

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-524358

(P2017-524358A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-503551 (P2017-503551)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月20日 (2015. 7. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月17日 (2017. 3. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2015/050828
 (87) 国際公開番号 W02016/013971
 (87) 国際公開日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)
 (31) 優先権主張番号 1450907-9
 (32) 優先日 平成26年7月21日 (2014. 7. 21)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 500139981
 ファディア・アクチボラゲット
 P h a d i a A B
 スウェーデン751 37ウプサラ、ボッ
 クス6460
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100138911
 弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規アレルゲン

(57) 【要約】

本発明は、第1のペプチド鎖および第2のペプチド鎖を有し、それらを合わせた全体としての、配列番号3の配列および配列番号4の配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも70%である、単離されたヘテロ二量体タンパク質からなる新規ウマアレルゲン、ならびに、配列番号3のアミノ酸配列および配列番号4のアミノ酸配列を組み合わせたものとの全体としての配列同一性が少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%、95%または98%である、一本鎖タンパク質に関する。本発明はさらに、I型アレルギーの診断方法および処置方法ならびに該方法において使用するためのキットおよび組成物における、前記タンパク質の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 のペプチド鎖および第 2 のペプチド鎖を有し、それらを合わせた全体としての、配列番号 3 の配列および配列番号 4 の配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも 70% である、単離されたヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 2】

全体としての、配列番号 3 の配列および配列番号 4 の配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも 75%、好ましくは 80%、85%、90%、95% または 98% である、請求項 1 に記載の単離されたヘテロ二量体タンパク質。

【請求項 3】

全体としての、配列番号 3 のアミノ酸配列および配列番号 4 のアミノ酸配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、一本鎖タンパク質。

【請求項 4】

配列番号 3 の配列との配列同一性が少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、単離されたタンパク質。

【請求項 5】

配列番号 4 の配列との配列同一性が少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、単離されたタンパク質。

【請求項 6】

配列番号 3 の配列を有する第 1 のペプチド鎖および配列番号 4 の配列を有する第 2 のペプチド鎖を有するヘテロ二量体タンパク質の I g E 抗体エピトープを少なくとも 1 つ有する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のタンパク質のフラグメント。

【請求項 7】

固体または可溶性の支持体に固定化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のタンパク質またはタンパク質フラグメント。

【請求項 8】

検出可能な標識が付けられている、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のタンパク質またはタンパク質フラグメント。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のタンパク質または請求項 6 に記載のタンパク質フラグメントをコードする核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 9 の配列との同一性が少なくとも 80% であるヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

配列番号 10 の配列との同一性が少なくとも 80% であるヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

請求項 3 に記載の一本鎖タンパク質をコードし、配列番号 9 の配列および配列番号 10 の配列を組み合わせたものとの全体としての配列同一性が少なくとも 80% であるヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

請求項 9 ~ 12 のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のタンパク質または請求項 6 に記載のタンパク質フラグメントの組換え産生方法であって、請求項 14 に記載の宿主細胞を、該タンパク質の発現に適切な条件下に培養することを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

・ 1型アレルギーを有することが疑われる患者からの免疫グロブリン含有体液サンプルを、請求項1～6のいずれかに記載のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントと接触させるステップ；および

・ 前記サンプルにおいて、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合する抗体の存在を検出するステップ

を含み、

ここで、前記のように結合した抗体の存在は、前記患者が1型アレルギーを有することを示唆する、

1型アレルギーのインビトロ評価方法。

10

【請求項 17】

前記サンプルにおいて、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合するIgE抗体および/またはIgG抗体の存在を検出することを含み、

ここで、特異的IgE抗体の存在は、前記患者がウマに対する1型アレルギーを有することを示唆し、特異的IgG抗体のレベルは、ウマに対する、生まれつきの、または環境的暴露もしくは免疫療法によって誘導された免疫寛容に関する情報を与える、

請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

・ 1型アレルギーを有することが疑われる患者からの免疫グロブリン含有体液サンプルを、ウマからのさらなる精製アレルゲンコンポーネント少なくとも1つと接触させるステップ；および

・ 前記サンプルにおいて、前記のウマからの精製アレルゲンコンポーネントに特異的に結合するIgE抗体の存在を検出するステップ

をさらに含み、

ここで、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合するIgE抗体の存在と、前記のウマからのアレルゲンコンポーネントに特異的に結合するIgE抗体の不存在との組み合わせは、前記患者がネコに対する1型アレルギーを有することを示唆する、

請求項16または17に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記のウマからのさらなる精製アレルゲンコンポーネントが、天然および組換えのEqu c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4/5およびEqu c 15kからなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

30

【請求項 20】

請求項16～19のいずれかに記載の方法を実施するためのキットであって、固体支持体上に固定化された請求項1～6のいずれかに記載のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントを含むキット。

【請求項 21】

固体支持体が、ニトロセルロース、ガラス、シリコンおよびプラスチックの群から選択される、請求項20に記載のキット。

40

【請求項 22】

固体支持体がマイクロアレイチップである、請求項20または21に記載のキット。

【請求項 23】

固定化されたタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントと結合した抗体に結合することができる検出試薬をさらに含む、請求項20～22のいずれかに記載のキット。

【請求項 24】

検出試薬が、IgG抗体および/またはIgE抗体に結合することができる、請求項23に記載のキット。

【請求項 25】

50

ヒトまたは動物体に対して実施される処置または診断方法において使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のタンパク質またはタンパク質フラグメント。

【請求項 26】

ヒトまたは動物体に対して実施される 1 型アレルギーの処置または診断方法において使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のタンパク質またはタンパク質フラグメント。

【請求項 27】

1 型アレルギーの処置方法であって、処置に感受性の個体に、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントを投与することを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギーの分野に関する。本発明はとりわけ、哺乳動物から新規アレルゲンを同定すること、ならびに哺乳動物に対するアレルギーを診断および処置することに関する。

【背景技術】

【0002】

工業化された社会において人口の約 20% が、さまざまな環境源に由来する抗原への暴露に対し過敏（アレルギー性）となっている。即時型および/または遅延型の過敏症を誘発するそのような抗原は、アレルゲンと呼ばれる（Breiteneder, Hoffmann-Sommergruber et al. 1997）。アレルゲンには、草木、動物皮膚、昆虫、食物、薬剤および化学物質の産物が含まれる。アトピー性アレルギーに關与する抗体は主に、免疫グロブリン E のアイソタイプ（IgE）に属する。IgE は、特異的高親和性受容体 FcRI を介して、好塩基球、マスト細胞および樹状細胞に結合する。アレルゲンに暴露されると、細胞表面のアレルゲン特異的 IgE 抗体が架橋し、ヒスタミンおよびロイコトリエンのような炎症メディエーターの放出を導き、その結果アレルギーが生理学的に発現する（Akdis 2006）。

【0003】

アレルギー診断試験においては、アレルゲン原料由来タンパク質に対し特異性を有する、患者の IgE 抗体の検出が行われる。しかしながら、陽性の IgE 試験、すなわち IgE 感作は、必ずしもアレルギーの臨床的発現をもたらさない。この食い違いが、より良い新たな診断方法を開発しようとする主な理由の 1 つである。典型的な試験においては、タンパク質の混合物を含有する、アレルゲン原料の水性抽出物が用いられる。殆どのアレルゲン原料について、粗抽出物中に存在するアレルゲンタンパク質は、一部しか同定および特徴付けされていない。患者において特異的 IgE 抗体を検出する診断試験方法では、患者からの血清を用いるインビトロ免疫アッセイを用いるか、または特定の抽出物を患者の皮膚に局所適用する皮膚プリック試験（SPT）を行うことができる（Wainstein, Yee et al. 2007）。臨床診療では、アレルギーであるとの医師の診断は通常、該当するアレルゲン原料に対する IgE 感作試験が陽性であること、およびそのアレルゲンに対するアレルギー反応の臨床的履歴が確かにあること、の両方に基づいてなされる。

【0004】

近年、アレルゲン抽出物中の多くの重要なアレルゲンタンパク質が同定および特徴付けされている。それにより、個々のアレルゲンコンポーネントのそれぞれに対する特異的 IgE 抗体を定量することが可能となっており、これはしばしばコンポーネント分解診断（component resolved diagnostics; CRD）（Hiller, Laffer et al. 2002）（Valenta, Lidholm et al. 1999）または分子ベースアレルギー（molecular-based allergy; MA）診断（Canonica, Ansotegui et al. 2013）と称される。

【0005】

アレルゲン抽出物を用いる従来の IgE 解析と比較して、分子ベースアレルギー（MA）診断がいくつもの際立った利点を有することが、現在広く認識されている（Canonica,

10

20

30

40

50

Ansotegui et al. 2013)。アレルゲン原料からの関連のアレルゲンコンポーネントすべてを解析することで、I g E 試験の臨床的有用性が著しく高まることが、例えば小麦、ピーナツおよびヘーゼルナツについて示されている (Nicolaou, Poorafshar et al. 2010 ; Codreanu, Collignon et al. 2011; Ebisawa, Moverare et al. 2012) (Masthoff, Mattsson et al. 2013)。M A を適用するのに必要な条件は、アレルゲン原料からの個々のアレルゲンコンポーネントの大多数が同定および特徴付けされているということである。

