219卷，第335-358頁(1991)]，又MF-5與二氫硫辛醯胺脫氫酶(DLDH)，MF-6與蘋果酸脫氫酶(MDH)，MF-13與環啡啉(シクロフィリン)分別具同質性，具有同樣之免疫學上之性質之來自鱗斑霉菌之蛋白質亦含於本發明。

又，為了安定性之加強及／或所望之反應性之加強，亦即自診斷目的而言，加強抗原與抗體之特異性化結合，自治療目的而言，減弱過敏反應或使酵素活性消失。將本發明之精製抗原性蛋白質改變，使成衍生物，使用聚乙二醇(PEG)法 [Wie等，Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.，第64

## 五、發明說明 ( 15 )

卷，第84-99頁(1981)]，可使與PEG結合。蛋白質之改變，包括吡啶基乙基化作用、還原、烷基化作用、醯化、化學性偶聯於適當撐體，溫和之福馬林處理或鹽酸胍處理亦包括在內。

## (2)本發明之抗原性片段

本發明之抗原性片段為以具有包含於前記之精製抗原性蛋白質之抗原決定部位為特徵之來自精製抗原性蛋白質之或抗原性片段。例如，可例示包含至少1個含於MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-8、MF-9、MF-10、MF-11、MF-12、MF-13等之抗原決定部位之來自精製抗原性蛋白質之抗原性片段。其中，可舉含至少1個T細胞抗原決定部位或B細胞抗原決定部位者為較佳者。本發明之抗原性片段中包括引起於哺乳類尤其人類之免疫反應，例如誘發最小量之IgE之刺激、IgE之結合、IgG及IgM抗體之產生，或誘發增殖等之T細胞反應及／或淋巴細胞活素分泌及／或T細胞無反應性衍生等元來自鱗斑霉菌之精製抗原性蛋白質之片段。

以本發明之抗原性片段為治療目的的使用時，T細胞反應性活性化作用小或誘發T細胞無反應性為所望。又，本發明之抗原性片段，對鱗斑霉菌特異性之IgE抗體不具實質上之結合能，於發生結合於IgE抗體之情形，亦以不自肥大細胞或嗜鹼性球游離組織胺等之介體之程度之結合能為佳。亦即，於發生結合於IgE抗體之情形亦以該抗原性片段比來自鱗斑霉菌之精製抗原性蛋白質以實質上較低程度結合於IgE抗體者為佳。如此，本發明之或抗原性片段，於以治療目

## 五、發明說明 ( 16 )

的使用之情形，以具有比精製抗原性蛋白質少之IgE賦活活性者為佳。從而，投予鱗斑霉菌過敏患者之情形，可使減輕經投予患者對鱗斑霉菌之過敏反應。

本發明之抗原性片段之抗原性，於人類之志願者之皮膚試驗、皮內試驗以外，亦可於RAST、ELISA或組織胺游離等之試驗管內試驗評估。

抗原決定部位為由受體尤其抗體(免疫球蛋白)、組織適合性抗原及T細胞受體所識別之基本要素或最小單位，抗原決定部位含供受體識別所必須之胺基酸序列。亦可使用以抗原決定部位之胺基酸序列為模板，可降低對鱗斑霉菌應變原之過敏反應之胺基酸序列作為抗原決定部位。使用有關現在可利用之蛋白質之構造之資訊，對於鱗斑霉菌過敏患者以充分量投予，可設計可能改變患者對鱗斑霉菌之過敏反應之鱗斑霉菌應變原肽。又，亦可設計抑制誘發鱗斑霉菌應變原患者之過敏反應之試藥或藥劑。如此之藥劑，例如，可設計成結合於對於鱗斑霉菌應變原之IgE抗體，自其IgE-應變原結合及防止其後自肥大細胞脫粒。

又，含T細胞抗原決定部位之肽之選擇，將含有自對鱗斑霉菌應變原感受性之個體(具有IgE仲介免疫反應之個體)所得之T細胞之淋巴球，與來自應變原之肽一起培養，測定例如氫化胸苷併入細胞之促進作用，藉由決定反應於肽是否發生T細胞之增殖，可測定人類T細胞之刺激活性(幼若化活性)，含B細胞抗原決定部位之肽之選擇，使用自對於鱗斑霉菌應變原應變性之個體所得之血清，使與來自應變原之肽反應，藉由測定結合之IgE量，可選擇IgE結合肽。

## 五、發明說明 ( 17 )

於本發明之抗原性片段之範圍內，亦含具有與以鱗斑霉菌應變原為始之來自鱗斑霉菌之精製抗原性蛋白質之片段於免疫學上關連、例如由對其之片段特異性之抗體與特異性之T細胞識別之交差反應性之肽。

為製備本發明之抗原性片段，以經單離之精製抗原性蛋白質為原料，藉由離胺醯肽鏈內切酶、胰蛋白酶等之蛋白酶之酵素消化，藉由溴化氰等之化學處理切斷後，將具有目的之抗原性之片段藉由於蛋白質之精製已知之方法，可單離精製。又，使用編碼來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質之基因之一部分，亦可表現、製備目的之抗原性片段。另外，基於有關抗原性片段之化學構造之資訊，亦可利用肽合成技術，藉由化學合成。

又，藉由基因工程之手法，化學合成之手法，亦可置換插入及缺失胺基酸。例如為強化安定性及／或強化所望之反應性，將本發明之抗原性片段改變、衍生化，亦可使至少1個胺基酸缺失、插入、置換、附加。另外，置換成D-胺基酸、非天然胺基酸或非天然胺基酸類似體或將這些附加，可製造本發明範圍內之改變蛋白質或肽。另外，可將本發明之抗原性片段與聚乙二醇結合、化學性修飾。該抗原性片段之改變亦包括還原、烷基化、醯基化或化學性耦聯於適當之撐體。

對於如此所得之抗原性片段，藉由測定免疫反應活性(T細胞反應性活性化作用、T細胞無反應性作用、與抗體之結合作用等)，可決定、單離抗原性片段。

其次，就本發明之精製抗原性蛋白質之製造法加以陳

## 五、發明說明 ( 18 )

述。從來所使用之粗抗原，為培養物之培養濾液之冷凍乾燥物，或將培養菌體以適當方法破碎，得抽提物，將此以硫酸銨沈澱、冷凍乾燥之極有限之方法精製者。本發明者等，以此等粗抗原為原料，嘗試作為蛋白質之精製法之一般所用之方法，例如凝膠過濾、離子交換等之層析法之精製，但只以此等方法，單一之純的抗原性蛋白質之單離，並無成功。

本發明之來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質，以由鱗斑霉菌菌體製備之粗抗原為原料，將使用例如離子交換層析法、螯合物樹脂層析法、疏水性層析法、凝膠過濾層析法等之效果性分離法組合分成各部分後，對於各部分，將與患者血清IgE抗體之結合，藉由RAST法及免疫墨點法等之測定，探索與過敏患者血清中之IgE抗體結合之蛋白質，或使用患者之淋巴球，誘發免疫反應活性(T細胞反應活性化作用、T細胞無反應性作用等)之蛋白質以種種方法探索而可單離。

亦即，首先將秕糠狀鱗斑霉菌等之鱗斑霉菌屬菌使用含添加迪克森(Dixon)培養基等之橄欖油或吐恩(Tween)40、60之適合鱗斑霉菌生育之營養分之培養基，於適當溫度、通氣等之條件下培養，所得之菌體以適當方法破碎之，得抽提物，自此抽提物，使用包括離子交換層析法、螯合物樹脂層析法、疏水性層析法之分離手段，可精製抗原性蛋白質。亦即，藉由使用有關肽及蛋白質之精製之離子交換層析法、疏水性層析法、凝膠過濾層析法、螯合物樹脂層析法、電泳，或使用與對來自鱗斑霉菌之抗

## 五、發明說明 ( 19 )

原性蛋白質或其之或抗原性片段特異性之抗體結合之樹脂之親和性層析法等之已知方法之各種組合，可單離高純度之蛋白質，含於培養濾液中之抗原性蛋白質，亦可藉同樣方法單離。

具體言之，如實施例所示，分子量上不可分離之蛋白質，藉由利用等電點之不同之離子交換層析法及利用疏水性之不同之疏水性層析法，利用與金屬之螯合物能之不同之螯合物樹脂層析法，及利用分子量之不同之凝膠過濾層析法等組合，可互相分離相當相似之多數蛋白質之集合體。此等之事藉由有關從來之SDS-PAGE之免疫墨點法之分子量上之抗原性蛋白質之知見無法預料，例如MF-1與MF-2於分子量上幾乎相同，於從來之SDS-PAGE為不可能分離。又，MF-3與MF-4亦於分子量上不可分離。

另外就各種分離手段之組合陳述具體實例，例示下記之過程。

過程a：將鱗斑霉菌之培養菌體破碎抽提液離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法；和光純藥工業株式會社製)，取得藉0.1M NaCl溶離部份之過程，

過程b：於過程a所得之溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如，Sephacryl S-200 HR管柱層析法；Pharmacia公司製)，取得分子量3~5萬之溶離部份之過程，

過程c：於過程b所得之溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如，交聯葡聚糖G-75超

## 五、發明說明 ( 20 )

細管柱層析法；Pharmacia公司製），取得分子量約4萬之溶離部份之過程，

過程d：於過程c所得之溶離部份進行鋅螯合層析法（例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法；Pharmacia公司製），再將無滯留部份進行銅螯合物層析法，取得無滯留部份或於pH約4溶離部份之過程，

過程e：於過程d所得之無滯留部份或於pH約4溶離之部份濃縮後，以凝膠過濾層析法（例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法；Pharmacia公司製）精製，取得分子量約4萬之溶離部份之過程，及

過程f：於過程e所得之溶離部份再進行Mono Q離子交換層析法精製之過程。

或亦可舉下記過程作為一例。

過程a：將鱗斑霉菌之培養菌體破碎抽提液離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法（例如DEAE-纖維素管柱層析法），取得藉0.1M NaCl溶離部份之過程，

過程b：於過程a所得之溶離部份以超濾膜（MW10,000）濃縮後，進行凝膠過濾層析法（例如，Sephacryl S-200 HR管柱層析法），取得分子量3~5萬之溶離部份之過程，

過程c：於過程b所得之溶離部份以超濾膜（MW10,000）濃縮後，進行凝膠過濾層析法（例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法），取得分子量約4萬之溶離部份之過程，

過程d：於過程c所得之溶離部份進行鋅螯合物層析法（例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法），取得以pH約5溶離之部份之過程，及

## 五、發明說明 ( 21 )

過程g：於過程d所得之溶離部份濃縮後，以凝膠過濾層析法(例如，交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)精製之過程。

其次就本發明之精製抗原性蛋白質(MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、及MF-13)之製造方法之例更詳細說明。然而，以下之過程只為例示，並未受此限制。

## 1. 有關MF-1之製造例

秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液進行離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法)，取得藉0.1M NaCl溶離之部份，以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如Sephacryl S-200 HR管柱層析法)，取得分子量3~5萬之溶離部份，所得溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如，交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)，取得分子量約4萬之溶離部份，接著進行鋅螯合層析法(例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法)，無滯留部份進行銅螯合物層析法，取得以pH約4溶離之部份，濃縮後以凝膠過濾層析法(例如，交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)精製，可取得分子量約4萬之溶離部份。

## 2. 有關MF-2之製造例

秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液進行離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法)，取得以0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如，Sephacryl S-200 HR管柱層析法)，取得分子量

## 五、發明說明 ( 22 )

3~5萬之溶離部份，所得溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)，取得分子量約4萬之溶離部份，接著進行鋅螯合層析法(例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法)，取得於pH約5溶離之部份，濃縮後，以凝膠過濾層析法(例如，交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)精製可得。

## 3. 有關MF-3之製造例

秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液進行離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法)，取得以0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如Sephacryl S-200 HR管柱層析法)，取得分子量3~5萬之溶離部份，所得溶離部份以超濾膜((MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)，取得分子量約4萬之溶離部份，接著進行鋅螯合層析法(例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法)，取得無滯留部份，進行銅螯合物層析法，濃縮無滯留部分後，以凝膠過濾層析法(例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)精製，取得分子量約4萬之溶離部份，再以Mono Q陰離子交換層析法精製可得。

## 4. 有關MF-4之製造例

秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液進行離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法)，取得0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如

## 五、發明說明 ( 23 )

Sephacryl S-200 HR管柱層析法)，取得分子量3~5萬之溶離部份，所得溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，進行凝膠過濾層析法(例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)，取得分子量約4萬之溶離部份，接著，進行鋅螯合層析法(例如鋅螯合瓊脂糖快速流動管柱層析法)，取得無滯留部份後，以凝膠過濾層析法(例如交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法)精製，取得分子量約4萬之溶離部份，再以Mono Q陰離子交換層析法精製可得。

## 5. 有關MF-13之製造例

秕糠狀鱗斑狀霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，其上清液冷凍乾燥後，進行陰離子交換層析法(例如DEAE-纖維素管柱層析法)，收集無吸著部份，進行凝膠過濾層析法(例如超葡聚糖(Superdex)75pg)，取得分子量2萬以下之溶離部份，所得部份進行SP陽離子交換層析法，取得0.2M NaCl之溶離部份，再以凝膠過濾層析法(例如超葡聚糖75pg)精製可得。

又，本發明之來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質，基於前記之胺基酸序列之資訊，以PCR等單離編碼該蛋白質之基因，利用這些藉基因工程手法，併入載體使於大腸菌、酵母、霉菌、哺乳類細胞等表現亦可製備重組蛋白質。