【 0 0 0 6 】

M A 診断の最も重要な意義の1つは、真の I g E 感作と交差反応性による感作とを見分けることであり、これは、アレルギー症状をもたらすアレルゲン原料が単一のものであるか、密接に関連する少数のものであるか、あるいはさまざまに異なる複数のものであるかを医師が判断するために役立つ。このことは、花粉過敏症 (Stumvoll, Westritschnig et al. 2003)、毒 (venom) 過敏症 (Mueller, Schmid-Grendelmeier et al. 2012)、および食物アレルギー (Matsuo, Dahlstrom et al. 2008; Ebisawa, Shibata et al. 2012) の診断の改善をもたらす。特にピーナツおよびヘーゼルナツアレルギーにおいて、アレルゲンコンポーネント I g E 試験により、古典的抽出物 I g E 試験によるよりも、アレルギーの臨床的アウトカムをより良く予測することができる (Nicolaou, Poorafshar et al. 2010; Codreanu, Collignon et al. 2011; Masthoff, Mattsson et al. 2013)。その1つの理由として、いくつかのコンポーネントは微量であり得、そのために他の種に由来する類似コンポーネントとの交差反応による I g E 反応性を示すに過ぎない場合がある。したがって、そのような交差反応コンポーネントに対する I g E 反応性を示すに過ぎない個体は、問題のアレルゲンに対して臨床症状を起こす可能性は低いであろう (Asarnoj, Moverare et al. 2010; Asarnoj, Nilsson et al. 2012)。アレルゲン抽出物中のそのような微量の交差反応性コンポーネントすべてを同定することは、それらの臨床的関与が低くても非常に重要である。なぜなら、患者の臨床検査においては、すべてのコンポーネントに対する I g E 反応性の合計が抽出物全体の I g E 反応性となることが、抽出物中の他の重要でないかまたは未知のコンポーネントに対する I g E 反応性を除外するために重要だからである。このようにして、M A 診断のアウトカムは、最適な免疫療法治療の選択における改善、および異なる食物アレルギーのリスクの評価における改善をもたらす。

【 0 0 0 7 】

アレルゲンコンポーネントのもう1つの用途は、それを抽出物中にスパイクすることにより、抽出物による診断感度の向上のために使用するというものである。これは、アレルゲンマイクロアレイまたは診察室試験のような、小規模または非検査室免疫アッセイにおいては、アッセイ条件が比較的良好でないこと、抗体結合アレルゲン試薬の収容量が比較的少ないこと、および天然アレルゲン抽出物の効力が低いことが相俟って診断感度が不十分となりうることから、特に重要でありうる。

【 0 0 0 8 】

したがって、各アレルゲン原料において重要なアレルゲンタンパク質をすべて同定および特徴付けすることに大きな意味がある。

【 0 0 0 9 】

アレルギー治療は通常、例えば抗ヒスタミン剤によって、アレルギー症状を軽減することであるが、より長期にわたる効果的なアレルギー治療を特異的免疫療法によって行うことができる。アレルゲンタンパク質に対する防御免疫応答の特異的活性化を引き起こす、最も一般的には皮下または舌下への、疾患原因アレルゲン抽出物の適用。正確なメカニズムは解明されていないが、そのような免疫系の特異的活性化により、後に同じアレルゲンに環境暴露された際のアレルギー症状を軽減することができる (Akdis and Akdis 2007)。標準的な免疫療法は、粗天然物抽出物の代わりに1つまたは複数の精製されたアレルゲンタンパク質を使用することへと、さらに発展している。そのような免疫療法は、草花粉アレルギー患者に対して有効に実施されており (Jutel, Jaeger et al. 2005) (Cromwel

10

20

30

40

50

l, Fiebig et al. 2006) (Saarne, Kaiser et al. 2005)、動物皮膚アレルギーの治療に用いることが提案されている (Valenta, Lidholm et al. 1999; Gronlund, Saarne et al. 2009)。

【0010】

近年、アレルギー特異的 I g G 抗体への注目が高まっている。これは、アレルギーに対する阻止抗体として機能することによって直接的に、または、Fc 受容体を介して作用することによって間接的に、I g E 抗体の作用を調節しうる (Akdis and Akdis 2007; Uermosi, Beerli et al. 2010; Uermosi, Zabel et al. 2014)。

【0011】

したがって、アレルギーに対する特異的 I g E 応答および特異的 I g G 応答の両方を調べることは、I g E 応答のみを測定するよりも臨床的意義が大きい (Custovic, Soderstrom et al. 2011; Caubet, Bencharitiwong et al. 2012; Du Toit, Roberts et al. 2015)。免疫療法が、主として I g G 4 サブクラスからなる特異的 I g G 応答を誘導することはよく知られている。この抗体応答は有効な免疫療法のメカニズムの一部であるから (Uermosi, Beerli et al. 2010; Uermosi, Zabel et al. 2014)、アレルギー特異的 I g G 抗体の解析は、治療有効性をモニターする手段でありうる。

10

【0012】

したがって、アレルギー特異的 I g G のレベルの測定は、該アレルギーに対する生まれつきの、または環境暴露もしくは免疫療法治療によって誘導された寛容を反映し得、I g E レベルとの組み合わせにおいて、診断試験の臨床的意義を向上しうる。

20

【0013】

ウマ皮膚は、鼻炎、結膜炎、気管支炎および喘息といった症状を伴う呼吸器系アレルギーの原因として一般的なものになりつつある (Liccardi, D'Amato et al. 2011)。ウマアレルギーに対する職業上の暴露は、大きなアレルギー感作リスク因子であるが (Tutluoglu, Atis et al. 2002)、学校のような他の場所でもかなりの濃度のアレルギーが検出されうる (Kim, Elfman et al. 2005)。ある研究では、ウマ皮膚に対する I g E 感作を、高い喘息発症リスクと関連付けている (Ronmark, Perzanowski et al. 2003)。

【0014】

ウマの毛および皮膚の抽出物は、複雑なアレルギータンパク質を含み、次の4つのウマアレルギーがこれまでに同定されている: Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3 および Equ c 4。最初の2つはいずれもリポカリンタンパク質ファミリーのメンバーであり、天然原料から精製されているが (Dandeu, Rabillon et al. 1993; Goubran Botros, Rabillon et al. 1998)、Equ c 1だけが組換えタンパク質として発現されている (Gregoire, Rosinski-Chupin et al. 1996)。Equ c 1のアミノ酸配列は、ネコアレルギー Fel d 4のアミノ酸配列と67%同じである (Smith, Butler et al. 2004)。Equ c 3、すなわちウマ血清アルブミンは、比較的保存性の高いタンパク質で、他の哺乳動物アルブミンと広範な交差反応性を示す (Goubran Botros, Gregoire et al. 1996)。Equ c 4は、まず精製され (Goubran Botros, Rabillon et al. 1998; Goubran Botros, Poncet et al. 2001)、後になってウマの汗のラセリン (latherin) と同定された (McDonald, Fleming et al. 2009)。セクレトグロビンタンパク質ファミリーの C - D サブファミリーの新たなウマアレルギーが最近特徴付けられた (Equ c 15k, WO2011/133105)。

30

40

【0015】

Equ c 1は、既知のウマアレルギーの中で最も重要なものと言われており (Dandeu, Rabillon et al. 1993)、その組換えタンパク質に対する I g E 抗体認識は、調査されたウマアレルギー対象人口の76%に認められた (Saarelainen, Rytkonen-Nissinen et al. 2008)。精製された天然アレルギーを用いた別の研究によると、Equ c 2に対してはウマアレルギー患者の33%、Equ c 4に対しては23%が過敏であるに過ぎなかった (Goubran Botros, Rabillon et al. 1998)。ウマ血清アルブミンに対する I g E 結合の程度はいくつかの研究が対象としており、それによると、40%までのウマアレルギー対象において反応性がある (Spitzauer et al. 1993; Cabanas et al. 2000)。しかしながら、血

50

清アルブミンに対する感作にはしばしば、他のアレルゲンコンポーネントに対し、より高い濃度の I g E 抗体が伴うので、その特異的な臨床的意義は不明である (Spitzauer, Schweiger et al. 1993; Cabanas, Lopez-Serrano et al. 2000)。最近の研究により、それらウマアレルゲンコンポーネントによる相対的有症率が調査され、Equ c 15k に対する I g E 反応性を有するウマアレルギー患者の 48% が症状を有したことが示されている (WO 2011/133105)。

【発明の概要】

【0016】

既知のウマアレルゲンコンポーネントのいずれに対しても反応性を示さない血清を用いることにより、新たなウマアレルゲンを精製し、セクレトグロビンとして同定した。N 末端配列解析および MALDI ToF MS により、その配列を部分的に決定した。全アミノ酸配列を 3'RACE により確認し、天然精製タンパク質と同様の I g E 反応性を有する組換え一本鎖タンパク質を大腸菌において製造した。また、診断および処置における該アレルゲンの使用、ならびに該アレルゲンを含む診断用キットおよび医薬組成物も開示する。

10

【0017】

本発明は第一の側面において、第 1 のペプチド鎖および第 2 のペプチド鎖を有し、それらを合わせた全体としての、配列番号 3 の配列および配列番号 4 の配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、単離されたヘテロ二量体タンパク質に関する。

【0018】

さらなる側面において本発明は、全体としての、配列番号 3 のアミノ酸配列および配列番号 4 のアミノ酸配列を組み合わせたものとの配列同一性が、少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、一本鎖タンパク質に関する。

20

【0019】

さらなる側面において本発明は、配列番号 3 の配列との配列同一性が少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、単離されたタンパク質に関する。

【0020】

さらなる側面において本発明は、配列番号 4 の配列との配列同一性が少なくとも 70%、例えば 75%、80%、85%、90%、95% または 98% である、単離されたタンパク質に関する。

30

【0021】

さらなる側面において本発明は、配列番号 3 の配列を有する第 1 のペプチド鎖、および配列番号 4 の配列を有する第 2 のペプチド鎖を有するヘテロ二量体タンパク質の I g E 抗体エピトープを少なくとも 1 つ有する、本発明の上記側面のいずれかのタンパク質のフラグメントに関する。

【0022】

さらなる側面において本発明は、固体または可溶性の支持体に固定化された、本発明の上記側面のタンパク質またはタンパク質フラグメントに関する。タンパク質およびペプチドの固定化に適切な支持体は当分野でよく知られており、本発明はこの側面において、該タンパク質またはタンパク質フラグメントの免疫原特性に実質的な負の影響を及ぼさないいずれの支持体をも含む。ここで、用語「固定化」とは、使用する支持体に適当な、任意の種類結合でありうる」と理解される。一態様において、本発明のタンパク質またはタンパク質フラグメントは、診断方法において使用するのに適当な固体支持体、例えば ImmunoCAP、EliA または VarelisA に固定化される。他の一態様においては、本発明のタンパク質またはタンパク質フラグメントは、溶液中の天然または合成ポリマー構造、例えば溶液中の 1 つまたはそれ以上の dendrimer 構造に固定化される。

40

【0023】

さらなる側面において本発明は、標識または標識要素が付された、本発明の上記側面の

50

タンパク質またはタンパク質フラグメントに関する。すなわち、一態様において、本発明は、ルミネセンス標識、例えば光ルミネセンス標識、例えば蛍光もしくは燐光標識、化学ルミネセンス標識、またはラジオルミネセンス標識が付された、本発明のタンパク質またはタンパク質フラグメントである。他の一態様においては、本発明のタンパク質またはタンパク質フラグメントは、識別されうる要素、例えば親和性官能基で誘導体化される。タンパク質およびペプチドの標識のための親和性官能基は当分野においてよく知られており、当業者は任意の適当な官能基、例えばビオチンを選択することができる。

【0024】

本発明はさらなる一態様において、本発明の上記側面のタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードする核酸分子、また、該核酸分子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、および該宿主細胞をタンパク質発現に適当な条件下に培養することを含む、本発明の上記側面のタンパク質またはタンパク質フラグメントの組換え製造方法に関する。

10

【0025】

さらなる一態様において、本発明は、

- 1型アレルギーを有することが疑われる患者からの免疫グロブリン含有体液サンプルを、本発明の上記側面のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントと接触させるステップ；および
- 前記サンプルにおいて、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合する抗体、例えばIgE抗体の存在を検出するステップ

20

を含み、
ここで、抗体、例えばIgE抗体の存在は、前記患者が1型アレルギーを有することを示唆する、

1型アレルギーのインビトロ評価方法に関する。

【0026】

一態様において、本発明の方法は、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合するIgEおよび/またはIgG抗体の存在を検出することを含む。他の態様において、本発明は、他のまたはさらなるアイソタイプの抗体、例えばIgA、IgDおよび/またはIgMを用いる。この態様において、特異的IgE抗体の存在は、前記患者がウマに対する1型アレルギーを有することを示唆し、特異的IgG抗体のレベルは、ウマに対する、生まれつきの、または環境的暴露もしくは免疫療法によって誘導された免疫寛容に関する情報を与える。

30

【0027】

本発明の方法は、一態様において、

- 1型アレルギーを有することが疑われる患者からの免疫グロブリン含有体液サンプルを、ウマからのさらなる精製アレルゲンコンポーネント少なくとも1つと接触させるステップ；および
- 前記サンプルにおいて、前記のウマからの精製アレルゲンコンポーネントに特異的に結合するIgE抗体の存在を検出するステップ

をさらに含み、

ここで、前記タンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントに特異的に結合するIgE抗体の存在と、前記ウマからのアレルゲンコンポーネントに特異的に結合するIgE抗体の不存在との組み合わせは、前記患者がネコに対する1型アレルギーを有することを示唆する。

40

【0028】

この態様において、ウマからのさらなる精製アレルゲンコンポーネントは、好ましくは、天然および組換えのEqu c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4/5およびEqu c 15kからなる群から選択される。

【0029】

本発明は、さらなる側面において、本願において記載される標識および/または固定化されたタンパク質および/またはタンパク質フラグメントを用いるアッセイに関する。一

50

態様において、本発明は、

(i) 前記のように、調べる抗体アイソタイプを固体または可溶性の支持体上に捕捉するステップ；

(ii) 本発明のタンパク質またはタンパク質フラグメントを加えるステップ；および

(iii) タンパク質またはタンパク質フラグメントと抗体の結合を直接的または間接的に検出するステップ

を含むアッセイである。一態様において、タンパク質またはタンパク質フラグメントはフルオロフォアで標識されており、この場合、検出は直接的検出である。他の一態様において、タンパク質またはタンパク質フラグメントは前記のように、例えば酵素結合要素、例えばアビジンまたはストレプトアビジンで誘導体化されている。

10

【0030】

したがって、本発明は、多くの異なる種類の I g E および I g G アッセイにおいて、例えば前記のように I g E 感作対象から得た I g E 抗体を支持体上に捕捉し、標識アレルゲンの結合により検出するリバーズ (reverse) アッセイにおいて、有用である。

【0031】

本発明は、さらなる側面において、本発明の前記側面の方法を実施するための、固体支持体上に固定化された本発明のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントを含むキットに関する。

【0032】

この側面の一態様において、固体支持体は、ニトロセルロース、ガラス、シリコンおよびプラスチックの群から選択され、および/またはマイクロアレイチップである。

20

【0033】

この側面の一態様において、本発明のキットは、固定化されたタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントと結合した抗体、例えば I g E 抗体および/または I g G 抗体に結合することができる検出試薬をさらに含む。そのような検出試薬は、例えば、免疫アッセイの分野において知られるような、検出可能な標識 (例えば色素、フルオロフォアまたは酵素) で標識された抗 I g E 抗体でありうる。

【0034】

本発明の側面はさらに、ヒトまたは動物体に対して実施される処置または診断方法、例えばヒトまたは動物体に対して実施される 1 型アレルギーの処置または診断方法における使用のための、本発明の前記側面のタンパク質またはタンパク質フラグメントを包含し、また、1 型アレルギーの処置方法であって、そのような処置に感受性の個体に、本発明の前記側面のタンパク質、ペプチド鎖またはタンパク質フラグメントを投与することを含む方法を包含する。

30

【0035】

定義

用語「タンパク質」および用語「ペプチド」は、それらの当分野における通常の意味を有すると解釈される。本発明において、特に断りがなければ、これら用語は互換的に用いられる。

タンパク質の「長さ」は、当該タンパク質のアミノ酸残基の数である。

40

【0036】

タンパク質の「フラグメント」は、少なくとも 10 個のアミノ酸からなるか、または元のタンパク質の長さの少なくとも 10 % の長さを有するタンパク質フラグメントを意味すると解釈される。フラグメントは、元のタンパク質の全長の少なくとも 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 % および 90 % の長さを有するタンパク質フラグメントを包含する。

【0037】

タンパク質の「バリエーション」とは、バリエーションタンパク質全長にわたって計算して、元のタンパク質との配列同一性が少なくとも 70 %、好ましくは 75 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 98 % を超えるバリエーションを言う。元のタンパク質とバリエーションタ

50

ンパク質のアラインメントを行い配列同一性を計算するためのソフトウェアツールが数多く市販されており、その例はEuropean Bioinformatics Institute (Cambridge, United Kingdom) から提供されるClustal Omegaである。タンパク質バリエーションは、元のタンパク質の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、100%、105%または110%の長さを有する。したがって、タンパク質バリエーションは、その製造の結果として、ヘキサヒスチジンタグ、リンカー配列またはベクター由来アミノ酸のような追加のアミノ酸を含みうる。また、元のアレルゲンタンパク質の「バリエーション」たりうるためには、バリエーションタンパク質は好ましくは、元のアレルゲンタンパク質の少なくとも1つのIgE抗体エピトープを含むべきであり、すなわち、元のアレルゲンタンパク質に感作された典型的患者からの血清サンプルからIgE抗体を結合すべきである。元のアレルゲンタンパク質のバリエーションが元のアレルゲンタンパク質のIgE抗体エピトープを含むかどうかは、実施例10に記載する阻害アッセイにより調べることができる。元のIgE結合エピトープのIgE結合エピトープを含むバリエーションは、元のタンパク質への結合の「顕著な阻害」を起こす分子であり、これは緩衝液のみ(IgE希釈液、Thermo Fisher Scientific)による阻害との比較として、結合を少なくとも10%、20%、30%、40%または50%阻害する分子であると解釈すべきである。好ましくは、バリエーションは、元のアレルゲンタンパク質と実質的に同じレベルで、IgE抗体を結合する。結合レベルは、実施例8に記載するように、バリエーションまたはフラグメントを固相に固定し、個々の血清のIgE反応性を測定することにより、測定することができる。この定義の目的で、「実質的に同じレベル」とは、バリエーションの結合レベルと元のタンパク質の結合レベルとの差が25%、20%、15%、10%または5%までであることを意味すると理解すべきである。

10

20

【0038】

「ヘテロ二量体タンパク質」とは、その天然型(native form)において、共有結合または非共有結合により結合した、アミノ酸配列の異なる2つのタンパク質鎖を含むタンパク質を言う。それらモノマー単位、すなわちタンパク質鎖は、起源の生物において1つの遺伝子または別個の遺伝子でコードされる。

【0039】

「配列同一性」とは、2つの(ヌクレオチドまたはアミノ酸)配列が、アラインメントにおいて同じ位置に同じ残基を有する程度を言い、パーセンテージで表される。ここでの「アラインメント」とは、2つまたはそれ以上の生物学的配列のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を、類似性の程度または相同の可能性を評価する目的で、同一性レベルおよび(アミノ酸配列の場合)保存度が最大となるように並べるプロセスまたは結果を言う。ヘテロ二量体タンパク質の場合、「全体としての(overall)」配列同一性を決定するために、各鎖のアミノ酸配列またはそれをコードする核酸配列を連結して、アラインメントに用いる。Fassler およびCooper, "BLAST Glossary", BLAST(登録商標)Help, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008-も参照されたい。

30

【0040】

用語「ベクター」は、異種の遺伝子材料を、それが複製および/または発現される別の細胞中に人工的に運ぶ担体として用いられるDNA分子を言う。

40

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1は、ウマ皮膚タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による分別を示す。A₂₈₀吸光度を実線で、導電率を破線で示す。矢印は、IgE反応性を試験した画分の位置を示す。縦棒は、さらなる精製に付した、活性画分を含むプールを示す。