## (3) 對於本發明之精製抗原性蛋白質或其之抗原性片段之抗體或抗體片段

對於來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質或其抗原性片段之本發明抗體，藉由使用該蛋白質之酵素或化學方法之處理所得之抗原性片段，或化學合成上可得之抗原

## 五、發明說明(24)

性肽為抗原可製備。抗體之製作可依習用法進行，例如藉由將上記之蛋白質或其片段與佐劑一起於兔子等動物中免疫，可得抗血清。又，單源抗體，將抗原免疫所得之產生抗體B細胞與骨髓細胞瘤細胞雜交，選擇產生目的抗體之雜交瘤，藉培養此細胞可製備。此等抗體如後述，於抗原性蛋白質之製造及鱗斑霉菌應變原抗原抽提物之力價測定可使用。作為前記之雜交瘤，分別將產生對於抗原性蛋白質MF-1之M-40單源抗體之雜交瘤命名為5B4，產生對於抗原性蛋白質MF-2之M-3單源抗體之雜交瘤命名為8G11或產生對於抗原性蛋白質MF-3之M-1單源抗體之雜交瘤命名為10C1。

(4)以本發明之精製抗原性蛋白質或其抗原性片段為有效成分之診斷藥

本發明提供使用具有來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質或來自其之至少1個之抗原決定部位之抗原性片段之以鱗斑霉菌為原因菌之過敏性疾病或感染症之診斷藥。

於此所述之藉由鱗斑霉菌之過敏疾病係指異位性支氣管氣喘、過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、異位性皮膚炎等，鱗斑霉菌為原因之所有過敏性疾病。又，藉由鱗斑霉菌之感染症係指癩風、鱗斑霉菌毛包炎、頭皮屑等之鱗斑霉菌為原因之所有感染症。

本發明之過敏疾病診斷藥，可作為對於藉由鱗斑霉菌之過敏疾病之皮內反應診斷試藥及過敏診斷用滴定試藥使用。作為皮內反應診斷試藥使用時，將本發明之經單離之精製抗原性蛋白質或本發明之抗原性片段以含酚之生理食

## 五、發明說明 ( 25 )

鹽水溶解，稀釋、可依習用法使用。

又，作為過敏診斷用滴定試藥使用時，亦藉習用法製備，例如將本發明之經單離之精製抗原性蛋白質或本發明之抗原性片段以漢克斯緩衝液適當溶解，稀釋作為組織胺游離滴定用試藥使用。使用方法通常藉由以下之操作順序，亦即對於將由過敏疾病患者之血液及此自此血液離心所得之血球部份懸浮於緩衝液中之血球懸浮液之一定量，以該精製抗原性蛋白質之溶液為滴定試藥滴定。將藉由應變原刺激自嗜鹼性球游離之組織胺量，用HPLC測定。

本發明之經單離之精製抗原性蛋白質或本發明之抗原性片段，亦可用於鱗斑霉菌過敏疾病之檢出及診斷。例如，此藉由將得自不得不評估對於鱗斑霉菌之感受性之患者血液或血液成分，於本發明之經單離之精製抗原性蛋白質等與適當條件下培養，由決定精製抗原性蛋白質與血液中之成分(例如抗體、T細胞、B細胞)之結合程度可進行診斷。

(5)以本發明之精製抗原性蛋白質或其抗原性片段為有效成分之治療藥

本發明提供以具有來自鱗斑霉菌之經單離之精製抗原性蛋白質或至少1個之抗原決定部位之抗原性片段為有效成分之以鱗斑霉菌為原因菌之過敏性疾病之治療藥。

本發明之過敏疾病治療劑，可藉由通常之投予途徑如經口、皮內、皮下、肌肉內、腹腔內等之投予途徑而進行。另外，例如糖錠、舌下劑、點眼劑、鼻腔內噴霧劑、敷劑、霜劑、洗劑等之作為經皮、經粘膜藥亦可使用。本發明之過敏疾病治療劑之投予量及投予次數，依照投予途

## 五、發明說明 ( 26 )

徑、症狀等，使成人相當於一次約20毫克以下之範圍而加以適宜選擇，每週投予1次之程度。又，本發明之過敏疾病治療劑，不只為對於藉由鱗斑霉菌之過敏疾病之治療劑，亦可作為預防劑。由於過敏性反應誘發作用少或無，對人體可安全使用。

本發明之鱗斑霉菌過敏疾病治療劑，以前記之經精製之抗原性蛋白質，其抗原性片段為有效成分，可作為藉由各種鱗斑霉菌之過敏疾病之治療劑及預防劑使用。

本發明之過敏疾病治療劑之製備方法，無特別限定。例如，將本發明之精製抗原性蛋白質或具抗原決定部位之抗原性片段乾燥使成粉末狀，可用來作為對於藉由鱗斑霉菌之過敏疾病之減敏治療劑。此種情形，將其原樣使用，或依必要以藉由習用法添加一般使用之佐劑及各種添加劑如穩定劑、賦形劑、增溶劑、乳化劑、緩衝劑、無痛化劑、保存劑、著色劑等之配合劑使用。例如將粉末狀之經精製之抗原性蛋白質溶於添加酚之生理食鹽水中，作為減敏治療用之原液使用。

供作為減敏治療劑使用，且有抗原決定部位，而且不結合於鱗斑霉菌特異性之IgE，或不使肥大細胞或嗜鹼性球放出組織胺者特別有利。

### (6) 鱗斑霉菌應變原之定量方法

本發明亦提供鱗斑霉菌應變原之定量法。對於來自鱗斑霉菌之精製抗原性蛋白質之抗體，可使用於以鱗斑霉菌為原因菌之過敏性疾病或感染症之診斷所有之鱗斑霉菌應變原之免疫學上定量。

## 五、發明說明 ( 27 )

本發明之經單離之精製抗原性蛋白質或後述之重組抗原性蛋白質作為鱗斑霉菌應變原之標準品，容易確立使用對其之抗體之ELISA等之定量方法。作為鱗斑霉菌抗原抽提物，如前記之市售品有幾個，由於鱗斑霉菌為以人類之頭皮為始之皮膚常在菌，所以市售之屋塵中亦被認為含有鱗斑霉菌應變原。對於此等市售之抗原抽提物，能明白鱗斑霉菌應變原之含量對診斷、治療上非常有用。

## (7) 本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質

本發明提供對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能之來自鱗斑霉菌之純的經單離之前記(1)之精製抗原性蛋白質與具有同等之免疫學上性質之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質(以下有的情形簡單地略為「重組抗原性蛋白質」)。此可舉例如由具有序列編號：8~14之胺基酸序列之 $\gamma$ MF-1~7(於此， $\gamma$ MF-1~7之表示意即將MF-1~7藉基因重組手法所得者)所成肽群，及該肽之機能上同等物。亦即，序列編號：8~14之任一者記載之胺基酸序列之全部或一部分所成之肽，或含該肽之肽，具有對應於 $\gamma$ MF-1~7之各別之MF-1~7所有之免疫學上性質同等之免疫學性質者，另外序列編號：8~14之任何一者中記載之胺基酸序列，或於自其一部分所成之胺基酸序列，使發生1或2個以上之胺基酸殘基缺失、附加、插入或置換之至少一個，而且具有對應於 $\gamma$ MF-1~7之各別之MF-1~7所有之與免疫學上性質同等之免疫學性質者亦包含於本發明。

例如以 $\gamma$ MF-1為例，為具有與MF-1同等之免疫學上性質之抗原性蛋白質，由序列表之序列編號：8中所記載之胺基

## 五、發明說明 ( 28 )

酸序列之全部或一部分所成之肽或含該肽之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質含於 $\gamma$ MF-1中。另外，於由序列表之序列編號：8中記載之胺基酸序列，或其一部分所成之胺基酸序列，使發生1或2個以上之胺基酸殘基缺失，附加，插入或置換之至少一個，且具有與MF-1同等之免疫學上性質之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質亦含於 $\gamma$ MF-1中，對於 $\gamma$ MF-2~7亦為同樣。

於此，同等之免疫學上性質為具有同等之鱗斑霉菌應變原活性，鱗斑霉菌變原活性係指與來自過敏疾病患者之IgE抗體，尤其來自鱗斑霉菌過敏疾病患者之IgE抗體之結合活性。

本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質可藉由利用後述之本發明之基因之基因工程之手法，使於大腸菌等之細菌、出芽酵母等之酵母、麴菌等之霉菌、昆蟲細胞或哺乳類細胞等表現而選擇適宜載體，製作表現載體而導入該細胞，作為重組蛋白質而得。從而，本質上不含來自鱗斑霉菌之其他蛋白質。

本發明之重組抗原性蛋白質之機能同等物，使用編碼本發明之重組抗原性蛋白質之DNA特定部位之突變誘發，藉已知方法可改變重組抗原性蛋白質之構造。例如，藉由後述之聚核苷酸上之1或2個以上之鹼基之置換插入，缺失或附加，可發生胺基酸殘基之置換、插入、缺失或附加。另外亦可選擇保持生物活性之變異體。

作為該變異體之製作法，已知有夾普多·杜普列斯(gapped·duplex)法[Nucleic Acids Resedarch, 第12

## 五、發明說明 ( 29 )

卷，第24號，第9441~9456頁(1894)]、刪除法[Gene第33卷，第103~119頁(1985)]、PCR法[Gene第102卷，第67-70頁(1991)]，尿嘧啶DNA法[Methods in Enzymology，第154卷，第367~382頁(1987)，Proc Natl Acad Sci USA，第79卷，第7258~7262頁(1982)]及卡匣變異法(Gene，第34卷，第315~323頁(1985))等。

為使本發明之重組抗原性蛋白質之精製容易、提高溶解度，可於肽鏈附加標記基。作為標記基之例可舉聚組織胺酸等，可以金屬、親和力層析法精製。另外，若必要藉由於標記基與目的之肽之間導入蛋白質內切酶特異性之識別部位，以該蛋白酶處理，可容易地單離不含無關係之序列之肽。

為使對肽抗原之患者脫敏成功，藉由附加官能基於肽，或於肽中使不含疏水性T細胞抗原決定部位，疏水性抗原決定部位或疏水性範圍，有使肽之溶解度提高之必要。又，為幫助肽抗原內之T細胞抗原決定部位之適當之抗原處理，於含分別至少1個之T細胞抗原決定部位之範圍間，藉由前述之重組或合成而可製作蛋白內切酶識別部位。例如可將LysLys或ArgArg等之帶電胺基酸對導入肽內之範圍間，所得之肽成為對組織蛋白酶或其他胰蛋白酶樣酵素之切斷具感受性，可生成含1或2個以上之T細胞抗原決定部位之肽片段。另外，如此之帶電胺基酸殘基，亦可提高肽之溶解度。

(8)編碼本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質之聚核苷酸

## 五、發明說明 ( 30 )

本發明提供編碼重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質之聚核苷酸或編碼其抗原性片段之聚核苷酸。此為由序列表之序列編號：1~7中記載之鹼基序列之全部或一部分所成之聚核苷酸，或含該聚核苷酸之聚核苷酸，可舉分別編碼 $\gamma$ MF-1~7或具有與那些同等之免疫學性質之抗原性蛋白質之聚核苷酸。又，可舉由序列表之序列編號：1~7中記載之鹼基序列，或其之一部分所成之鹼基序列，使發生1或2個以上之鹼基缺失、附加、插入、或置換之至少1個，而且編碼具有與 $\gamma$ MF-1~7同等之免疫學性質之抗原性蛋白質之聚核苷酸。另外，可舉編碼具有於此等聚核苷酸中可雜交之鱗斑霉菌應變原活性之抗原性蛋白質之聚核苷酸。

例如，以 $\gamma$ MF-1為例，為含序列表之序列編號：1中記載之鹼基序列之全部、或一部分所成之聚核苷酸，或該聚核苷酸之聚核苷酸，編碼具有 $\gamma$ MF-1或與其同等之免疫學性質之抗原性蛋白質之聚核苷酸亦包含於本發明。又，於序列表之序列編號：1中所記載之鹼基序列，或其一部分所成之鹼基序列，使發生1或2個以上之鹼基缺失、附加、插入或置換之至少一個，編碼具有與 $\gamma$ MF-1同等之免疫學性質之抗原性蛋白質之聚核苷酸包含於本發明。另外，包括編碼於此等聚核苷酸中具有可雜交之鱗斑霉菌應變原活性之抗原性蛋白質之聚核苷酸。對於編碼 $\gamma$ MF-2~7之聚核苷酸亦為同樣。

編碼重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質之聚核苷酸，藉以下之方法可取得，藉組合通常之各種層析法精製之鱗斑霉菌抗原性蛋白質，或藉一次元電泳或二次元電泳精製之鱗斑霉

## 五、發明說明 ( 31 )

菌抗原性蛋白質，可決定N末端胺基酸序列或內部胺基酸序列。合成、精製可編碼此等胺基酸序列之寡核苷酸。由於通常1種胺基酸由複數之密碼子所編碼，此寡核苷酸為考慮此等全部之密碼子所合成之混合物。用此寡核苷酸與寡(dT)為引子，以自鱗斑霉菌抽出，精製之全RNA合成之cDNA或抽出、精製之基因組DNA為模板，進行PCR，則可得本發明之編碼鱗斑霉菌之抗原性蛋白質之寡核苷酸。用於PCR之引子，使用對應於抗原性蛋白質之二處之胺基酸序列之寡核苷酸亦可，或以1次之PCR無擴增cDNA時，再反復PCR亦可。

將藉此PCR反應所得之cDNA片段，用為供DNA雜交用之探針，藉由將鱗斑霉菌之聚(A)<sup>+</sup> RNA或基因組DNA所製作之cDNA基因庫或基因組DNA基因庫篩選，可容易地得編碼含全序列之聚核苷酸或可雜交之抗原性蛋白質之聚核苷酸。基因庫製作所用之載體，來自噬菌體及質體任一者皆可。

作為別的方法，藉由自鱗斑霉菌精製之聚(A)<sup>+</sup> RNA，製作cDNA表現基因庫，對於自此基因庫產生之蛋白質，篩選與來自過敏疾病者之IgE抗體結合之無性繁殖系，則可得編碼具鱗斑霉菌應變原活性之鱗斑霉菌抗原性蛋白質之cDNA無性繁殖系，自此cDNA無性繁殖系表現之蛋白質，為鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

後述之編碼來自鱗斑霉菌之抗原決定部位之基因亦為本發明之發明範圍內，係指由編碼鱗斑霉菌應變原之全胺基酸序列之鹼基序列中鹼基數少之序列。一般而言，編碼抗



## 五、發明說明 ( 32 )

原決定部位之鹼基序列，自編碼成熟蛋白質之鹼基序列選擇，有時選擇使含本發明之前導序列部分為所望。本發明之基因亦可含限制核酸內切酶識別部位之連接序列及／或有用於所望之基因之選殖、表現或精製之序列。亦即，具體而言，編碼至少1個之B細胞抗原決定部位，且具有序列編號：1~7之鹼基序列之一部分之聚核苷酸，或藉化學、物理方法使改變之聚核苷酸亦包含於本發明。例如，本發明中使用之以外之秕糠狀鱗斑霉菌及其以外之鱗斑霉菌屬之真菌，例如：M.pachydermatis及M. sympodialis所有之對應之聚核苷酸亦包含於本發明。亦即，鱗斑霉菌自其生理學性質可分類成5群(醫真菌誌，內田勝久)，被認為具有分別對應之基因，這些亦包含於本發明。

另外，具有編碼本發明中序列編號：1~7之鹼基序列或至少1個之B細胞抗原決定部位之鹼基序列之聚核苷酸與可雜交之聚核苷酸亦包含於本發明。於本發明，可雜交係指於如下之條件可雜交。亦即，將DNA固定之膜於含0.5% SDS、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.1%聚乙炔吡咯烷酮、0.1%菲科爾(ficoll)400、0.01%變性鮭魚精子DNA之6xSSC(1xSSC表0.15M NaCl、0.015M檸檬酸鈉，pH7.0)中，於50°C與探針一起培養12~20小時。培養終了後，從於含0.5%SDS之2xSSC中，37°C洗淨開始，使SSC濃度以至0.1倍為止之範圍，又溫度以至50°C為止之範圍變化，將膜洗淨至來自經固定之DNA之信號與背景可區別為止後，進行探針之檢出。又，對於如此所得之新DNA，受該處編號之蛋白質所有之活性依上記同樣之方法

## 五、發明說明 ( 33 )

調查，可確認所得之DNA是否為作為目的者。

作為本發明之基因與可雜交之聚核苷酸，例如於本發明使用之秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782菌具有序列編號：5之MF-5基因，同時亦具與此之鹼基序列具90%以上之同質性之具圖17中所示之推定鹼基序列之基因。兩基因之編碼之蛋白質於已知之蛋白質中具有與二氫硫辛醯胺脫氫酶之同質性。又，本菌具有序列編號：6之MF-6基因，同時亦具有與此鹼基序列90%以上之同質性之具有圖18所示之推定鹼基序列之基因。兩基因編碼之蛋白質於已知之蛋白質中具有與蘋果酸脫氫酶(MDH)之同質性。另外，本發明之MF-1基因(序列編號：1)與MF-2基因(序列編號：2)於鹼基序列具有60%以上之同質性，為可雜交兩基因編碼之蛋白質與來自Candida boidinii之過氧化物酶體膜蛋白質(PMP-20)具同質性。又，本發明之MF-3基因(序列編號：3)與MF-4基因(序列編號：4)亦於鹼基序列上具60%以上之同質性(圖20)，為可互相雜交、兩基因編碼之蛋白質與超氧化物歧化酶具同質性，實際上具其之酵素活性。從而，成為過敏之原因之其他真菌所具有之編碼可與本發明之鹼基序列雜交之重組抗原性蛋白質之基因亦包含於本發明。

本發明之基因無特別限定，為DNA或RNA，天然或合成任何一者皆可。含有適宜供本發明之基因表現之啟動基因、強化基因及其他表現調節要素之表現載體，可利用例如1989年Cold Spring Harbor Laboratory發行，J. Sambrook等著，分子選殖，實驗室手冊(Molecular Cloning, A Laboratory manual)第2版中所記載者。於哺乳類、酵

## 五、發明說明 ( 34 )

母、霉菌、或昆蟲細胞表現之重組體可受糖化及適宜之二硫化結合等之修飾。適宜於酵母細胞之表現之載體可舉 pYES2, YepSec 等, 可購得。於昆蟲細胞, 桿狀病毒載體可由商業購得(發明建(ファルミンケン)公司製, 聖地牙哥, CA), 於哺乳類之細胞, pMSG 載體為可購得(Pharmacia公司製)。

於大腸菌表現之情形, 使用 pTV 118 載體等即可。又, 使用 pMAL、pSEM、pGEX 則可使分別作為與麥芽糖結合蛋白質、 $\beta$ -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S-轉移酶之雜交蛋白質表現作為雜交蛋白質表現之情形, 於載體蛋白質與來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質或其片段之間之雜交連結部位導入酵素識別部位為特別有利。作為雜交蛋白質單離精製後, 藉由於酵素識別部位之切斷, 接著使用從來之方法之生化學精製手段, 可只回收抗原性蛋白質或其之片段。於酵素識別部位含血液凝固因子 Xa 或凝血酶之識別部位, 此等酵素可利用市售品。另外, 亦可利用藉由 IPTG 或溫度等可誘發表現之載體。

表現載體之導入宿主細胞之方法, 使用磷酸鈣或氯化鈣共沈澱法, DEAE-葡聚糖法, 或電泳脈衝法等之從來之方法進行。

## (9) 本發明之抗原性片段

本發明提供含至少 1 個抗原決定部位之抗原性片段, 於此之中其機能上同等之衍生物亦包含於本發明。具體言之, 包含序列表之序列編號: 8~14 之任何一者中記載之胺基酸序列所成之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質中所含之抗原決定

## 五、發明說明 ( 35 )

部位之抗原性片段。本發明之抗原性片段，對於鱗斑霉菌特異性之IgE抗體不具結合能，即使發生對IgE抗體之結合，如此之結合亦無法使肥大細胞或嗜鹼性球放出組織胺之程度為特徵。又，本發明之抗原性片段，以比來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質實質上低之程度結合於IgE抗體為特徵。又，本發明之抗原性片段，具有比抗原性蛋白質少之IgE賦活活性為特徵。

本發明之抗原性片段，可舉例如含至少1個之T細胞抗原決定部位之抗原性片段。或可舉含至少1個之B細胞抗原決定部位之抗原性片段，例如該B細胞抗原決定部位可舉自序列表之序列編號：42~44之任一者中記載之胺基酸序列。此等抗原性片段亦可利用肽合成技術化學上合成，使用基因之一部分於轉形之宿主細胞中，亦可得作為經表現之重組鱗斑霉菌應變原之目的之抗原決定部位。例如，任意分開不重複抗原性蛋白質之所望長度之片段及較好分開所望長度之重複之肽片段製備。籍將彼等之肽片段測定與抗體之結合作用，測定免疫反應活性(T細胞反應活性化作用、T細胞無反應性作用)，決定抗原性。

(10)對於本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其抗原性片段之抗體或抗體片段

本發明提供與前記重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其抗原性片段特異性結合之抗體或抗體片段。本發明抗體可依習用法製得，多源抗體與單源抗體任何一者皆可。抗體片段只要與前記重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段特異性結合者即可無特別限定。

## 五、發明說明 ( 36 )

## (11) 本發明之合成寡核苷酸探針或合成寡核苷酸引子

本發明提供與本發明之聚核苷酸雜交之合成寡核苷酸探針，合成寡核苷酸引子。例如，本發明包括含序列編號1~7之鹼基序列之全部或一部分之探針或引子。藉由使用此探針之雜交法，可單離編碼具同等機能之蛋白質之基因。此探針藉由例如將前記基因或基因片段插入適當載體，導入大腸菌使複製後，自菌體破碎液以酚等抽出。然後，將該插入部位以識別之限制酶切斷進行電泳後，自凝膠切出製備。又，探針亦可基於序列編號：1~7之鹼基序列，藉DNA合成機之化學合成及藉由PCR之擴增技術而製備。該探針為提高使用時之檢出感度，亦可以放射性同位素及螢光標記。

## (12) 以本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之診斷藥

本發明提供以本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之診斷藥。於此所述之鱗斑霉菌疾病係指異位性支氣管氣喘、過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、異位性皮膚炎等，鱗斑霉菌為原因之所有過敏性疾病。又，鱗斑霉菌感染症係指癩風、鱗斑霉菌手包炎、頭皮屑等之鱗斑霉菌為原因之所有感染症。

本發明之過敏疾病診斷藥可作為對藉由鱗斑霉菌之過敏疾病之皮內反應診斷藥及過敏診斷用滴定試藥使用。作為皮內反應診斷試藥使用之情形，將本發明之重組抗原性蛋白質或本發明之抗原性片段以含酚之生理食鹽水溶解、稀

## 五、發明說明 ( 37 )

釋、依習用法使用。

又，作為過敏診斷用滴定試藥使用時亦同樣地依習用法製備，例如將本發明之重組抗原性蛋白質或本發明之抗原性片段以漢克斯緩衝液適當溶解，稀釋作為組織胺游離滴定用試藥使用。使用方法，通常依以下之操作順序，亦即對於將過敏疾病患者之血液及自此血液離心所得之血球部份懸浮於緩衝液之血球懸浮液之一定量，以該重組抗原性蛋白質之溶液為滴定試藥滴定，藉應變原刺激自嗜鹼性球游離之組織胺量用HPLC測定，

本發明之重組抗原性蛋白質或本發明之或抗原性片段亦可用於鱗斑霉菌過敏疾病之檢出及診斷。例如從不得不評估對鱗斑霉菌之忍受性之患者所得血液或血液成分，於本發明之重組抗原性蛋白質與適當條件下培養，藉由決定重組抗原性蛋白質與血液中成分(例如抗體、T細胞，及細胞)之結合程度可進行診斷。

(13) 以本發明之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之治療藥

本發明提供以重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之治療藥，以來自鱗斑霉菌之抗原性片段為治療目的使用之情形，以此本來之鱗斑霉菌應變原與IgE結合時實質上低之濃度，與如此之IgE結合，其時，不會自肥大細胞或嗜鹼性球游離介體之或抗原性片段為佳。具T細胞反應活性化作用及／或可誘發T細胞無反應性化者更佳。重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質或其抗原性片段於實驗動物、人類之志願者之皮膚

## 五、發明說明 ( 38 )

試驗，皮內試驗以外，可於RAST、ELISA或組織胺游離等之試驗管內試驗評估。

本發明之重組抗原性蛋白質及其基因，可作為鱗斑霉菌過敏疾病治療劑而利用。該治療劑為以前記之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質、其之抗原性片段或具抗原決定部位之肽為有效成分，作為藉由各種鱗斑霉菌之過敏疾病之治療劑使用。前記之基因亦可作為治療劑而利用，其時，插入於哺乳類可表現之載體，作為裸露之DNA分子，或併入於適當之病毒載體作為病毒粒子投予即可藉由此投予，誘發耐抗性，可治療疾病。

本發明之過敏疾病治療劑之製備方法無特別限定，例將由前記之方法所製備之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其抗原性片段、或具抗原決定部位之肽、或併入該基因於載體內之DNA分子乾燥，以粉末狀採取，作為對藉由鱗斑霉菌之過敏疾病之減敏治療劑使用。本發明之過敏疾病治療劑，作為減敏治療劑使用時，照原樣使用，或依必要藉習用法添加一般所用之佐劑及各種添加劑例如穩定劑、賦形劑、增溶劑、乳化劑、緩衝劑、無痛化劑、防腐劑、著色劑，可作為配合劑使用。例如將粉末狀之經精製重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質溶於添加酚之生理食鹽水，作為減敏治療用抗原之原液使用。

本發明之過敏疾病治療劑，可藉由通常之投予途徑例如經口、皮內、皮下、肌肉內、腹腔內等之投予途徑進行。另外，可作為例如糖錠、舌下錠、點眼劑、鼻腔內噴霧劑、敷劑、霜劑、洗劑等之經皮、經粘膜藥使用。本發明

## 五、發明說明 ( 39 )

之過敏疾病治療劑之投予量及投予次數按投予途徑、症狀等，適宜選擇使成人每1次約20毫克以下之範圍，每週投予1次之程度。又，本發明之過敏疾病治療劑不只可用為鱗斑霉菌過敏疾病之治療劑亦可用於預防劑。過敏誘發作用少或無，所以可安全地用於人體。

本發明之鱗斑霉菌過敏疾病治療劑，為以前記之重組抗原性蛋白質、其抗原性片段等為有效成分，可作為各種鱗斑霉菌過敏疾病之治療劑及預防劑使用。供作減敏治療劑使用，具有抗原決定部位，且不結合於對鱗斑霉菌特異性之IgE或即使結合也不會使從肥大細胞或嗜鹼性球放出組織胺者特別有利。