【図2】図2は、未知のウマ皮膚コンポーネントの、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる第2の精製ステップを示す。A₂₈₀吸光度を実線で示し、ポンプBにおけるTris(pH8.0)緩衝液のパーセンテージ(%B)を破線で示す。矢印は、IgE反応

50

性を試験した画分の位置を示す。縦棒は、さらなる精製に付した、活性画分を含むプールを示す。

【図3】図3は、未知のウマ皮膚コンポーネントの、陰イオン交換クロマトグラフィーによる第3の精製ステップを示す。A₂₈₀吸光度を実線で、導電率を破線で示す。矢印は、I g E反応性を試験した画分の位置を示す。横棒は、さらなる試験に付したプールを示し、そのうちの1つが活性画分を含んだので、さらなる精製に付した。

【図4】図4は、未知のウマ皮膚コンポーネントの、逆相クロマトグラフィーによる第4の精製ステップを示す。A₂₈₀吸光度を実線で示し、ポンプBにおける90%アセトニトリル中0.05% TFAの緩衝液のパーセンテージ(%B)を破線で示す。縦棒は、それぞれをSDS PAGE分析およびI g E反応性試験に付した、3つのピーク(1、2、3として示す)のプールを示す。

【図5】図5は、RPC精製ステップからの3つのピークの還元および非還元サンプルのSDS - PAGE分析を示す。レーンMは、左に示す分子量の分子量マーカータンパク質を含む。

【図6】図6は、Equ c sの鎖1の全長タンパク質の仮定ヌクレオチド配列(a)とアミノ酸配列(b)を示す。(c)には、ネコ由来の類似の分子Fel d 1の鎖1とのアミノ酸アラインメントを示す。

【図7】図7は、Equ c sの鎖2の全長タンパク質の仮定ヌクレオチド配列(a)とアミノ酸配列(b)を示す。(c)には、ネコ由来の類似の分子Fel d 1の鎖2とのアミノ酸アラインメントを示す。

【図8】図8は、画分中のタンパク質濃度を高めるためにより急な勾配を用いて行った、陰イオン交換クロマトグラフィーのプールのRPC精製ステップを示す。縦棒は、MS / MS溶液内消化(in-solution digestion)分析に付した画分D4およびD5を示す。

【図9】図9は、IMACによる組換えEqu c sの精製を示す(a)。A₂₈₀吸光度を実線で、導電率を破線で示す。イミダゾール溶出勾配は800~1200 mlの範囲である。矢印は、プールし陰イオン交換クロマトグラフィー(b)に付したピークを示す。矢印はピーク1およびピーク2を示し、縦棒はこれらプールの範囲を示す。

【図10(a)】図10は、組換えEqu c s abの分析的ゲル濾過分析を示す。A₂₈₀吸光度を実線で、導電率を破線で示す。(a)において、rEqu c s abのAIECからのピーク1の分析を示す。

【図10(b)】図10は、組換えEqu c s abの分析的ゲル濾過分析を示す。A₂₈₀吸光度を実線で、導電率を破線で示す。(b)において、rEqu c s abのAIECからのピーク2の分析を示す。

【図10(c)】図10(c)、組換えEqu c s abのAIECからのピーク1およびピーク2の、還元および非還元条件でのSDS PAGE分析を示す。

【図11】図11は、35人のウマ皮膚感作患者における、天然Equ c sと組換えEqu c sとのI g E反応性における相関を示す。0.35 kU_A / Lおよび0.1 kU_A / Lのレベルを点線で示す。

【図12】図12は、25人のウマ皮膚アレルギー患者のコホートにおける、ウマ皮膚抽出物(HDE)、Equ c 1、nEqu c 2、nEqu c 3、nEqu c 4、rEqu c 15kおよびrEqu c sに対するI g E抗体のレベルを示す。0.1 kU_A / Lを下回った数をコンポーネントごとに一纏めに示す。点線は0.35 kU_A / Lのレベルを、実線は0.1 kU_A / Lのレベルを示す。横棒は、I g Eの中央レベルを示す。

【図13】図13は、ウマ皮膚感作患者のコホートにおける、rEqu c sおよびrFel d 1に対するI g E抗体結合の比較を示す。0.35 kU_A / Lおよび0.1 kU_A / Lのレベルを点線で示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

配列表

下記配列を配列表に記載する。

10

20

30

40

50

配列番号	説明
1	シグナルペプチドを含むEqu c sの5 k D a 鎖のアミノ酸配列
2	シグナルペプチドを含むEqu c sの10 k D a 鎖の予測アミノ酸配列
3	Equ c sの5 k D a 鎖の予測アミノ酸配列
4	Equ c sの10 k D a 鎖の予測アミノ酸配列
5	組換えタンパク質rEqu c s ab全体のアミノ酸配列
6	組換えタンパク質rEqu c s ab全体をコードする核酸配列
7	もう1つの組換えタンパク質rEqu c s baのアミノ酸配列
8	もう1つの組換えタンパク質rEqu c s baをコードする核酸配列
9	鎖1をコードするコドン最適化核酸分子
10	鎖2をコードするコドン最適化核酸分子
11	鎖1、PCR1用のフォワードプライマー
12	鎖2、PCR1用のフォワードプライマー
13	鎖1、PCR2用のフォワードプライマー
14	鎖2、PCR2用のフォワードプライマー
15	鎖1、PCR2用のリバースプライマー
16	鎖2、PCR2用のリバースプライマー
17-33	表7に記載されるペプチドフラグメント
34-43	表8に記載されるペプチドフラグメント
44	RPCピーク2のEdman分解によるN末端配列分析により示された2通りの配列
45	Equ c sの鎖1と称される仮定配列の完全なDNA配列
46	Equ c sの鎖2と称される仮定配列の完全なDNA配列
47	Fel d 1の鎖1
48	Fel d 1の鎖2

10

20

【0043】

発明の詳細な説明

30

本発明は1つの側面において、1つまたはそれ以上のジスルフィド結合により連結された、分子量が5 k D aのオーダーである第1のペプチド鎖および分子量が10 k D aのオーダーである第2のペプチド鎖を含み、非還元条件下におよそ18 k D aに相当する電気泳動移動度（見掛けの分子量）を示す、セクレトグロビンファミリーに属する単離されたウマアレルゲン（本発明においてEqu c sと称する）に関する。本発明のこの側面はまた、前記に定義されるように天然Equ c sとある程度の配列同一性を有し、好ましくは天然Equ c sの少なくとも1つのI g E抗体エピトープを含む、Equ c sのバリエーションおよびフラグメントを包含する。そのようなバリエーションおよびフラグメントは、好ましくは、Equ c s反応性血清に対しI g E反応性を示し、実施例10に記載するアッセイにより測定した場合、そのようなバリエーションまたはフラグメントによって、元のrEqu c s分子とのI g E結合が少なくとも10%阻害されうる。後述の本発明の他の側面においても、用語「Equ c s」は、記載の簡潔のために、そのようなバリエーションおよびフラグメントをも包含するものとして用いられる。

40

【0044】

別の側面において、本発明は、本発明の前記側面のアレルゲンをコードする、単離された核酸分子、および該核酸分子を含むベクター、ならびに該ベクターを含む宿主細胞に関する。そのようなベクター含有宿主細胞によって産生される組換えタンパク質またはペプチドは、用いた宿主細胞に応じて、グリコシル化されていても、されていなくてもよい。

【0045】

さらなる側面において、本発明は、患者におけるI型アレルギーを評価するためのイン

50

ピトロの方法であって、患者からの体液サンプル、例えば血液または血清サンプルをEqu c sまたは本発明の前記側面に係る組成物と接触させ、それにより患者サンプルがEqu c sに特異的に結合するI g E抗体を含むか否かを決定しうる方法に関する。そのような方法は、当分野において知られたどのような様式で行ってもよい。Equ c sを、例えば、固体支持体に固定化するか（例えば、従来の検査室免疫アッセイ、マイクロアレイまたはラテラルフローアッセイにおいて）、または液相試薬として使用しうる。

【0046】

さらに別の側面において、本発明は、患者におけるI型アレルギーを評価するためのインピトロの方法であって、患者からの体液サンプル、例えば血液または血清サンプルをEqu c sと接触させ、それにより患者サンプルが、Equ c sに特異的に結合するが他のウマアレルギーコンポーネント、例えばEqu c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4/5またはEqu c 15kには結合しないI g E抗体を含むか否かを決定しうる方法に関する。Equ c sに対してI g E反応性を示すが他のウマアレルギーに対してはI g E反応性を示さない患者は、ウマではなくネコに最初に感作された可能性がある。

10

【0047】

上記側面において、野生型Equ c s分子は、この野生型タンパク質のI g E抗体エピトープを含む、Equ c sの天然または人工のフラグメントまたはバリエーションで置き換える。

【0048】

本発明はさらに、I型アレルギーを処置する方法であって、処置を必要とする患者に、Equ c s、または下記に説明する改変Equ c sを投与することを含む方法に関する。本発明のこの側面は、コンポーネント分解（component-resolved）免疫療法（ValentaおよびNiederberger 2007）を包含するそのような免疫療法における、Equ c sの使用にも関する。この側面の一態様において、Equ c sは、その天然の形態で、または天然分子と同様の生化学的および免疫学的性質を示す組換え形態で使用しうる。他の一態様においては、Equ c sは、処置される個体において、好ましくはI g G応答を誘導することができる一方で、I g E抗体結合能は排除または減弱するように化学的または遺伝子的に作成された改変形態で使用しうる。改変の例は、分子の断片化、切断、タンデム化（tandemization）もしくは凝集、内部セグメントの欠失、アミノ酸残基の置換、ドメイン再構成、またはジスルフィド架橋または他の巨大分子構造もしくは低分子量化合物への結合の破壊による三次元構造の少なくとも一部の破壊を包含するが、それらに限定されない。この側面のさらに別の態様においては、Equ c sの個々の10kDaおよび/または5kDaサブユニットを、改変Equ c sとして使用する。