以下藉實施例及比較例更詳細說明本發明，但本發明無論如何並非為此等實施例等所限。

## 實施例1

來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質之單離及其物理化學性質

## 1-1) 鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之製備

將秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782株於裝有迪克森培養基(細菌用麥芽抽提物乳肉湯6.0%、細菌用牛膽汁2.0%，吐恩401.0%、甘油 $\alpha$ -單油酸0.25%)150毫升之500毫升體積之三角瓶50個中，於27°C振搖5天培養得培養物，以離心收集之菌體以磷酸緩衝鹽水(PBS)洗5次後，使懸浮於菌體濕重2倍量之PBS，加等量之0.5毫米直徑之玻璃球，藉由MSK細胞勻漿機(B. Brown公司製)將菌體破碎抽出。所得菌體破碎抽出液以離心(18,000 rpm, 30分)得上清液。此上清液對水透析，以0.45微米之濾膜過濾滅菌後，藉冷

## 五、發明說明(40)

凍乾燥得鱗斑霉菌粗抗原2782約900毫克。

前記鱗斑霉菌抗原2782約800毫克溶於0.05M Tris HCl緩衝液(pH 8.0)，進行硫酸銨鹽析。以離心收集以硫酸銨50%至90%飽和沈澱之部份，溶於0.05M Tris HCl緩衝液(pH 8.0)，接著對該緩衝液透析，作為鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782。

## 1-2)來自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質之探索

鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782冷凍乾燥後，以含2M硫酸銨之0.1M磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)溶解使成4毫克/毫升後，將100微升於預先以含2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>之該緩衝液(pH 7.0)平衡之Phenyl Superose PC 1.6/5(管柱體積0.1毫升，Pharmacia公司製)層析，以0.1M之該緩衝液進行硫酸銨由2M至0M之線性梯度溶離。所得之含抗原性蛋白質部份對Bis(tris)緩衝液(pH 6.5)透析後，於MonoQ PC 1.6/5(管柱體積0.1毫升，Pharmacia公司製)層析，以該緩衝液進行食鹽由0M至0.3M之線性梯度溶離(圖1；流速：100微升/分，檢出：280nm)。層析成各50微升26支後，對層析部份1~20，藉使用患者血清之Direct RAST(EIA)法調查IgE抗體結合性。

亦即，將各部分以加入0.01%吐恩20之0.1M硼酸緩衝液(pH 8.0)稀釋10、100、1000倍，將其45微升以溴化氫偶聯於活性化之紙盤，接著以乙醇胺封阻。其後，於各盤中各加50微升之經稀釋5倍之匯集血清(將以RAST法顯示高值之患者血清10名份匯集者)，其後使與稀釋之以β-半乳糖苷酶標記之山羊抗人類IgE抗血清，加酵素基質，測定

## 五、發明說明 ( 41 )

415nm之吸光度。其結果示於圖2。由圖2顯然地有複數之應變原蛋白質存在，例如於部份6及部份12、13附近存在與患者IgE結合之蛋白質。

又，各部份進行SDS-PAGE後，藉由克馬西亮藍(CBB)染色進行蛋白質之檢出(圖3)，同時對於代表性部份，如下進行免疫墨點法。

亦即，將分別之部份進行SDS-PAGE後，移至硝基纖維素膜，以3%牛血清白蛋白(BSA)封阻，然後以患者匯集血清處理。其後，使與稀釋之經鹼性磷酸酶標記之山羊抗人類IgE抗血清反應，加酵素基質，檢出應變原蛋白質。其結果，如圖4，顯然有複數之應變原蛋白質存在。例如，明白於部份12，SDS-PAGE之20 kDa附近檢出之蛋白質(以應變原MF-1單離)等以應變原蛋白質含於其中。明白於部份6，與部份12之20 kDa約相同分子量之應變原蛋白質(以應變原MF-2單離)及80 kDa附近檢出之蛋白質含於其中。

1-3)精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4及MF-13之單離

前記之鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之冷凍乾燥物0.25毫克溶於Bis(tris)緩衝液(pH 6.5)溶液1毫升後，藉與1-2)中所示之Mono Q層析法同樣之方法，於Mono Q HR 5/5(管柱，容積1毫升，Pharmacia公司製)層析，收集圖峯1(圖1之部份5，6對應部份)、圖峯2(圖1之部份10，11，12對應部份)、圖峯3(圖1之部份15，16對應部份)、圖峯7(圖1之部份18，19，20對應部份)。對於各別之圖峯，進行凝膠過濾、疏水性層析法，最後藉由Mono Q之

## 五、發明說明 ( 42 )

離子交換層析法，由圖峯1命名為MF-2，由圖峯2命名MF-1，由圖峯3命名MF-3，由圖峯4命名MF-4，單離純之抗原性蛋白質。又，將鱗斑霉菌部分精製抗原2782之Mono Q非吸著部份進行疏水性層析法，單離命名為MF-13之純抗原性蛋白質。對單離之5種蛋白質，藉由使用上記之患者匯集血清之EIA法調查IgE抗體結合性，確認為鱗斑霉菌應變原蛋白質。

就精製方法詳細說明，則將由Mono Q分離之圖峯1~4分別以含4M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>之0.1M磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)稀釋2倍後，以預先以含2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>之0.1M磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)平衡化之Phenyl Superose PC 1.6/5(管柱容積0.1毫升，Pharmacia公司製)層析，以0.1M該緩衝液進行硫酸銨由2M至0M之線性梯度溶離。所得含抗原性蛋白質之部份以超濾膜(MW 10,000)濃縮後，進行藉由交聯葡聚糖G-75超細管柱(1.5×100公分)之凝膠過濾層析法，得分子量4萬附近之溶離部份。另外，所得之凝膠過濾物再度進行藉由Mono Q PC 1.6/5之離子交換層析法，進行與前記同樣之溶離，單離抗原性蛋白質。亦即，由圖峯2單離MF-1(圖5)，由圖峯1單離M-2(圖6)，由圖峯3單離MF-3(圖7)。由圖峯4單離MF-4(圖8)。又，將Mono Q非吸著部份與上記同樣之Phenyl Superose PC 1.6/5(管柱容積0.1毫升，Pharmacia公司製)層析，以0.1M該緩衝液進行(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>由2M至0M之線性梯度溶離(圖24)，命名為MF-13，單離純抗原性蛋白質。

1-4)藉由二次元電泳之MF-1~4之鑑定及精製抗原性蛋白

## 五、發明說明 ( 43 )

## 質MF-5~12之單離

另外將前記之鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之150微克溶於含8M尿素、0.5%NP-40、2% $\beta$ -巰基乙醇、0.8% Pharmalyte(Pharmacia公司製)、0.01%溴酚藍之溶液。第一次元之等電點電泳，使用Immobiline Drystrip凝膠(pH 4~7，Pharmacia公司製)依習用法進行。第二次元之SDS-PAGE使用ExelGel SDS-Homogeneous(12.5%，Pharmacia公司製)進行後，藉CBB染色進行蛋白質之檢出(圖9)同時轉錄於PVDF膜(Minipore公司製)後，於皮膚試驗對於粗抗原為陽性，用RAST法顯示高值之過敏患者血清(IgE抗體)及健康正常者血清(IgE抗體)進行免疫墨點法；檢出陽性墨點(圖10)。陽性墨點中，對被判斷陽性率高之分子量約21 kDa等電點約5.3，分子量20 kDa等電點約5.8，分子量約27 kDa等電點約6.5，分子量約26 kDa等電點約6.3之墨點，基於N末端序列之結果等，各鑑定為MF-1、MF-2、MF-3及MF-4。又新發現分子量約66 kDa等電點約6.1(命名MF-5)，及分子量約43 kDa等電點約6.2(命名MF-6)，分子量約15 kDa等電點約6.0(命名MF-7)分子量約30kDa等電點約5.4(命名MF-8)，分子量約40 kDa等電點約5.3(命名MF-9)，分子量約44 kDa等電點約6.2(命名MF-10)，分子量約45 kDa等電點約6.4(命名MF-11)，分子量約100 kDa等電點約5.0(命名MF-12)之蛋白質為結合於過敏患者IgE抗體之蛋白質，藉凝膠抽出，單離此等蛋白質。

1-5)精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、

## 五、發明說明 ( 44 )

MF-5、MF-6、MF-7、MF-8、MF-9、MF-10、MF-11、MF-12、MF-13之物理化學性質

單離之MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13於SDS-PAGE顯示單一之帶(圖11)。MF-1~MF-13之藉SDS-PAGE、等電點之分析結果示於表1。MF-1~4之未變性下之等電點電泳使用IsoGel板pH 3~10(FMC公司製)藉習用法進行。MF-5~12之SDS-PAGE、等電點電泳之分析結果由圖9之二次元電泳結果算出。

表 1

	SDS-PAGE(kDa)		等電點 <sup>2)</sup>
	還原 <sup>1)</sup> 條件下	非還原條件下	
MF-1	21	40	4.7(5.3)
MF-2	20	40	4.8(5.8)
MF-3	27	27	5.2(6.3)
MF-4	26	26	5.2(6.5)
MF-5	66	—	— (6.1)
MF-6	43	—	— (6.2)
MF-7	15	—	— (6.0)
MF-8	30	—	— (5.4)
MF-9	40	—	— (5.3)
MF-10	44	—	— (6.2)
MF-11	45	—	— (6.4)
MF-12	100	—	— (5.0)
MF-13	16	—	8.1

1) 還原：3%巰基乙醇處理

## 五、發明說明 ( 45 )

2)( )內之數字表於8M尿素變性下之等電點

1-6)精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13之大量製備

將上記之鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782之0.05M Tris HCl緩衝液(pH 8.0)溶液吸著於先以該緩衝液平衡之DEAE-維纖素管柱。以該緩衝液洗淨後，以含0.1M、0.2M、0.5M食鹽之該緩衝液階段性使溶出。加入0.1M食鹽之緩衝液溶離部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，以Sephacryl S-200 HR管柱層析法(1.5×90公分)層析。收集視分子量3~5萬之溶離部份，以超濾膜(MW10,000)濃縮後，以交聯葡聚糖G-75超細管柱(1.5×100公分)進行層析，得分子量約4萬之溶離部份F2。此F2溶離部份對加入0.5M食鹽之0.05M Tris HCl緩衝液(pH 8.0)透析後，預先將鋅螯合、以該緩衝液平衡之螯合瓊脂糖快速管柱(1×15公分)進行層析。以該緩衝液洗淨後，使緩衝液之pH降至7.0、6.0、5.0、4.0溶離。收集以pH5.0之緩衝液溶離之部份、濃縮後，藉由交聯葡聚糖G-75超細管柱(1.5×100公分)層析法再精製，單離MF-2。

於鋅螯合層析法之無滯留部份，接著以銅螯合物層析法精製。亦即，預先將銅離子螯合，以加入0.5M含鹽之0.05M Tris HCl緩衝液(pH 8.0)平衡之螯合瓊脂糖快速管柱(1×15公分)進行層析。以該緩衝液洗淨後，使緩衝液之pH降至7.0、6.0、5.0、4.0溶離。pH4.0溶離部份以超

## 五、發明說明 ( 46 )

濾膜(MW10,000)濃縮後，以前記交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法再精製，得分子量約4萬之溶離部份。又，無滯留部份以超濾膜(MW10,000)濃縮後，以前記交聯葡聚糖G-75超細管柱層析法精製，取得分子量約4萬之溶離部份，再藉Mono Q陰離子交換管柱層析法精製，單離MF-3及MF-4。

上記之鱗斑霉菌部分精製抗原2782 DEAE-纖維素管柱非吸著部份之一部份以0.05M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  平衡之HiLoad 16/60 Superdex 75 pg(pharmacia公司製)層析，以集分子量2萬以下之部份。所得部份吸著於以0.05M 乙酸緩衝液(pH5)平衡之HiTrap SP，以加0.2M NaCl之該緩衝液溶離。溶離部份以0.05M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  平衡之HiLoad 16/60 Superdex 75 pg層析，單離MF-13。

最後，以約0.5克之鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782為起始材料，各得各10毫克、2毫克、3毫克、2毫克、2毫克之MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13。如此大量製備之抗原性蛋白質，於SDS電泳，等電點電泳、N末端胺基酸序列分析，與前記1-4)及實施例10所述結果相同。

實施例2單源抗體之製作

## 2-1) 小鼠之免疫細胞雜交及雜交瘤之選殖

如實施例1所得之精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2及MF-3分別各10微克懸浮於弗羅因德氏完全佐劑，投予5週齡之

## 五、發明說明 ( 47 )

雄BALB/C小鼠腹腔內。4週後，以懸浮於弗羅因德氏完全佐劑之應變原20微克於腹腔內追加免疫後，另外於其4週後，將溶於生理食鹽水之相同應變原20微克靜脈內投予。

最後免疫3日後取出脾脈細胞，以4:1之比例與骨髓瘤細胞(P3×63-Ag8.653)混合，加43%聚乙二醇2000，實施細胞雜交。將此以脾脈細胞 $2 \times 10^5$ 個/孔洞之比例植入96孔洞微量培養板之孔洞內，於HAT培養基中選擇性地使雜交瘤增殖。用培養上清液藉ELISA測定目的之抗體有無產生，選擇產生抗體之細胞。其結果，作為產生對精製抗原性蛋白質MF-1之M-40單源抗體之雜交瘤之選殖，取得5B4株。作為產生對精製抗原性蛋白質MF-2之M-3單源抗體之雜交瘤之無性繁殖系，取得8G11株。作為產生對精製抗原性蛋白質MF-3之MF-1單源抗體之雜交瘤之無性繁殖系，取得10C1株。