20

30

【0049】

本発明の前記側面のいずれにおいても、Equ c sタンパク質は、その天然の原料、例えばウマからの尿、唾液もしくは他の体液または組織（例えば毛または皮膚）から精製しうる。Equ c sタンパク質は、当業者に知られた方法または本願において記載される方法により、組換えDNA技術によって製造するか、または化学的に合成してもよい。

【0050】

本書に記載されるアレルギーであるウマタンパク質Equ c sは、セクレトグロビンタンパク質ファミリー、特に、2個のヘテロ二量体サブユニットから形成される四量体タンパク質を含む1つのサブファミリーに属する。このヘテロ二量体は、異なる遺伝子から誘導された2つの鎖がジスルフィド架橋によって連結されたものからなる（Klug et al. 2000）。本書に記載されるウマセクレトグロビンは、 5 ± 2 kDaのサブユニットと 10 ± 2 kDaのサブユニット（これらは、本発明の目的のために、それぞれ、5kDaサブユニットおよび10kDaサブユニットと称される）からなる 18 ± 2 kDaのヘテロ二量体であり、本発明においてEqu c sと称される。この分子量の値は、下記実施例3に記載されるように、SDS-PAGEで測定される見掛けの分子量による。見掛けの分子量とは、電気泳動分離媒体およびその濃度、使用する緩衝液の直線勾配または勾配等を包含する分離条件によって、変化しうると理解される。また、10kDaサブユニットは、N-グ

40

50

リコシル化部位を有し、それがグリカン構造によって占められると見掛けの分子量が変化する。

【0051】

5 k D a 鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列：

DICPAVKEDV NIFLTGTPDD YVKKVSQYQR NPVILANAEEK LKNCIDKKLT AEDKENALSV 60
LEKIYSSDFC 70

(配列番号3)を有し、理論分子量は7.9 k D aである。

【0052】

10 k D a 鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列：

CPSFYAVLGV LSLGSKTLLD TSLNLVNATE PEKVAMGKIQ DCYNEAGVIT KISDLIIMGT 60 10
ITTSPECISH ALSTLTQDVQ EGISKLNPLG R 91

(配列番号4)を有し、理論分子量は9.6 k D aである。

【0053】

広範な哺乳動物種における構造的に関連のあるタンパク質が論じられているが、主要なネコアレゲンFel d 1 (Acc no P30438 および P30440) およびEqu c 15k (WO2011/133105) のわずかに2つのタンパク質しか、アレゲンとして規定されていないことに注目すべきである。

【0054】

ウマアレギー患者において見られるウマ皮膚抽出物に対するI g E反応性の大部分は、ウマ皮膚アレゲンEqu c 1、Equ c 2、Equ c 3、Equ c 4/5 および Equ c 15k によるものであるが、本発明者らは、ネコアレギーの個体が、上記5つの既知のウマアレゲンコンポーネントのいずれにも反応性を示さないにも関わらずウマ皮膚抽出物に対しI g E反応性を示すいくつかのケースに遭遇した。本発明は、ネコアレゲンFel d 1のホモログタンパク質の発見を導く、ウマ皮膚抽出物に対するこの未知のI g E反応性に関するウマアレゲンの同定および特徴付けを記載する。 20

【0055】

ネコ感作対象からの血清コレクションにおいて、多数の血清を、既知のウマ皮膚アレゲンのいずれに対する反応性も検出されない一方で、ウマ皮膚抽出物に対する反応性を有すると特徴付けることができた。その血清を用いた場合にウマ皮膚抽出物に対するI g E結合を組換えFel d 1によって阻害することができ、これにより、該I g E反応性は、免疫学的にFel d 1に類似するウマタンパク質に対するものであることが示唆された。 30

【0056】

前記血清を用いて、ウマ皮膚から新たに主要なアレゲンを精製することができ、セクレトグロビンタンパク質ファミリーのメンバーとして同定することができた。この新たなウマタンパク質(本発明においてEqu c sと称される)は、1つの5 k D aアミノ酸鎖および1つの10/11 k D aアミノ酸鎖がジスルフィド架橋によって連結されたものからなる。この2つのポリペプチド鎖が別個の遺伝子によりコードされるという事実に鑑み、本発明の研究は、これまでウマゲノムの生物情報学的研究によって知られていないヘテロ二量体タンパク質の存在を証明する。これは、既知のウマアレゲンとは区別される。このアレゲンは、既知のウマアレゲンのパネルへの重要な追加を意味し、ウマアレギー診断において有用でありうる。これは、主要なネコアレゲンFel d 1と交差反応性のアレゲンであるから、この分子に対するI g E反応性は、臨床症状に関係するかまたは関係しないウマ皮膚に対する交差反応性の感作を反映しうる。 40

【0057】

以下の実施例は、ウマからのEqu c sと称されるセクレトグロビンの単離および使用に関して本発明を説明するものである。実施例は説明のためのものに過ぎないので、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。本発明は特許請求の範囲によって規定される。

【実施例1】

【0058】

ウマ皮膚抽出物中の、Fel d 1に類似する未知アレルギーコンポーネントを検出する血清の決定

ウマ皮膚抽出物、ネコ皮膚抽出物、およびFel d 1の標準ImmunoCAPテストを使用した。組換えEqu c 1およびEqu c 15k、ならびにウマ皮膚から精製したEqu c 2およびEqu c 4、およびウマ血清から精製したEqu c 3を用いる実験用immunoCAPテストを、実質的にWO2011/133105に記載されるように調製した。

【0059】

ネコ皮膚抽出物に対する感作レベルの高い血清のコレクションを、ネコおよびウマの皮膚コンポーネントに対するI g E反応性について試験した。ここで選択された5つの血清は、既知の5つのウマアレルギーコンポーネントのいずれにも反応性を示すことなく、ネコ皮膚抽出物、Fel d 1およびウマ皮膚抽出物に対し高いI g E反応性を示すことによって特徴付けられた(表1)。したがって、これら血清は、ウマ皮膚抽出物中の未知のアレルギーコンポーネントを検出した。

10

【0060】

選択した血清を、ウマ皮膚抽出物およびネコ皮膚抽出物の両方を固相として用いる阻害試験に使用した(表2)。阻害剤である組換えEqu c 15k、Fel d 1およびFel d 7はそれぞれ100 μ g/mlの終濃度で使用した。阻害コントロール緩衝液として、0.3%ヒト血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を使用した。各阻害についての2連の測定の平均値を計算し、阻害の割合を、各阻害剤によって消失された阻害コントロール緩衝液使用時の結合の割合として計算した。選択された血清において、ネコ皮膚抽出物への結合はFel d 1によりほぼ完全に阻害された(表2a)。それ以外の試験した阻害剤はいずれも、何ら阻害を示さなかった。このことは、ネコ皮膚抽出物に対するI g E結合の大部分は、Fel d 1に対する反応性によるものであることを示している。同様に、ウマ皮膚抽出物固相への結合はrFel d 1により完全に阻害されたが、それ以外の阻害剤のいずれによっても阻害されなかった(表2b)。このことは、前記血清のウマ皮膚抽出物に対する結合は、ネコアレルギーFel d 1と免疫学的に類似するウマ皮膚コンポーネントに対するものであることを示している。Equ c 15kはセクレトグロビンファミリーに属するが、このタンパク質は、ウマ皮膚抽出物に対する結合の阻害を示さなかった。このことは、求めるウマコンポーネントはEqu c 15kではないことを示している。これは、その2つのタンパク質が異なるセクレトグロビンサブファミリーに属する、すなわち、Fel d 1はB-Eサブファミリーに、Equ c 15kはC-Dサブファミリーに属する(Laukaitis and Karn 2005)(WO2011/133105)という事実によって説明することができる。

20

30

【実施例2】

【0061】

ネコアレルギーFel d 1に類似するウマ皮膚アレルギーコンポーネントの精製

実施例1に記載した血清を用いて、ウマ皮膚抽出物中に、Fel d 1に類似する未知のアレルギーコンポーネントを検出することができた。また、クロマトグラフ手法を用いてウマ皮膚抽出物を分画し、画分をImmunoCAP固相に固定化することにより、未知コンポーネントを複数のクロマトグラフィーステップにおいて追跡することができた。

【0062】

サイズ排除クロマトグラフィー

ウマ皮膚(Allergon, Vaeringe, Sweden)を20mM MOPS(pH7.6)、0.15M NaCl(MBS=MOPS緩衝生理食塩液)で抽出し、遠心により清澄化し、0.45 μ m混合セルロースエステルフィルター(Millipore, Billerica, MA, USA)で濾過した。第1の精製ステップとして、清澄化した抽出物を、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)用のSuperdex(商標)75カラム(XK26/100, V_t =505 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)に適用し、MBSにより流速2ml/分で溶出を行った。

40

【0063】

クロマトグラムを図1に示す。図中に矢印で示される6つの画分を、文献に記載される

50

ように固相に固定化した (Marknell DeWitt, Niederberger et al. 2002)。前記血清を用いた場合の固定化画分に対する I g E 結合を、表 3 に示す。試験された画分 18、22 および 26 が、未知アレルゲンコンポーネントを最も多量に含むことがわかる。画分 16 ~ 27 (図 1 において縦棒で示す) をプールし、疎水性相互作用クロマトグラフィーに付した。

【0064】

疎水性相互作用クロマトグラフィー

SEC からのプールを 1 M NH_4SO_4 に調整し、20 mM *tris* (pH 8.0) 中の 1 M NH_4SO_4 で平衡化した Phenyl Sepharose (商標) HP カラム (HR10/10, $V_t = 8.0$ mL, GE Healthcare Life Sciences) に適用した。1 M ~ 0 M の NH_4SO_4 の NH_4SO_4 直線勾配で溶出を行った (図 2 のクロマトグラムにおいて、溶出体積 140 ~ 260 mL の間の 50% ~ 100% B として示す)。強く結合したタンパク質を溶離するために、ポンプ A を洗浄し、緩衝液を 20 mM *Tris* (pH 8.0) 中の 30% イソプロパノールに変えた。0 ~ 30% イソプロパノールのイソプロパノール勾配を用いて、カラムに残るタンパク質を溶離した (クロマトグラムにおいて、溶出体積 285 ~ 325 mL の間の 100% ~ 0% B として示す)。クロマトグラムに示す 7 つのピークを、カップリング緩衝液 (0.1 M NaHCO_3 , pH 8.0) で 1 : 2 希釈し、ImmunoCAP 固相に固定し、前記検出用血清を用いて I g E 反応性について試験した (表 4)。イソプロパノール溶出勾配の画分 60 に、最も高い I g E 反応性が見られた。画分 58 ~ 66 をプールし、陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。