## 2-2) 腹水之製備及單源抗體之精製

於預先以姥鮫烷前處理之切除胸腺小鼠之腹腔內注射 $10^7$ 個雜交瘤使增殖，1~2週後採取腹水。自所得腹水藉蛋白質A管柱之套組(阿馬夏(アマ-シヤム)公司製)精製單源抗體。得對於MF-1之M-40單源抗體、對MF-2之M-3單源抗體、對MF-3之M-1單源抗體。此等單源抗體之同型皆為IgG1。

## 2-3) 單源抗體之固定化管柱之製備及使用該管柱之抗原性蛋白質MF-3之精製

## 五、發明說明 ( 48 )

上記之 M-1 單源抗體 15 毫克以偶聯緩衝液 (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl, pH 8.3) 透析後, 依習用法使偶聯於 1 克之溴化氰活性化瓊脂糖 4B (pharmacia 公司製), 製備抗體之固定化樹脂。

所得樹脂移至 5 毫升之小管柱, 取 40 毫克之鱗斑霉菌部分精製粗抗原 2782, 將此溶於 0.05M Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 後, 以管柱層析, 以 0.1M Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 充分洗淨後, 以 0.1M 甘胺酸-鹽酸緩衝液 (pH 2.5) 溶離結合於抗體之抗原性蛋白質。溶離液立刻加 1M Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 回至中性後, 以超濾膜 (MW10,000) 濃縮後, 與上記同樣進行藉由交聯葡聚糖 G-75 超細管柱 (1.5×100 公分) 之凝膠過濾層析法, 單離高純度之 MF-3 約 300 μg。

實施例 3精製抗原性蛋白質之診斷上應用

## 3-1) 藉由 RAST 法之特異性 IgE 抗體之測定方法

對藉由溴化氰之紙盤之活性化及精製應變原之紙盤之偶聯根據宮本等之方法 (過敏 (アレルギー-) 22 卷, 584-594 頁, 1973 年)。於聚苯乙烯管中加經偶聯之紙盤 1 個與患者血清 50 微升, 於室溫培養 3 小時。以含 0.2% 吐恩 20 之生理食鹽水洗紙盤 3 次後, 加 pharmacia 公司製 RAST-RIA 套組之 <sup>125</sup>I 標記抗人類 IgE 抗體 50 微升, 於室溫培養一夜。再洗 3 次後, 以 γ 計數器測定放射能。同時自經測定之套組之

## 五、發明說明(49)

參考試藥所作成之標準曲線算出IgE抗體價。由標準曲線之上限( $>17.5\text{PRU}/\text{毫升}$ )得高值之檢體，以小鼠血清稀釋10倍、或100倍後，進行再測定，算出抗體價。

## 3-2) 藉由精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4、MF-13之診斷

對於異位性皮膚炎(以下略為AD)、過敏性氣喘(支氣管氣喘：以下略為BA)及兩方之合併(AD+BA)之患者，實施藉由鱗斑霉菌粗抗原之皮膚試驗時，AD患者57名中有43名(75%)、BA患者919名中有108名(12%)、AD+BA患者102名中有47名為陽性，以AD患者顯示非常高之陽性。又，皮膚試驗陽性之AD、BA、及AD+BA患者中，各100%、59%及85%之患者於藉RAST法之IgE抗體測定為陽性。

以於使用鱗斑霉菌粗抗原之皮膚試驗為陽性，另外RAST陽性(計點1以上)之患者76例(AD：30名，BA：20名，AD+BA：26名)為對象，以RAST法(RIA法)測定對3種精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4之IgE抗體價。對於皮膚試驗陰性者(健康正常人)12名亦同樣地測定對於抗原性蛋白質之IgE抗體價。其結果，如表2所示，明確地以非常高比例，患者血清中存在著對抗原性蛋白質之IgE抗體。尤其，對於MF-1、MF-2之陽性率高。另外，令人驚異地，IgE抗體價非常高(表3)，尤其於AD患者對於MF-1、MF-2，超過平均100PRU，最高1000PRU之患者亦

## 五、發明說明 ( 50 )

有。對於鱗斑霉菌粗抗原之RAST陽性患者全部之血清中存在著對於精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4之任何一者之IgE抗體。

又，對於使用鱗斑霉菌粗抗原之皮膚試驗為陽性，另外RAST陽性之AD患者11例以RAST法測定對MF-13之IgE抗體價。其結果，11名中9人為RAST陽性。

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 ( 51 )

表 2

	過敏疾病患者(RAST陽性率)				
	BA(n=20)	AD+BA(n=26)	AD(n=30)	計(n=76)	健康正常人(n=12)
MF-1	100(20/20)	96(25/26)	90(27/30)	95(72/76)	0(0/12)
MF-2	100(20/20)	100(26/26)	87(26/30)	95(72/76)	0(0/12)
MF-4	75(15/20)	88(23/26)	87(26/30)	84(64/76)	0(0/12)

BA：過敏性氣喘患者

AD：異位性皮炎患者

AD+BA：異位性皮炎與過敏性氣喘合併患者

## 五、發明說明 ( 52 )

表 3

	過敏疾病患者(IgE抗體質(CRU值))			
	BA(n=20)	AD+BA(n=26)	AD(n=30)	健康正常人(n=12)
MF-1	1.65±0.66	14.73±4.15	119.73±56.95	<0.35
MF-2	4.32±2.59	16.01±4.45	112.84±52.23	<0.35
MF-4	3.54±2.08	9.75±2.43	94.75±42.43	<0.35

BA：過敏性氣喘患者

AD：異位性皮膚炎患者

AD+BA：異位性皮膚炎與過敏性氣喘合併患者

3-3)精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4之免疫學性質

於使用患者匯集血清之RAST交叉抑制試驗，見到3種精製抗原性蛋白質(MF-1、MF-2、MF-4)之交叉反應性(表4)，並無相互交叉。亦即，顯然地對於其各別之特異性IgE抗體存在於患者血清中。

## 五、發明說明 ( 53 )

表 4

固相抗原	固相抗原與患者IgE之結合抑制50% 所須之各種抗原濃度(微克/毫升)		
	MF-1	MF-2	MF-4
MF-1	0.038(1)	8.6(230)	52(1370)
MF-2	>100(>7700)	0.013(1)	>100(>7700)
MF-4	18(290)	30(480)	0.062(1)

其次，將精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4階段性稀釋，以Direct RAST EIA法測定作為抗原之強度。亦即，將精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4之稀釋液偶聯於以溴化氰活性化之紙盤，接著以乙醇胺封阻。其後，於各盤中各加5倍稀釋之匯集血清50微升，其後，使經稀釋之 $\beta$ -半乳糖苷酶標記山羊抗人類IgE抗血清反應，加酵素基質，測定415nm之吸光度。其結果示於圖12，明白1MF-1以最低濃度結合於患者血清IgE。

又，將精製抗原性蛋白質MF-3階段性稀釋，以ELISA測定作為抗原之強度。亦即，精製抗原性蛋白質MF-3之稀釋液塗佈於微量培養板後，以含0.01%吐恩20之生理食鹽水洗淨，以含3%BSA之PBS封阻，以含0.01%吐恩20之生理食鹽水洗淨後，加匯集血清。37°C放2小時後，加為二次抗體之過氧化酶標記山羊抗人類IgE抗血清，其次加基質溶液，發色後，測定450nm。其結果示於圖13。

## 五、發明說明 ( 54 )

實施例4精製抗原性蛋白質MF-2之半胱胺酸殘基之吡啶基乙基化物之製備

精製抗原性蛋白質MF-2(0.04毫克)溶於硼酸緩衝食鹽水(pH 8.0)200微升，於此之中加800微升5M鹽酸胍、1微升4-乙烯基吡啶、2微升三丁基膦。氮氣取代後，於37°C反應一夜，然後以HPLC(管柱： $\mu$ -Bondasphere C4-300, 2x150毫米(Waters)公司製；以溶媒：0.05%TFA／水洗15分，60分後使成0.05% TFA／乙腈80%之線性梯度溶離；流速：220微升／分；檢出：220nm；管柱溫度：40°C，圖14)單離精製。所得者於非還原條件(巰基乙醇非存在下)下之SDS電泳，於20kDa附近泳動，又，離胺醯肽鏈內切酶消化後所得肽片段(圖15)之中，具序列編號47及48之N末端胺基酸序列之肽片段(各於28.20，31.15分溶離)由於具吡啶乙基半胱胺酸基，顯然為MF-2之吡啶基乙基化物。所得之MF-2之吡啶基乙基化物，與MF-2同樣結合於鱗斑霉菌過敏患者血清IgE，由SDS電泳後之免疫墨點法確認。

實施例5來自精製抗原性蛋白質MF-3之抗原性片段肽之單離

精製抗原性蛋白質MF-3(0.04毫克)溶於硼酸緩衝食鹽水(pH 8.0)100微升，於此，加900微升5M鹽酸胍、1微升4-乙烯基吡啶、2微升三丁基膦。氮氣取代後，於37°C反應一夜，然後以HPLC(管柱： $\mu$ -Bondasphere C4-300,

## 五、發明說明 ( 55 )

2x150毫米，Waters公司製；以溶媒：0.05%TFA／水洗15分，60分後使成0.05% TFA／乙腈80%之線性梯度溶離)單離精製。所得之精製抗原性蛋白質MF-3之鹽酸胍處理體中加50mM N-乙基嗎啉-乙酸(pH 9.0)100微升，離胺醯肽鏈內切酶(Achromobacter protease I，和光純藥社製)，37℃反應一夜，以溶媒：HPLC(管柱： $\mu$ -Bondasphere C18-300，2x150毫米，Waters公司製；溶媒由0.05%TFA／水至0.05% TFA／乙腈60%之線性梯度溶離；流速：200微升／分；檢出：214nm；管柱溫度：40℃，圖16)溶離。分取各肽片段，冷凍乾燥後，對各肽片段如下藉ELISA法測定對鱗斑霉菌過敏患者血清IgE之結合性。

亦即，各肽片段(各約10~100微微莫耳)用肽塗佈套組(寶酒造製)塗佈於微量培養板後，以含0.01%吐恩20之生理食鹽水洗淨，以3% BSA封阻，然後以患者血清處理。其後，使經稀釋之過氧化酶標記山羊抗人類IgE抗血清反應，加酵素基質，一定時間後，測定吸光度，檢出抗原性片段。其結果，認為於20.02、21.41、24.07分附近溶離之圖峯中存在與患者血清IgE結合之抗原性片段。此等之中，21.41分之圖峯含具有由HHQTYVNNLNAAXK(序列編號：58，X為未決定之胺基酸)所成之胺基酸序列。

實施例6淋巴球幼若化試驗

自被驗者[過敏患者8名(表5中編號1~8)、健康正常人2

## 五、發明說明 ( 56 )

名(表5中編號9、10)]，以肝素採靜脈血，以費戈(フィコール)比重離心法分離淋巴球。以10%FCS添加RPMI 1640培養基製備成細胞數成 $5 \times 10^5$  / 毫升，分別注入96孔洞微量培養板各0.2毫升，將上記鱗斑霉菌部分精製粗抗原2782添加使成10、100微克 / 毫升，將精製抗原性蛋白質(MF-1、MF-2、MF-4)添加使成10微克 / 毫升，於5%CO<sub>2</sub>、37°C、高溫度條件下培養5天。第4天，加0.5 μCi(微居里)氚化(<sup>3</sup>H)胸苷培養終了後，收集淋巴球，以液體閃爍計數器測定<sup>3</sup>H-胸苷併入量。實驗連續3次，用其平均值，抗原非添加群與添加群之<sup>3</sup>H-胸苷。併入量之比以SI(刺激指數)表示。結果示於表5。由表5可明白，來自編號4患者之淋巴球，反應於精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2而增殖。又，來自編號1、編號6之患者之淋巴球特別反應於MF-2而增殖。

## 五、發明說明 ( 57 )

表 5

SI ( 低濃度應變原添加時 / 高濃度應變原添加時* )										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MF-1	7.7/2.5	4.3/1.4	1.0/0.9	4.2/3.7	2.6/2.0	2.1/1.0	1.7/1.2	2.1/1.7	1.1/0.5	2.0/0.7
MF-2	4.0/2.9	1.3/1.5	1.9/1.2	7.8/4.2	2.3/2.3	3.1/2.6	2.0/1.8	1.4/1.7	2.0/0.7	1.6/1.0
MF-4	1.8/1.3	1.2/1.1	1.0/0.9	2.5/1.4	1.2/1.8	1.9/1.7	1.1/0.9	1.3/1.3	1.9/0.8	0.9/0.6

\* 低濃度應變原添加時係指添加MF-1、MF-2或MF-4 1微克 / 毫升之情形。

高濃度應變原添加時係指添加MF-1、MF-2或MF-4 10微克 / 毫升之情形。

1~8 : 過敏患者

9~10 : 健康正常人

## 五、發明說明 ( 58 )

### 實施例7

#### 鱗斑霉菌過敏皮內反應診斷試劑及診斷用滴定試劑之製備

將經精製之應變原活性成分乾燥，以粉末狀採取，作為對鱗斑霉菌過敏疾病之皮內反應診斷試劑及鱗斑霉菌過敏診斷用滴定試劑使用。皮內反應診斷試劑以添加0.5%酚之0.9%生理食鹽水為溶媒，製備應變原活性成分之20萬倍稀釋液使用。又，鱗斑霉菌過敏診斷用滴定試劑，以應變原活性成分1毫克/毫升之濃度，溶於漢克斯緩衝液，將此作為組織胺游離滴定用試劑之原液，使用其稀釋液。

### 實施例8

#### 減敏治療用抗原製劑之製備

將精製之應變原活性成分乾燥，以粉末狀採取，作為鱗斑霉菌過敏疾病之減敏治療劑使用。應變原活性成分以1毫克/毫升之濃度，溶於添加0.5%酚之0.9%生理食鹽水，作為減敏治療用抗原之原液。

### 實施例9

#### 室內塵中之精製抗原性蛋白質MF-1之定量及鱗斑霉菌之培養

自支氣管氣喘患者居住之室內及寢具等以吸塵器以一定條件採集。MF-1之定量使用於免多源抗體與實施例2-2)所得之小鼠單源抗體(M-40)三明治ELISA法進行，灰塵以1:10(w/v)抽出之上清液供作MF-1定量用樣品。供鱗斑霉菌之培養，將灰塵以滅菌水懸浮使成1:10(w/v)，種於平板培養基上。又，寢具表面貼一次滅菌膠帶，剝下置於平板培養基上。培養基用PDA.M40YA，迪克森瓊脂培養

## 五、發明說明 ( 59 )

基，於25℃培養1週後計算群落數。

依三明治ELISA法，可定量1毫微克／克灰塵以上之MF-1，來自寢具之灰塵24檢體中16檢體，檢出87.1~1.1毫微克／克灰塵之MF-1。藉膠帶法之寢具表面之鱗斑霉菌之培養成績，24檢體中10檢體為陽性。又，24檢體中，藉由三明治ELISA法之MF-1之檢出結果與培養成績結果一致之檢體，陽性8檢體，陰性6檢體合計14檢體(58%)。

實施例10

精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-10、MF-13之部分胺基酸序列之決定

N末端胺基酸序列分析藉習用法進行。其結果，顯然MF-1具Pro Gly Asp Pro Thr Ala Thr Ala Lys Gly Asn Glu Ile Pro Asp Thr Leu Met Gly Tyr Ile Pro Trp Thr Pro Glu Leu Asp(序列編號：45)之胺基酸序列。

對於MF-2，由於N末端受封阻，吡啶基乙基化後，以離胺醯肽鏈內切酶消化，所得肽片段以C18逆相HPLC分析。分取所得之各種圖峯，對於幾個圖峯進行胺基酸序列決定，於27.07、28.20、31.15分溶離之3種肽片段之N末端胺基酸分別決定為

Val Glu Tyr Phe Gly Ile Asp Glu Gly Glu Pro Lys(序列編號：46)

Asp Asn Leu Thr Phe Ala Gln Asp Val Asn Cys Glu Phe(序列編號：47)

Val Val Ile Val Ala Val Pro Gly Xaa Phe Thr Pro Thr Cys Thr

## 五、發明說明 ( 60 )

Ala Asn His Val Pro Xaa Thr Xaa Glu(序列編號：48)(Xaa為未決定之胺基酸)。

對於MF-3，由於N末端受封阻，吡啶基乙基化後，以離胺醯肽鏈內切酶消化，所得肽片段以C18逆相HPLC分析。分取所得之種種圖峯，對幾個圖峯進行胺基酸序列決定，於35.68、36.68、29.15分溶離之3種肽片段之N末端胺基酸序列分別決定為

Asp Gln Asp Pro Leu Thr Thr His His Pro Val Ile Gly Trp Asp Xaa Xaa Glu His Ala(序列編號：49)(Xaa為未決定之胺基酸)。

Ala Trp Trp Asn Val Val Asn Trp Ala Glu Ala Glu Lys(序列編號：50)、Phe Xaa Gly Gly Gly His Ile Asn Xaa Ser Leu Phe(序列編號：51)(Xaa為未決定之胺基酸)。

又，MF-4之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下列胺基酸序列

Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro Ala Ile Ser Gly Glu Ile Met Glu Thr His Tyr Glu Lys His(序列編號：52)。

又，MF-5之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下列胺基酸序列

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Pro Tyr Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gln(序列編號：53)(Xaa為未決定之胺基酸)。

又，MF-6之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下列胺基酸序列

## 五、發明說明 ( 61 )

Arg Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ser Gly Gly Ile Gly Gln Pro  
Leu Ser Leu Leu Met Lys Leu Asn Pro Lys Val Thr Glu Leu  
Arg(序列編號：54)。

又，MF-7之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下列  
胺基酸序列

Gly Asn Asn Gly Leu Ser Glu Val Val Tyr Lys Pro Asp Xaa  
Gln Xaa Thr Xaa Glu Phe Xaa Val Ile(序列編號：55)(Xaa為  
未決定之胺基酸)。

又，MF-10之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下  
列之胺基酸序列

Val Asp Gln Xaa Tyr Phe Gly Leu Xaa(序列編號：56)  
(Xaa為未決定之胺基酸)。

又，MF-13之N末端胺基酸序列分析結果，明白具有下  
列之胺基酸序列

Ser Asn Val Phe Phe Asp Ile Thr Lys Asn Gly Ser Pro Leu Gly  
Thr Ile Lys Phe Lys Leu Phe Asp Asp Val(序列編號：57)。

其他之抗原性蛋白質由於N末端受封阻，無法解析。

與已知蛋白質之同質性檢索結果，明白MF-2序列編號：  
48之部分胺基酸序列為來自Candida boidinii之過氧化物  
酶體膜蛋白質(PMP-20)及MF-3上記之部分胺基酸序列為  
具與鐵／錳超氧化物歧化酶同質性之蛋白質。又，明白MF-4  
上記之N末端胺基酸序列與MF-3相同，為具鐵／錳超氧化物  
歧化酶同質性之蛋白質。又，MF-5由上記之N末端胺基酸  
序列明白，具與二氫硫辛醯胺脫氫酶同質性之蛋白質。  
又，MF-6由上記N末端胺基酸序列明白，具與蘋果酸脫氫

## 五、發明說明 ( 62 )

酶同質性之蛋白質。又，對於MF-7、MF-10，由彼等之N末端胺基酸序列並無找到與已知之蛋白質之同質性。又，MF-13由上記之N末端胺基酸序列明白為具與環啡啉(シクロフィリン)同質性之蛋白質。

實施例11來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-1基因之選殖

## 11-a) 來自秕糠狀鱗斑霉菌之全RNA之精製

為得來自秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782株之菌體全RNA，該菌株於300毫升之YNB培養基(0.67%細菌用酵母氮基、0.5%細菌用酪朊、0.1%吐恩60，2.0%葡萄糖、5%MEM-維生素液)培養72小時後，以3000rpm離心15分收集細菌，菌體藉液態氮快速冷凍。藉研鉢將冷凍菌體碎成粉末狀後，藉由RNA抽提套組(Pharmacia公司製)回收1.3毫克之全RNA，精製。

## 11-b) MF-1基因之藉由RT-PCR之擴增

合成由實施例10中記載之MF-1蛋白質之N末端之胺基酸序列推定之寡核苷酸MF1F1與MF1F2，精製作為PCR之引子。MF1F1與MF1F2之鹼基序列分表示於序列表之序列編號：15與16。使用於實施例11-a)精製之全RNA1微克，使用RNA PCR套組Ver.2(寶酒造社製)，藉RT-PCR法將MF-1 cDNA擴增。具體而言，用寡(dT)20-M4接合體引子，自1微克之全RNA藉由AMV逆轉錄酶反應(42°C，60分)合成cDNA。以此cDNA為模板，使用MF1F1與合於套組中之M13M4引子，於94°C，1分鐘，55°C 2分鐘，72°C 1.5分鐘之溫度移動反覆40次循環，進行PCR反應。另

## 五、發明說明 ( 63 )

外，以此PCR反應液為模板，進行第2次之PCR反應(nested PCR反應)。於此反應使用MF1F2與M13M4引子。PCR之結果，擴增約570bp長度之cDNA片段。此cDNA選殖於pUC118載體(寶酒造社製)後，決定鹼基序列，其鹼基序列示於序列表之序列編號：17。由序列編號：17預測之胺基酸序列由於與自MF-1蛋白質決定之胺基酸序列一致，所以明白此cDNA片段為MF-1基因。

## 11-c) 秕糠狀鱗斑霉菌之cDNA基因庫之製作

使用寡特克斯(テックス)-dT30<速霸(スーパー)>(寶酒造社製)自實施例11-a)之全RNA 1毫克精製20微克之聚(A)<sup>+</sup>RNA。用該聚(A)<sup>+</sup>RNA 5微克，藉cDNA合成套組(寶酒造社製)合成cDNA。合成之cDNA與λ噬菌體載體λSH10x<sup>TM</sup>(諾瓦健(ノヴァジェン)公司製)連結後，藉由噬菌體製造系統與噬菌體包裝抽提物(諾應健公司製)進行試管內包裝，構築cDNA基因庫。

## 11-d) MF-1 cDNA之選殖

將實施例11-c)所得之cDNA基因庫感染於宿主大腸菌ER1647株，與脫普(トップ)瓊脂糖(含0.7%細菌用瓊脂之LB培養基)混合後，重疊於LB培養板上，37°C培養一夜使形成噬菌斑。所生之噬菌斑移至尼龍膜(Hybond-N，阿馬夏公司製)，進行噬菌斑雜交作用。實施例11-b)所得之MF-1之約570bp之cDNA片段使用隨機引子DNA標記套組(寶酒造公司製)以[α-<sup>32</sup>P]dCTP標記，作為雜交作用之引子使用。篩選1.6×10<sup>5</sup>個噬菌斑後，陽性之無性繁殖系中，對於信號強之10個無性繁殖系再解析。亦即，藉由於大腸菌

## 五、發明說明 ( 64 )

內之自動亞選殖，自此等噬菌體得具有含MF-1 cDNA之領域自動地被亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長之600bp之cDNA之pMF1-7。將該cDNA亞選殖於pUC118載體(寶酒造社製)，決定鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：1所示，MF-1基因編碼具有序列表之序列編號：8所示之胺基酸序列之聚肽。

## 11-e) 自秕糠狀鱗斑霉菌精製基因組DNA

為自秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782株之菌體得基因組DNA，將該菌株以200毫升之YNB培養基培養72小時後，以3000rpm離心15分收集細菌，以洗淨液(0.9%NaCl、0.05%吐恩80)洗5次，以PK緩衝液(0.15M NaCl、0.1M Tris-HCl(pH 7.5)、10mM EDTA)洗3次。菌體懸浮於8毫升PK緩衝液後，加等體積之玻璃珠(徑425~600微米，Sigma公司製)，藉迷你球粒機(Biospace Products公司製)粉碎菌體。菌破碎液中分別加蛋白酶K與SDS使成最後濃度0.15毫克/毫升，1%(w/v)一面慢慢攪拌於50°C處理3小時。該破碎液以酚抽出，酚/氯仿抽出及氯仿抽出(各1次)，進行乙醇沈澱精製核酸。以10000 rpm離心15分所得核酸溶於TE緩衝液(10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA)後，加RN酶A使成最後濃度為40微克/毫升，於37%處理40分。該溶液以酚抽出，酚/氯仿抽出及氯仿抽出(各1次)，藉乙醇沈澱回收DNA、精製。

## 11-f) MF-1基因組DNA之選殖

實施例11-e)所得之基因組DNA以BamHI或PstI完全切斷後，分別之片段選殖於pUC118載體，製作2種基因組

## 五、發明說明 ( 65 )

DNA基因庫，以實施例11-d)所得之MF-1之cDNA為探針使用，自該基因庫藉由群落雜交作用將MF-1基因組DNA篩選。由含BamHI片段之基因庫得含8.5kbp，自含PstI片段之基因庫將含4.9kbp之DNA之無性繁殖系。對於4.9kbp之PstI片段，基於cDNA之鹼基序列，決定鹼基序列。含MF-1基因之基因組DNA之鹼基序列，示於序列表之序列編號18。由此之鹼基序列，MF-1基因編碼具有序列表之序列編號19所示之胺基酸序列之聚肽。

另外，明白基因組DNA中，2處存在37bp與39bp之插入子。基因組DNA與cDNA之關係示於圖23。

實施例12來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-2基因之選殖

## 12-a)MF-2基因之藉由RT-PCR之擴增

由實施例10記載之MF-2蛋白質之內部胺基酸序列，合成推定之寡核苷酸MF2F1，精製作為PCR之引子。MF2F1之鹼基序列示於序列表之序列編號：20。依實施例11-b)所記載之方法，進行RT-PCR，擴增MF-2cDNA片段。PCR反應使用2F1與M13M4引子。第1次PCR反應之結果，擴增約280bp長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段之鹼基序列示於序列表之序列編號：21。由序列編號：21預測之胺基酸序列由於與自MF-2蛋白質決定之胺基酸序列一致，所以明白此cDNA片段為MF-2基因。

## 12-b)MF-2cDNA之選殖

由實施例11-d)記載之方法，以實施例12-a)所得之序列編號：21表示之約280bp之MF-2cDNA片段作為探針，進

## 五、發明說明 ( 66 )

行噬菌斑雜交作用。對於陽性無性繁殖系中信號強之10個無性繁殖系再解析。亦即藉由大腸菌內之自動亞選殖，自此等噬菌體得具有自動將含MF-2cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長550bp之cDNA之pMF2-2。將該cDNA亞選殖於pUC118載體，決定鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：2所示MF-2基因編碼具有序列表之序列編號：9所示之胺基酸序列之聚肽。