10

20

【0065】

陰イオン交換クロマトグラフィー

HIC プールを、その体積の半量の *Tris* (pH 8.5) を添加することにより調整した。その後、プールを、20 mM *Tris* (pH 8.5) で平衡化した陰イオン交換カラム Source (商標) 15Q (PE4.6/100, $V_t = 1.66$ mL, GE Healthcare Life Sciences) に適用した。同じ緩衝液中の 0 ~ 0.50 M の NaCl 直線勾配で溶出すると、タンパク質は複数のピークに分かれて溶出され (図 3)、そのうちの 7 つを、カップリング緩衝液で 1 : 4 希釈した後、固定化した。この希薄化において殆どの画分中に未知コンポーネントに対する I g E 反応性が検出されたので (表 5 a)、SDS PAGE におけるタンパク質バンドパターンに基づいて B4 - B1、C1 - C4 および C1 - C11 の 3 つのプールをプールし、カップリング緩衝液で 1 : 20 希釈した後、固定化した。これらのさらなる希釈化プール画分の I g E 解析により、第 1 のプール B4 - B1 において最も活性が高いことがわかった (表 5 b)。このプールを最終クロマトグラフィーステップである RPC 精製に付した。

30

【0066】

逆相クロマトグラフィー

陰イオン交換プールを、TFA を終濃度 0.065% で添加することにより調整し、最終 RPC 精製ステップに付すために、そのサンプルを、水中の 0.065% TFA で平衡化した Source (商標) 15 RPC カラム (Resource, $V_t = 3.2$ mL; GE Healthcare Life Sciences) に適用した。90% アセトニトリル中の 0.05% TFA からなる緩衝液 B の 0 ~ 60% 直線勾配で溶出を行った。勾配の終盤近くに 3 つのピークの溶出があり (図 4)、それを固相に固定化し、試験した。表 6 に示すように、最初の 2 つのピークが未知コンポーネントを高レベルに含んでおり、なかでもピーク番号 2 が最初のピークよりも含有レベルが少し高かった。

40

【実施例 3】

【0067】

精製された画分の、SDS PAGE、N 末端配列解析および MALDI TOF MS による解析
RPC 画分の SDS PAGE 解析により、最初の 2 つの RPC ピークについて、還元条件で 5 kDa において 1 つのバンド、10 / 11 kDa において 2 重のバンドがあり、これらは非還元条件では合わさって 18 kDa におけるブロードなバンドとなるという、

50

同様のパターンが示された。このバンドパターンは、典型的に還元条件で5および10 kDaの2バンド、非還元条件で15~20 kDaの1バンドという、セクレトグロビンファミリーのタンパク質のものと一致する。2つのバンドの最大のバンドはグリコシル化されており、そのためdiffuseとなりうるか、または本ケースにおけるように2重バンドとなりうる。

【0068】

RPCピーク2のEdman分解によるN末端配列解析を、本質的に文献に記載されるように実施したところ (Mattsson, Lundgren et al. 2009)、7残基目以降明確性が低下する2通りの配列が提示された:

アミノ酸残基番号	1	2	3	4	5	6	7	
提示された配列	D	P	S	F	Y	A	V	
提示されたもう1つの配列	—	I	R	P	A	V	—	

10

アミノ酸の相対量は各サイクルで同様であったので、このデータから一次および二次配列を決定することは不可能であった。この2通りの配列は、配列表にも配列番号44として示す。

【0069】

一次元SDS PAGEゲル電気泳動の5、10および11 kDaバンドからのスポットをトリプシンでゲル内消化して、Bruker Daltonics Autoflex 2装置 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI TOF MS)、次いでペプチドマスフィンガープリント (PMF) 分析により解析したところ、NCBI-NRデータベースのいずれかの既知タンパク質との明らかな一致は、5 kDaバンドで未同定ウマタンパク質の予測配列 (XP_005596696) との一致が見られたことを除き、見られなかった。ただし、この登録された配列は一部がセクレトグロビンと相同であるにも関わらず、分子量はこのファミリーの分子としては大き過ぎ、それを取り出したバンドと一致しなかった。予測配列には欠陥があると考えられた。

20

【実施例4】

【0070】

Fel d 1の鎖1および鎖2と類似するアミノ酸配列を決定する、ウマゲノム配列の生物情報学的解析

鎖1

実施例1において示されるように未知ウマ皮膚タンパク質と免疫学的に類似するネコアレゲンタンパク質Fel d 1は、2つのアミノ酸鎖 鎖1および鎖2 (それぞれ、acc no: NP_001041618 および NP_001041619) がジスルフィド架橋で連結されたものからなる。

30

【0071】

Fel d 1の鎖1の配列 (NP_001041618) でウマゲノムデータベース (wsg) をTBLASTN検索すると、アミノ酸17~79が、ウマゲノム配列の105199塩基対セグメントであるAcc No. AAWR02030062の (逆ストランドの)ヌクレオチド位置77633~77453の翻訳と一致した。

40

【0072】

この配列を含むより大きなセグメントとして、Acc No. AAWR02030062の90000-70021を、Fel d 1の鎖1の前駆配列と共に、遺伝子検出プログラムFGENESH+に掛けた。このプログラムは、ゲノム配列内の相同遺伝子を検索する。結果は、Acc No. AAWR02030062の、

77850 77790

77632 77445

76428 76399

という3つのエクソンからなる仮定配列であった。

【0073】

50

Equ c sの鎖1と称されるこの仮定配列の完全なDNA配列を、図6aに示す(配列番号45)。これは92のアミノ酸残基(配列番号1、図6b)をコードし、その最初の22残基はシグナルペプチドを構成するとSignalPにより予測された。クローン化cDNAから導かれる成熟タンパク質は、3つのシステインを含む70アミノ酸残基から成り、予測分子量は7.9kDa、予測等電点は4.96であった。この予測配列を用いるタンパク質BLASTホモロジー検索により、セクレトグロビンとの相同性を有するアミノ酸配列が示される。予測配列は、Fel d 1の鎖1(配列番号47)と67%のアミノ酸が同じであった(図6c)。

【0074】

鎖2

上記と同様にFel d 1の鎖2の配列(NP_001041619)でウマゲノムデータベース(wsg)をTBLASTN検索すると、アミノ酸21~85が、ウマゲノム配列の105199塩基対セグメントであるAcc No. AAWR02030062の(順ストランドの)ヌクレオチド位置82588~82782の翻訳と一致した。

【0075】

この配列を含むより大きなセグメントとして、Acc No. AAWR02030062の70021~94020を、Fel d 1の鎖2の前駆配列と共に、遺伝子検出プログラムFGENESH+に掛けた。このプログラムは、ゲノム配列内の相同遺伝子を検索する。結果は、Acc No. AAWR02030062の、

82004 82064
82589 82770

である2つのエクソンからなる不完全な仮定配列であった。

【0076】

この仮定配列は、Fel d 1の鎖2の配列との相同性に基づき、最後のエクソンを欠く。タンパク質BLAST検索で、Fel d 1の鎖2のエクソン3と、ヌクレオチド82770に続く翻訳ゲノム配列とを比較すると、Fel d 1の鎖2のエクソン3と相同性を有するゲノム配列が同定された。Equ c sのこの仮定エクソン3は、in frameで前のエクソンと連結することができ、Fel d 1の鎖2のエクソン3と相同の位置に終止コドンをも有した。この最終エクソンの配列は、ゲノム配列Acc No. AAWR02030062の90025~90127に見られた。

【0077】

Equ c sの鎖2と称されるこの仮定配列の完全なDNA配列を、図7aに示す(配列番号46)。これは114のアミノ酸残基(配列番号2、図7b)をコードし、その最初の23残基はシグナルペプチドを構成するとSignalPにより予測された。クローン化cDNAから導かれる成熟タンパク質は、3つのシステインを含む91アミノ酸残基から成り、予測分子量は9.6kDa、予測等電点は4.84であった。この予測配列を用いるタンパク質BLASTホモロジー検索により、セクレトグロビンとの相同性を有するアミノ酸配列が示される。予測配列は、Fel d 1の鎖2(配列番号48)と47%のアミノ酸が同じであった(図7c)。

【実施例5】

【0078】

ウマ皮膚からのEqu c sの鎖1および鎖2のmRNAのPCR増幅および配列決定RNAqueousキット(Ambion, Austin, TX, USA)を用いて、ウマ皮膚から全RNAを調製した。mRNA Purificationキット(Thermo Fisher Scientific)を用いて、全RNAからポリアデニル化RNAを単離し、First-Strand cDNA Synthesisキット(Thermo Fisher Scientific)を用いてファーストストランドcDNAを調製した。Frohman (Frohman 1993)に従い、開始コドン前の非翻訳配列からの遺伝子特異的フォワードオリゴヌクレオチドプライマー:

5'-ATAAAAGGGCTGCAGAATTG-3'(配列番号11、鎖1)および

5'-GCAGCAGAAACCCTGCCCTG-3'(配列番号12、鎖2)

を用いて3'RACEを行った。クローニングのために末端NdeI制限部位を有する、開始コドン前の非翻訳配列からの第2の遺伝子特異的フォワードオリゴヌクレオチドプライマー:

10

20

30

40

50

5'-GTGAGCACCTGCCACCTG-3' (配列番号 13、鎖 1) および
 5'-GAAGAGCATTCTAGCAGTTG-3' (配列番号 14、鎖 2)、
 ならびに特異的リバーソオリゴヌクレオチドプライマー：
 5'-GAATCTTCTAATCAGACAC-3' (配列番号 15、鎖 1) および
 5'-GGTAGAGGAGACAGGTGTC-3' (配列番号 16、鎖 2)

を用いて第 2 の P C R を行った。鎖 1 の 4 つの独立した 3'RACE クローン、および鎖 2 の 3 つの独立した 3'RACE クローンを単離し、全体の配列を決定し、それにより Equ c s の予測鎖のコード配列を確認することができた。D N A 配列決定は Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。D N A およびアミノ酸の配列の解析および計算は、GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA, USA) のプログラムを用いて行った。

10

【実施例 6】

【0079】

Equ c s の鎖 1 および鎖 2 の仮定配列を用いる、N 末端配列解析および MALDI TOF 解析 Equ c s の仮定配列を用いて、実施例 3 に記載した 2 通りのアミノ酸配列の再評価を行った。この 2 通りの配列は今や、Equ c s タンパク質の成熟鎖 1 および鎖 2 の仮定 N 末端配列と同じ DICPAV (配列番号 3 の残基 1 ~ 6) および CPSFYAV (配列番号 4 の残基 1 ~ 7) であると解釈することができる。

【0080】

本質的に文献に記載されるように (Mattsson, Lundgren et al. 2009)、図 5 のピーク 2 の還元サンプルの 5、10 および 11 k D a バンド、および同じピークの非還元サンプルの 18 k D a バンドをゲル内消化して、MALDI ToF ペプチドマスフィンガープリント (PMF) 分析に付した。5 k D a バンドにおいて、Equ c s の鎖 1 の仮定配列中の仮想トリプシン切断ペプチドと分子量が一致する 8 つの異なるペプチドが検出された (表 7 a)。これらペプチドは、仮定成熟配列の 89% を、当該アミノ酸鎖の N 末端および C 末端を含んでカバーした。

20

【0081】

11 k D a バンドにおいては、Equ c s の鎖 2 の仮定配列中の仮想トリプシン切断ペプチドと分子量が一致する 2 つの異なるペプチドが検出された (表 7 b)。これらペプチドは、仮定成熟配列の 32% を、当該アミノ酸鎖の N 末端を含んでカバーした。鎖 2 の配列の少しの部分しか同定されなかった理由は、これが N - グリコシル化を含むこと、およびトリプシン切断部位が、大きすぎるかまたは小さすぎるペプチドを与えるように分布しているという事実である。18 k D a バンドにおいては、鎖 1 および鎖 2 の両方からのペプチドが検出された。

30

【0082】

これらペプチドのシグナル強度を MS / MS 解析が可能となるよう高めるために、実施例 2 に記載したのと同様であるがより急な勾配 (それにより最初の 2 つのピークは完全には分離されなくなる) を用いた R P C クロマトグラフィー精製からの 2 つの画分を用いた (図 8)。その最初の 2 つのピークからの画分 (画分 D 5 および D 4) を還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシンによる溶液内消化 (in solution digestion) に付した。そのサンプルを用いて、5 および 10 k D a バンドの PMF 解析によりカバーされた全アミノ酸配列が、仮定フラグメントと同じ配列を有することを、MS / MS 解析により確認することができた (表 8)。このサンプルからの想定されるセミトリプシン (切断部位 (すなわち、トリプシンによる切断は各ペプチドの一方の端のみで起こされた) のさらなる解析により、鎖 2 の C 末端の近くの大きなペプチドフラグメントが同定された (表 8)。

40

【0083】

S D S - P A G E 分析 (図 5) および上記質量分析により、5 および 10 k D a のアミノ酸鎖をそれぞれ Equ c s の鎖 1 および鎖 2 として同定しうる証拠が与えられる。これらアミノ酸鎖は、天然の非還元状態において、1 つまたはそれ以上のジスルフィド架橋によ

50

り連結され、それによりヘテロ二量体タンパク質を形成する。すなわち、この解析により、1つの遺伝子によりコードされる配列番号3の配列と別の遺伝子によりコードされる配列番号4の配列とが合わさって、従来知られていないヘテロ二量体セクレトグロビンタンパク質を形成することが示される。

【実施例7】

【0084】

組換えEqu c sの製造および免疫学的特徴付け

組換えEqu c sのクローニングおよび精製

合成Equ c s一本鎖遺伝子を、5 k D aサブユニットおよび10 k D aサブユニットのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、3 × (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、配列番号5の残基72 - 86)を含むリンカーペプチドをコードする配列と組み合わせることによって設計した。固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィー (IMAC) によるタンパク質精製を可能にするようC末端ヘキサヒスチジンタグを付加して、その全長合成遺伝子を、ベクターpET23a(+)(Novagen, Madison, WI, USA)のNdeI部位およびXhoI部位にクローン化した。

10

【0085】

組換えタンパク質 (rEqu c s abと称される)の全体のアミノ酸配列は次のとおりである：

MDICPAVKED VNIPLIGTPD DYVKKVSQYQ RNPVILANAE KLNKCIDKKL TAEDKENALS	60	
VLEKIYSSDF CGGGGSGGGG SGGGGSCPSF YAVLGVLSLG SKLLDTSLN LVNATEPEKV	120	20
AMGKIQDCYN EAGVITKISD LIIMGTITTS PECISHALST LTTDVQEGIS KLNPLGRLEH	180	
HHHHH	185	

20

(配列番号5)

【0086】

ヌクレオチド配列は、大腸菌 (DNA2.0, Menlo Park, CA, USA) において最適なコドン頻度となるよう設計した。

組換えタンパク質全体をコードする核酸配列は次のとおりである：

atggacattt gccctgcggt taaagaggac gtcaacattt ttctgaccgg taccacagat	60	
gattacgtca aaaaagttag ccagtaccag cgtaaccggg ttattctggc aaatgccgag	120	
aaactgaaga attgtatcga caaaaagctg acggctgagg ataaggaaaa cgccctgtct	180	
gtcttggaga agatttacag cagcgaactt tgtgggtggcg gtggcagcgg tgggtggtgt	240	30
tcgggcggtg gcggcagctg cccgtccttc tatgctgggtc tgggtgttct gagcttaggt	300	
agcaagaccg tgttggacac gagcctgaat ttggtgaatg cgactgaacc ggagaaagtc	360	
gcaatgggca agatccaaga ttgctataac gaagcggggc ttatcaccaa gatcagcgat	420	
ctgatcatta tgggtacgat cagcaccagc ccggaatgta tctctcacgc gctgtccacc	480	
ctgaccaccg acgtgcaaga gggcattagc aaactgaacc cgctgggtcg cctcgagcac	540	
caccaccacc accac	555	

30

(配列番号6)

【0087】

鎖1をコードする核酸配列は次のとおりである：

gacatttgcc ctgctggttaa agaggacgtc aacatttttc tgaccgggtac cccagatgat	60	
tacgtcaaaa aagttagcca gtaccagcgt aaccgggtta ttctggcaaa tgccgagaaa	120	40
ctgaagaatt gtatcgacaa aaagctgacg gctgaggata aggaaaacgc cctgtctgtc	180	
ttggagaaga tttacagcag cgacttctgt	210	

(配列番号9)

【0088】

鎖2をコードする核酸は次のとおりである：

tgcccgctgt tttatgcagt cctgggtgtt ctgtctttgg gttctaaaac tttgctggac	60	
acgagcctga atctgggtgaa tgcaacggag cctgaaaagg tcgcatggg caagattcag	120	
gactgttaca acgaagcggg cgttattacc aagatcagcg acctgatcat tatgggcacg	180	
atcaccacga gccagagtg catcagccac gctttgtcca ccctgaccac cgatgtccaa	240	
gagggcatta gcaagctgaa cccgctgggt cgc	273	

50

(配列番号 10)

【0089】

N末端の10 kDaサブユニットにリンカーおよび5 kDaサブユニットが続き、それにより2つのサブユニットを各アミノ酸鎖の異なる末端に配して連結する、もう1つのコンストラクトを設計した。このもう1つの組換えタンパク質 (rEqu c s baと称される) のアミノ酸配列は：

```

MCPSFYAVLG VLSLGSKTLL DTSLNLVNAT EPEKVMGKI QDCYNEAGVI TKISDLIIMG      60
TITTSPECIS HALSTLTDDV QEGISKLNPL GRGGGGSGGG GSGGGGSDIC PAVKEDVNIF      120
LTGTPDDYVK KVSQYQRNPV ILANAEKLNK CIDKKLTAED KENALSVLEK IYSSDFCLEH      180
HHHHH                                           185

```

10

(配列番号 7)

であり、該タンパク質をコードする核酸配列は：

```

atgtgccccgt cgttttatgc agtcctgggt gttctgtctt tgggttctaa aactttgctg      60
gacacgagcc tgaatctggt gaatgcaacg gagcctgaaa aggtcgcgat gggcaagatt      120
caggactggt acaacgaagc gggcgttatt accaagatca gcgacctgat cattatgggc      180
acgatcacca cgagcccaga gtgcatcagc cacgctttgt ccaccctgac caccgatgtc      240
caagagggca ttagcaagct gaacccgctg ggtcgcggtg gtggcggtag cggtggtggt      300
ggctccgggtg gcggtggcag cgatatttgt ccggcggtga aagaagatgt caacatcttc      360
ctgaccggta ccccgatga ttatgtgaaa aaagttagcc aataccagcg taatccggtt      420
atcctggcca atgccgagaa actgaagaac tgcctcgaca aaaagctgac cgcagaggac      480
aaagaaaacg cgctgagcgt gctggagaag atttacagca gcgacttctg tctcgagcac      540
caccaccacc accac                                           555

```

20

(配列番号 8)