### 實施例13

#### 來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-3基因之選殖

##### 13-a)MF-3基因之藉由RT-PCR之擴增

合成由實施例10所記載之MF-3蛋白質之內部胺基酸序列，推定之寡核苷酸MF3F1、MF3F2、MF3R3，精製，作為引子。MF3F1、MF3F2、MF3R3之鹼基序列分別示於序列表之序列編號：22~24。依實施例11-b)記載方法進行RT-PCR，擴增MF-3cDNA片段。第1次之PCR反應使用MF3F1與M13M4引子，第2次之PCR反應用MF3F1與MF3R3之組合與MF3F2與M13M4引子之組合。PCR反應之結果，於MF3F1與MF3R3之組合擴增約380bp，MF3F2與M13M4引子之組合擴增約280bp長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段之鹼基序列分別示於序列表之序列編號：25與26。由序列編號：25與26預測之胺基酸序列與由MF-3蛋白質決定之胺基酸序列一致，所以明白此等cDNA片段為MF-3基因。

##### 13-b)MF-3cDNA之選殖

## 五、發明說明 ( 67 )

由實施例11-d)記載之方法，以實施例13-a)所得之序列表之序列編號：25所表示之約380bp之MF-3cDNA片段為探針，進行噬菌斑雜交作用。對於陽性之無性繁殖系中信號強之6個無性繁殖系再解析。亦即，由大腸菌內之自動亞選殖，自此等噬菌體得具有自動將含MF-3cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長約750bp之cDNA之pMF3-1，決定該cDNA之鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：3所示，MF-3基因係編碼具有序列表之序列編號：10所示之胺基酸序列之聚肽。

實施例14來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-4基因之選殖

## 14-a)MF-4基因之藉由RT-PCR之擴增

合成由實施例10記載之MF-4蛋白質之N末端胺基酸序列推定之寡核苷酸MF4F1與MF4F2，精製作為PCR之引子。MF4F1與MF4F2之鹼基序列，分別示於序列表之序列編號：27與28。依實例11-b)記載之方法，進行RT-PCR，擴增MF-4cDNA片段。第1次之PCR反應用MF4F1與M13M4引子，第2次之PCR反應用MF4F2與M13M4引子。PCR反應之結果，擴增約700bp長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段之鹼基序列示於序列表之序列編號：29。由序列編號：29預測之胺基酸序列與由MF-4蛋白質決定之胺基酸序列一致，所以明白此等cDNA片段為MF-4基因。

## 14-b)MF-4cDNA之選殖

## 五、發明說明 ( 68 )

由實施例11-d)記載之方法，以實施例14-a)所得之序列表之序列編號：29表示之約700bp之MF-4cDNA片段為探針，進行噬菌斑雜交作用。對於陽性無性繁殖系中信號強之4個無性繁殖系再解析。亦即，由大腸菌內之自動亞選殖，自此等噬菌體得具有自動將含MF-4cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長約820bp之cDNA之pMF4-4，決定該cDNA之鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：4所示，MF-4基因編碼具有序列表之序列編號：11所示之胺基酸序列之聚肽。

實施例15來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-5基因之選殖

## 15-a)MF-5基因之藉由RT-PCR之擴增

由實施例10記載之MF-5蛋白質之N末端胺基酸序列，此蛋白質可認為與DLDH具同質性，所以基於該胺基酸序列與其他生物之DLDH胺基酸序列，將編碼胺基酸序列GYVAAIKA之寡核苷酸混合物MF-5F1與其他生物間之DLDH胺基酸序列比較，合成對應於同質性高之領域(胺基酸序列MLAHKAEE)之寡核苷酸MF5R2，精製作為引子。MF5F1與MF5R2之鹼基序列，分別示於序列表之序列編號：30與31。依實施例11-b)記載之方法，進行RT-PCR，擴增MF-5cDNA片段。第1次之PCR反應使用MF5F1與M13M4引子，第2次之PCR反應使用MF5F1與MF5R2。PCR反應之結果，擴增約900bp長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段之鹼基序列示於序列表序列編號：32。由序列編號：32預測之胺基酸序列，與由MF-5蛋白

## 五、發明說明 ( 69 )

質決定之胺基酸序列一致，所以明白此等cDNA片段為MF-5基因。

### 15-b)MF-5cDNA之選殖

由實施例11-d)記載之方法，以實施例15-a)所得之序列表之序列編號：32表示之約900bp之MF-5cDNA片段為探針，進行噬菌斑雜交作用。對陽性無性繁殖系中信號強之12個無性繁殖系再解析，亦即，自大腸菌內之自動亞選殖，由此等噬菌體得具有自動將含MF-5cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長之約1.6kbp之cDNA之pMF5-6及pMF5-7，決定該cDNA之鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：5與33所示，MF-5基因編碼序列表之序列編號：12與34所示之胺基酸序列之聚肽。此2種基因於鹼基序列具92%，於編碼之胺基酸序列具有96%之同質性，由於與自實施例10記載之MF-5蛋白質決定之胺基酸序列約一致，所以明白兩者皆為MF-5基因。

### 實施例16

#### 來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-6基因之選殖

##### 16-a)MF-6基因之藉由RT-PCR之擴增

合成由實施例10記載之MF-6蛋白質之N末端胺基酸序列推定之寡核苷酸混合物MF6F1與MF6F2，精製作為PCR之引子。MF6F1與MF6F2之鹼基序列分別示於序列基之序列編號：35與36。依實施例11-b)記載之方法，進行RT-PCR，擴增MF-6cDNA片段。第1次之PCR反應用MF6F1與M13M4引子，第2次之PCR反應用MF6F2與M13M4引

## 五、發明說明 ( 70 )

子。PCR反應之結果，擴增約1.0kbp之長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段選殖於pUC118載體之結果，檢出限制酶切斷樣式不同之2種cDNA。此等之cDNA片段之鹼基序列如序列表之序列編號：37與38所示，於鹼基序列具90%，於鹼基序列所預側之胺基酸序列具94%之同質性，為不同之基因。由序列編號：37與38預測之胺基酸序列與由實施例10記載之MF-6蛋白質決定之胺基酸序列約一致，所以明白此等cDNA片段為MF-6基因。

### 16-b)MF-6cDNA之選殖

由實施例11-d)記載之方法，以實施例16-a)所得之序列表之序列編號：37及38所表示之約1.0kbp之MF-6cDNA片段為探針，進行噬菌斑雜交作用。對陽性無性繁殖系中信號強之10個無性繁殖系再解析，亦即，由大腸菌內之自動亞選殖，自此等噬菌體得具有自動將含MF-6cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長約1.2kbp之cDNA之pMF6-13，決定該cDNA之鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：6所示，MF-6基因編碼具有序列表之序列編號：13所示之胺基酸序列之聚肽此基因缺少N末端之胺基酸序列之編碼領域，由於與實施例16-a)所得之MF-6之cDNA片段約一致，所以明白為MF-6基因。

### 實施例17

#### 來自秕糠狀鱗斑霉菌之抗原性蛋白質MF-7基因之選殖

##### 17-a)MF-7基因之藉由RT-PCR之擴增

合成由實施例10所記載之MF-7蛋白質之N末端胺基酸序

## 五、發明說明 ( 71 )

列推定之寡核苷酸混合物MF7F1與MF7F2，精製作為PCR之引子。MF7F1與MF7F2之鹼基序列，分別示於序列基之序列編號：39與40。依實施例11-b)所記方法，進行RT-PCR，擴增MF-7cDNA片段。第1次之PCR反應，用MF7F1與M13M4引子，第2次之PCR反應用MF7F2與M13M4引子。PCR反應之結果，擴增約0.4kbp長度之cDNA片段。擴增之cDNA片段選殖於pUC118載體。此cDNA片段之鹼基序列如序列表之序列編號：41所示。由序列編號：41預測之胺基酸序列，與由實施例10所記之MF-7蛋白質決定之胺基酸序列約一致，所以明白此等cDNA片段為MF-7基因。

### 17-b)MF-7cDNA之選殖

依實施例11-d)所記方法，以實施例17-a)所得之序列表之序列編號：41表示之約0.4kbp之MF-7cDNA片段為探針，進行噬菌斑雜交作用。對陽性之無性繁殖系中信號強之5個無性繁殖系再解析。亦即，自大腸菌內之自動亞選殖，由此等噬菌體得具有自動將含MF-7cDNA之領域亞選殖之質體之大腸菌。自此等大腸菌精製質體，選擇含最長約0.4kbp之cDNA之pMF7-1，決定該cDNA之鹼基序列。其鹼基序列如序列表之序列編號：7所示，MF-7基因編碼具有序列表之序列編號：14所示之胺基酸序列之聚肽。

### 實施例18

#### MF-1重疊肽之合成及抗體結合部位之推定

##### 18-a)MF-1重疊肽之合成

使用肽合成機(PSSM-8，(公司)島津製作所製)，合成

## 五、發明說明 ( 72 )

MF-1重疊肽。各肽之胺基酸序列基於序列編號：8所示之MF-1之序列，以33種肽網羅全序列(圖21)。各肽由15個殘基(一部分16或17個殘基)之胺基酸序列所成，胺基酸各10個殘基重疊。

各肽之C末端胺基酸之Fmoc體，首先將預先結合(0.2~0.5毫莫耳/克樹脂)之樹脂(50毫克)以30%六氫吡啶/DMF(0.5毫升)處理，除去Fmoc基。以DMF(0.6毫升×5次)洗樹脂後，加以Py BOP及HOBt活性化之目的之胺基酸之Fmoc體(作為含對於C末端胺基酸之量10倍過量之DMF溶液使用)及N-甲基嗎啉/DMF溶液，使於室溫反應30分。以DMF(0.6毫升×5次)洗樹脂。此一連之操作，反覆至可得作為具目的之序列之肽為止。

其次，於此樹脂中加作為主成分之混合液(94%TFA、5%茴香醚、1%乙烷二硫醇(EDT))(0.7毫升)於室溫放置2小時(又，對於含有色胺酸之肽，使用TFA(94%)、茴香醚(3%)、EDT(3%)、2-甲基吡啶(5毫克)，對於含精胺酸之肽使用TFA(82%)、H<sub>2</sub>O(5%)、硫茴香醚(5%)、EDT(3%)、乙基甲基硫(2%)、酚(3%)之混合液，含有精胺酸之肽之情形，於室溫放8小時)。濾去樹脂，濾液中加乙醚(14毫升)使結晶，析出之結晶以離心(3000 rpm，10分)回收，以乙醚洗後，再離心除上清液，結晶減壓乾燥。所得之結晶以逆相HPLC檢定純度。另外，按必要以LC-MS確認分子量，以逆相HPLC精製。

18-b)對於人類血清中之IgE抗體結合之肽之鑑定

用肽塗佈套組(寶酒造社製)，於96孔洞之微量培養板

## 五、發明說明 ( 73 )

中，塗佈圖21之肽使成1微克／孔洞。各孔洞中加秣糠狀鱗斑霉菌RAST陽性之患者血清13人份、及匯集血清1，計14種血清之2倍稀釋液，依操作手冊使反應後，加 $\beta$ -半乳糖苷酶標記抗IgE抗體，接著加酵素基質，測定415nm之吸光度。對於33個肽之健康正常人血清之吸光度平均20。以顯示此之2倍之40以上之吸光度者為陽性，另外，40以上分成4階段，結果示於圖22。秣糠狀鱗斑霉菌RAST陽性之患者血清，對於4~5種之肽片段有強反應。

### 18-c)對於MF-1之小鼠單源抗體之抗原決定部位之推定

將塗佈實施例18-b)中所記之圖21之肽之微量培養板中，加入為對MF-1之3種單源抗體之M-40、Mm Ab 37及MAb 51使反應後，加過氧化酶標記抗IgG抗體，接著加酵素基質，測定450nm之吸光度。M-40及Mm Ab 37反應於肽5，MAb51反應於肽25、26。合併圖22之結果考慮，則明白此等之肽中含B細胞抗原決定部位。

### 實施例19

#### 重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質之應用於診斷

##### 19-a)藉由RAST法之特異性IgE抗體之測定方法

藉由溴化氰之紙盤之活性化，及重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質之偶聯於紙盤，按照宮本等之方法(過敏，22卷，584-594頁，1973年)進行。於聚苯乙烯管中加入將該抗原性蛋白質偶聯之紙盤一個與患者血清50微升，於室溫培養3小時。以含0.2%之吐恩20之生理食鹽水洗紙盤3次後，加Pharmacia製RAST-RIA套組之 $^{125}$ I標記抗人類IgE抗體50微升於室溫培養一夜。再洗3次後，以 $\gamma$ 計數器測定放射

## 五、發明說明 ( 74 )

能。同時自經測定之套組之參考試劑所作成之標準曲線算出IgE抗體價。得到比標準曲線之上限(>17.5 PRU/毫升)高之值之檢體，以小鼠血清稀釋10倍或100倍後再行測定，算出抗體價。

19-b) 藉由重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質  $\gamma$ MF-1、 $\gamma$ MF-2、 $\gamma$ MF-4 之診斷

對於異位性皮膚炎(以下略為AD)，過敏性氣喘(以下略為BA)兩者之合併(AD+BA)之患者，實施藉由該抗原性蛋白質之皮膚試驗時AD患者57名中43名(75%)、BA患者919名中108名(12%)、AD+BA患者102名中47名為陽性，於AD患者顯示很高之陽性。又，皮膚試驗陽性之AD、BA及AD+BA患者中，各100%、59%、及85%之患者於藉RAST法之IgE抗體測定為陽性。

以使用該抗原性蛋白質之皮膚試驗為陽性，另外RAST陽性(計點1以上)之患者76例(AD：30名，BA：20名，AD+BA：26名)為對象，以RAST法(RIA法)測定對3種重組抗原性蛋白質  $\gamma$ MF-1、 $\gamma$ MF-2、 $\gamma$ MF-4 之IgE抗體價。對於皮膚試驗陰性者(健康正常人)12名同樣地測定對該抗原性蛋白質之IgE抗體價。其結果，明確地於患者血清中以非常高比例存在著對於抗原性蛋白質之IgE抗體。特別地，對於  $\gamma$ MF-1、 $\gamma$ MF-2 之陽性率高，另外，令人驚異地，IgE抗體價非常高，特別是於AD之患者，對於  $\gamma$ MF-1、 $\gamma$ MF-2 超過平均100PRU，最高1000PRU之患者亦有。又，對於鱗斑霉菌抗原之RAST陽性之患者全部之血清中存在對於重組抗原性蛋白質  $\gamma$ MF-1、 $\gamma$ MF-2、 $\gamma$ MF-4 之任一者之IgE抗

## 五、發明說明 ( 75 )

體。

## 產業上之可利用性

根據本發明，可提供單離之來自鱗斑霉菌之高純度之精製抗原性蛋白質，來自此等之抗原性片段。及此等之抗原性蛋白質或抗原性片段特異性之抗體。又，可提供以此等之抗原性蛋白質、抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌疾病之診斷藥、治療藥，預防藥。

另外，根據本發明提供新穎之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質及編碼彼等之基因，及該蛋白質之抗原決定部位。

裝

訂

線

## 四、中文發明摘要(發明之名稱: 得自鱗斑霉菌(Malassezia)之抗原性蛋白質)

以對來自過敏性疾病患者之IgE抗體具有結合能力為特徵之得自鱗斑霉菌屬之真菌之實質上為純的、經單離之抗原性蛋白質，得自該抗原性蛋白質之抗原性片段及對該抗原性蛋白質或該抗原性片段之抗體。根據本發明，可提供經單離之得自鱗斑霉菌之高純度之抗原性蛋白質，得自這些之抗原性片段，及對這些抗原性蛋白質或抗原性片段具特異性之抗體。又，可提供以此等抗原性蛋白質、抗原性片段為有效成分之鱗斑霉菌過敏疾病之診斷藥、治療藥、預防藥。另外，根據本發明，提供新穎之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質及將其編碼之基因，及該蛋白質之抗原決定部位。

## 英文發明摘要(發明之名稱: )

ANTIGENIC PROTEIN ORIGINATING IN  
MALASSEZIA

A substantially pure, isolated antigenic protein originating in fungi of the genus *Malassezia*, characterized by having an avidity with IgE antibodies originating in allergic patients; antigenic fragments originating in said protein; a specific antibody against said antigenic protein or fragments; a diagnostic, therapeutic or prophylactic agent for malassezian allergic diseases containing the antigenic protein or fragments as the active ingredient; a novel recombinant malassezian antigenic protein; a gene coding for the protein; and epitopes of the protein.

## 六、申請專利範圍

1. 一種自鱗斑霉菌屬 (genus *Malassezia*) 之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：45所示之部分胺基酸序列，其分子量約21KD(SDS-PAGE，還原條件下)及約40KD(SDS-PAGE，非還原條件下)，且其在未變性下之等電點約4.7，而在8M尿素變性下之等電點約5.3。
2. 一種自鱗斑霉菌屬 (genus *Malassezia*) 之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：46、序列編號：47或序列編號：48所示部分胺基酸序列，其分子量約20KD(SDS-PAGE，還原條件下)及約40KD(SDS-PAGE，非還原條件下)，且其在未變性下之等電點約4.8，而在8M尿素變性下之等電點約5.8。
3. 一種自鱗斑霉菌屬 (genus *Malassezia*) 之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該

## 六、申請專利範圍

抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：49、序列編號：50或序列編號：51所示之部分胺基酸序列，其分子量約27KD(SDS-PAGE，非還原條件下)及約27KD(SDS-PAGE，非還原條件下)，且其在未變性下之等電點約5.2，而在8M尿素變性下之等電點約6.5。

4. 一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：52所示部分胺基酸序列，其分子量約26KD(SDS-PAGE，還原條件下)及約26KD(SDS-PAGE，非還原條件下)，且其在未變性下之等電點約5.2，而在8M尿素變性下之等電點約6.3。

5. 一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：53所示之部分胺基酸序列，其分子量約66KD(SDS-PAGE，還原條件下)，且在8M尿素變性下之等電點約6.1。

6. 一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離

## 六、申請專利範圍

之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：54所示之部分胺基酸序列，其分子量約43KD(SDS-PAGE，還原條件下)，且其在8M尿素變性下之等電點約6.2。

7.一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：55所示之部分胺基酸序列，其分子量約15KD(SDS-PAGE，還原條件下)，且其在8M尿素變性下之等電點約6.0。

8.一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離之實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質具有序列表之序列編號：56所示之部分胺基酸序列，其分子量約44KD(SDS-PAGE，還原條件下)，且其在8M尿素變性下之等電點約6.2。

9.一種自鱗斑霉菌屬(genus *Malassezia*)之真菌且為經單離之

## 六、申請專利範圍

實質上為純的抗原性蛋白質，其係存在於鱗斑霉菌屬之真菌細胞內，並對於來自過敏疾病患者之IgE抗體具有結合能力，且為過敏疾病患者對於鱗斑霉菌粗抗原為皮膚反應陽性者所反應之得自鱗斑霉菌之主要應變原，該抗原性蛋白質其具有序列表之序列編號：57所示之部分胺基酸序列，其具分子量約16KD(SDS-PAGE，還原條件下)，且其在未變性下之等電點約8.1。

10.根據申請專利範圍第1項之抗原性蛋白質，其之製備係將秕糠狀鱗斑霉菌 (*Malassezia furfur*) TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，並將其上清液冷凍乾燥後，以陰離子交換層析法層析，取得由0.1M NaCl之溶離部份，以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量30~50KD之溶離部份，所得之溶離部份以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量約40KD之溶離部份，接著以鋅螯合層析法層析，無滯留部份以銅螯合物層析法取得於pH約4溶離部份，濃縮後以凝膠過濾層析法純化，取得分子量約40KD之溶離部份而得。

11.根據申請專利範圍第2項之抗原性蛋白質，其之製備係將秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，並將其上清液冷凍乾燥後，以陰離子交換層析法取得由0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量30~50KD之溶離部份，所得溶離部份以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠

## 六、申請專利範圍

過濾層析法取得分子量約40KD之溶離部份，接著以鋅螯合層析法，取得於pH約5溶離部份，濃縮後以凝膠過濾層析法純化而得。

12.根據申請專利範圍第3項之抗原性蛋白質，其之製備係將秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，並將其上清液冷凍乾燥後，以陰離子交換層析法取得由0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量30~50KD之溶離部份，所得之溶離部份以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量約40KD之溶離部份，接著以鋅螯合層析法取得無滯留部份，以銅螯合物層析法將無滯留部份濃縮後，以凝膠過濾層析法純化，取得分子量約40KD之溶離部份，再以Mono Q陰離子交換層析法純化而得。

13.根據申請專利範圍第4項之抗原性蛋白質，其之製備係將秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，並將其上清液冷凍乾燥後，以陰離子交換層析法取得由0.1M NaCl溶離部份，以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量30~50KD之溶離部份，所得之溶離部份以超濾膜(MW10KD)濃縮後，以凝膠過濾層析法取得分子量約40KD之溶離部份，接著以鋅螯合層析法取得無滯留部份，以銅螯合物層析法，將無滯留部份濃縮後，以凝膠過濾層析法純化，取得分子量約40KD之溶離部份，再以Mono Q陰離子交換層析法純

## 六、申請專利範圍

化而得。

14. 根據申請專利範圍第9項之抗原性蛋白質，其製得係將秕糠狀鱗斑霉菌TIMM2782之培養菌體破碎抽提液離心，並將其上清液冷凍乾燥後，以陰離子交換層析法收集未吸附部份，以凝膠過濾層析法取得分子量20KD以下之溶離部份，所得部份以SP陽離子交換層析法取得由0.2M NaCl溶離之部份，再以凝膠過濾層析法純化而得。
15. 一種得自抗原性蛋白質之抗原性片段，其特徵在於其係由選自序列表序列編號：42-44及58之一種以上的胺基酸序列所組成。
16. 根據申請專利範圍第15項之抗原性片段，其中該抗原性片段對鱗斑霉菌特異性之IgE抗體不具結合能力，或即使發生對IgE抗體之結合，如此之結合為不會自肥大細胞或嗜鹼性球放出組織胺之程度。
17. 根據申請專利範圍第16項之抗原性片段，其中該抗原性片段以比得自鱗斑霉菌之抗原性蛋白質實質上低之程度結合於IgE抗體。
18. 根據申請專利範圍第15~17項中任一項之抗原性片段，其中該抗原性片段含至少一個T細胞抗原決定部位。
19. 根據申請專利範圍第15~17項中任一項之抗原性片段，其中該抗原性片段具有比抗原性蛋白質少之IgE賦活活性。
20. 根據申請專利範圍第1~14項中任一項之抗原性蛋白質，其投予鱗斑霉菌過敏患者時，可減輕投予患者對鱗斑霉

## 六、申請專利範圍

其投予鱗斑霉菌過敏患者時，可減輕投予患者對鱗斑霉菌之過敏反應。

21. 根據申請專利範圍第15~17項中任一項之抗原性片段，其投予鱗斑霉菌過敏患者時，可減輕投予之患者對鱗斑霉菌之過敏反應。
22. 一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具與申請專利範圍第1項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質之者，並含有由序列表之序列編號：8之胺基酸序列所組成之肽。
23. 一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：8之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具有與申請專利範圍第1項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。
24. 一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有與申請專利範圍第2項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：9之胺基酸序列所組成之肽。
25. 一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：9之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具有與申請專利範圍第2項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。
26. 一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有

## 六、申請專利範圍

與申請專利範圍第3項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：10之胺基酸序列所組成之肽。

27.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：10之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具與申請專利範圍第3項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。

28.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有與申請專利範圍第4項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：11所記之胺基酸序列所組成之肽。

29.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：11之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具有與申請專利範圍第4項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。

30.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有與申請專利範圍第5項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：12之胺基酸序列所組成之肽。

31.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：12之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以

## 六、申請專利範圍

- 上之胺基酸序列，並具有與申請專利範圍第5項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。
- 32.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有與申請專利範圍第6項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：13之胺基酸序列所組成之肽。
- 33.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於序列表之序列編號：13之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具有與申請專利範圍第6項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。
- 34.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：其為具有與申請專利範圍第7項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質者，並含有由序列表之序列編號：14所記之胺基酸序列所組成之肽。
- 35.一種重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質，其特徵為：於由序列表之序列編號：14所記之胺基酸序列所組成之胺基酸序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之胺基酸殘基，並具有與申請專利範圍第7項之抗原性蛋白質同等之免疫學性質。
- 36.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：1所記之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第22項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。
- 37.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：1之

## 六、申請專利範圍

鹼基序列所成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之鹼基，並編碼申請專利範圍第23項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

38.一種聚核苷酸，其特徵為：其可於含有0.5% SDS、0.1%牛血清蛋白、0.1%聚乙炔吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01%變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第36或37項之聚核苷酸。

39.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：2之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第24項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

40.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：2之鹼基序列所組成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之鹼基，並編碼申請專利範圍第25項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

41.一種聚核苷酸，其特徵為：其可於含有0.5% SDS、0.1%牛血清蛋白、0.1%聚乙炔吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01%變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第39或40項之聚核苷酸。

42.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：3之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第26項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

43.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：3之

## 六、申請專利範圍

鹼基序列所組成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之鹼基，並編碼申請專利範圍第27項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

44.一種聚核苷酸，其特徵為：可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第42或43項之聚核苷酸。

45.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：4之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第28項之鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

46.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：4之鹼基序列所組成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之鹼基，並編碼根據申請專利範圍第29項之鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

47.一種聚核苷酸，其特徵為：可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第45或46項之聚核苷酸。

48.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：5之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第30項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

49.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：5之

## 六、申請專利範圍

鹼基序列所組成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個鹼基序列，並編碼申請專利範圍第31項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

50.一種聚核苷酸，其特徵為：可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第48或49項之聚核苷酸。

51.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：6之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第32項之鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

52.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：6之鹼基序列所組成之鹼基序列中，使其發生至少一種之缺失、附加、插入或置換1或2個以上之鹼基，並編碼根據申請專利範圍第33項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

53.一種聚核苷酸，其特徵為：可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第51或52項之聚核苷酸。

54.一種聚核苷酸，其特徵為：其為由序列表之序列編號：7之鹼基序列所組成者，或含該聚核苷酸者，並編碼申請專利範圍第34項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

55.一種聚核苷酸，其特徵為：於由序列表之序列編號：7之

## 六、申請專利範圍

失、附加、插入或置換1或2個鹼基，並編碼申請專利範圍第35項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質。

56.一種聚核苷酸，其特徵為：可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，雜交於申請專利範圍第54或55項之聚核苷酸。

57.一種抗體，其係針對申請專利範圍第1~14項中任一項之抗原性蛋白質，或針對申請專利範圍第15~19項中任一項之抗原性片段者。

58.一種抗體，其係可與申請專利範圍第22~35項中任一項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質特異性結合者。

59.一種合成聚核苷酸探針或合成聚核苷酸引子，其係可於含有0.5% SDS、0.1% 牛血清蛋白、0.1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.1% ficoll 400、0.01% 變性鮭魚精子DNA之6倍SSC中，在50°C之培育下，與申請專利範圍第36~56項中任一項之聚核苷酸與雜交者。

60.一種鱗斑霉菌過敏疾病或鱗斑霉菌感染症之診斷用醫藥組合物，其特徵為以申請專利範圍第1~14項中任一項之抗原性蛋白質或申請專利範圍第15~19項中任一項之抗原性片段，或申請專利範圍第22~35項中任一項之重組鱗斑霉菌抗原性蛋白質為有效成分。