である。

【0090】

プラスミドDNAコンストラクトを大腸菌株BL21-AI (Invitrogen) に導入し、3 Lバイオリアクター (Belach Bioteknik, Skogaes, Sweden) を用いて組換えEqu c s一本鎖タンパク質を製造した。

【0091】

組換えEqu c sの精製方法は、このタンパク質の2つのバリエーションでほとんど同じであった。回収した細胞を20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に再懸濁し、懸濁液をEmulsiflex C5ホモジナイザー (Avestin, Ottawa, Ontario, Canada) に10000~15000kPaで通すことによって細胞を溶解した。遠心および濾過によって清澄化した後、上清をNiSO₄を充填したChelating Sepharose FFカラム (GE Healthcare Life Sciences) に適用した。20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.15 M NaCl中の20 mM イミダゾールでカラムを洗浄し、同じ緩衝液中の20-500 mMのイミダゾール直線勾配において組換えタンパク質を溶出した (図9 a)。組換えタンパク質のさらなる精製を、Q Sepharose (商標) FFカラム (GE Healthcare Life Sciences) において20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いるAIECにより行った。0-0.6 M NaCl直線勾配を用いてタンパク質を溶出すると2重のピークが現れ、該2つのピークを別々にプールした (図9 b)。これら調製物のタンパク質濃度を、計算されたmg/mL当たりの吸光係数0.34を用いて280nmにおける吸光度から決定した。

30

40

【0092】

組換えEqu c sの生化学的特徴付け

rEqu c s abのピーク1およびピーク2の分析的ゲル濾過により、ピーク1は二量体および単量体形態のrEqu c sの混合物を含み (図10 a)、ピーク2は凝集物を多く含む (図10 b) ことが示された。この結果は、もう1つの組換え形態であるrEqu c s baにおいても同様であった (データを示していない)。

【0093】

一本鎖組換えEqu c sのSDS PAGE解析により、還元条件で19 kDaに単一のバンドが示され、非還元条件でわずかに低い見掛けの分子量16 kDaのバンドが示された (図10 c)。非還元条件においては、より高い分子量のバンドも主に39 kDaに存

50

在し、二量体形態のタンパク質を示すものと考えられた。

【0094】

rEqu c sの第1のバリエーション(rEqu c s ab)のN末端配列解析により、予測された配列から外れていない、イニシエーターメチオニンが完全に維持された、明白で明瞭な配列が読み取られた。第2のバリエーション(rEqu c s ba)の調製物においては、イニシエーターメチオニンはほぼ半分のサンプルにおいて維持され、残りの調製物は第2のアミノ酸鎖で開始した。結論として、組換え調製物は両方とも、インタクトなrEqu c sを含んでいた。

【0095】

組換えEqu c sに対するI g E結合の評価

2つの形態の組換えEqu c sのピーク1およびピーク2のそれぞれを、文献(Marknell DeWitt, Niederberger et al. 2002)に記載されるように実験用ImmunoCAP(商標)に固定化し、実施例1に記載される血清とのI g E反応を利用して、各調製物のI g E反応性を調べた。表9に示すように、すべての調製物が前記血清に対し同様のI g E反応性を示し、これは、天然タンパク質を含む精製された画分とのI g E反応性とも一致した(表6、画分2)。

【0096】

35人のウマ皮膚感作対象からの血清を用いて、組換えEqu c s abとR P Cからの天然精製タンパク質画分2(図4)とのI g E反応性を比較するさらなる解析を行った。

【0097】

精製された天然Equ c sに対するI g E結合と組換えEqu c sに対するI g E結合との一致は良好であったので($r = 0.99$)、この組換えタンパク質が免疫学的に活性であり構造的に天然タンパク質に類似することが示された。これらのデータは、同定されたゲノム配列情報から予測されたEqu c sの5 k D aおよび10 k D aサブユニットのアミノ酸配列は正確であり、精製ウマ皮膚アレルゲンEqu c sのアミノ酸配列を表すことの強力な証拠を提供する。

【実施例8】

【0098】

ウマアレルギー患者コホートにおけるnEqu c 1、nEqu c 2、nEqu c 3、nEqu c 4、Equ c 15kおよびEqu c sのI g E結合活性の評価

スペイン($n = 20$)およびスウェーデン($n = 5$)の25人のウマアレルギー患者からの血清を本試験に用いた。すべての患者が、喘息、鼻結膜炎および蕁麻疹のような症状を伴うウマアレルギーであると医師に診断されており、ウマ皮膚抽出物に対する皮膚ブリック試験に陽性であった。すべてのサンプルおよび臨床データは、該サンプルおよびデータを収集したバイオバンクを担う各施設の倫理委員会の承認の下に収集された。

【0099】

25人のウマアレルギー患者における、ウマ皮膚抽出物、nEqu c 1、nEqu c 2、nEqu c 3、nEqu c 4、rEqu c 15kおよびrEqu c s abに対する特異的I g E抗体のレベルを、ImmunoCAP(商標)を用いて測定した(図12、表10)。表10において、すべてのImmunoCAP(商標)レベルは $k U_A / L$ で示し、各患者の国名をE S(スペイン)またはS E(スウェーデン)と示す。ウマ暴露時のアレルギー症状の記録は、鼻炎(rhin)、喘息(ast m)、蕁麻疹(urt)またはアナフィラキシー(anaph)である。

【0100】

試験した25の血清中、13例(52%)がrEqu c sに対し $0.35 k U_A / L$ のI g E反応性を示し、12例(48%)がrEqu c 15kに対して、16例(64%)がnEqu c 2に対して、19例(76%)がnEqu c 1に対してI g E反応性を示した。nEqu c 3およびnEqu c 4/5に対しては、試験した血清中わずか5例(20%)および7例(28%)しかI g E抗体結合を示さなかったため、それらはいずれも被験者の中では主要でないアレルゲンであることが示された。本試験のコホートにおいて、rEqu c sのみに反応した患者は無かったが、25の血清中4例(16%)および2例がそれぞれEqu c 15kのみ、およ

10

20

30

40

50

びEqu c 1のみに反応した。Equ c 15kに反応性のすべての血清において、Equ c sに対するI g E抗体の濃度は、ウマ皮膚に対するI g E抗体濃度に対して、平均で30%であった。nEqu c 1に対するI g E抗体の対応する相対濃度は52%であり、nEqu c 2、nEqu c 3、nEqu c 4/5およびEqu c 15kに対するI g E抗体の対応する相対濃度はそれぞれ、35%、69%、9%および37%であった（これらアレルゲンに対し特異的に反応する血清において）。25の血清中24例が、ウマ皮膚抽出物に対してI g E抗体結合を示した。それら血清のすべてが、試験した5つの個々のウマアレルゲンの少なくとも1つに対して結合を示した。個々のコンポーネントに対するI g E結合レベルの合計は、ウマ皮膚抽出物に対するものと一致するか、またはそれを上回った。

【実施例9】

【0101】

Equ c sと、ネコ由来セクレトグロビンである主要ネコアレルゲンFel d 1との交差反応性

本発明の研究の出発点であった未知のI g E反応性はFel d 1によって阻害されたので、組換えEqu c sとFel d 1の関係を調べた。実施例8に記載したウマアレルギー患者25人を含む35人のウマ皮膚感作対象の血清において、Fel d 1に対するI g E結合のレベルを調べた。組換えEqu c sとrFel d 1に対するI g Eレベルの間に、明らかな相関が見られ($r = 0.92$) (図13)、ほぼ全ての患者において、Fel d 1に対するI g E反応性がEqu c sに対するI g E反応性よりも高かった。

【0102】

Equ c sとFel d 1との関係をさらに調べるために、固相上のウマ皮膚抽出物、rFel d 1およびrEqu c sと、阻害剤としての終濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のrEqu c 15k、rEqu c sおよびrFel d 1を用いて、実施例1において使用した5つの血清における交差阻害を調べた。阻害コントロール緩衝液として、0.3%ヒト血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を用いた。各阻害の2連の測定の平均を計算し、阻害の割合を、各阻害剤によって消失された阻害コントロール緩衝液使用時の結合の割合として計算した。

【0103】

上記の選択された血清において、ウマ皮膚抽出物に対する結合を阻害することができたのはFel d 1およびEqu c sのみであったので、Equ c sは確かに、それら血清の結合を説明できるウマ皮膚抽出物中の未知タンパク質であることが示された(表11A)。Fel d 1 immunoCAPに対する結合は、Fel d 1自体によって阻害されたが、Equ c sによっては阻害されず(図11B)、Equ c sに対する結合はFel d 1およびEqu c sのいずれによっても阻害された(図11C)。このことは、これら2つのタンパク質の配列は同一性が高いこと(図6cおよび図7c)とウマ皮膚感作血清集団に対するI g E結合の相関性が高いこととの両方により示唆されるとおりに、Fel d 1とEqu c sとの間でI g E結合は確かに交差反応性であることを示す。さらに、ウマ皮膚感作血清集団においてFel d 1はEqu c s固相への結合を阻害するがEqu c sはFel d 1への結合を阻害しないという事実、また、Fel d 1に対するI g E結合はEqu c sに対する結合よりも常に高いという事実から、それら血清が元々Fel d 1に感作されており、Equ c sに対する結合は交差反応性の結果であったことが示唆された。

【実施例10】

【0104】

アレルゲンタンパク質のバリエーションまたはフラグメント(被験物質)のI g E結合特性評価

元のアレルゲンタンパク質、本発明の場合はEqu c sを、固体支持体に固定化する。該当の種で感作され、該種からの元のアレルゲンタンパク質に対しI g E反応性を示す少なくとも3人のヒト患者からの血清サンプルを、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度の被験物質、また並行してネガティブコントロールとして緩衝液のみ、および大腸菌の非アレルゲン性マルトース結合タンパク質(MBP)と共に、室温で2時間インキュベートする。次いで、

10

20

30

40

50

サンプルを、Equ c sを固定化した固体支持体へのI g E結合について試験し、Equ c sのバリエーションまたはフラグメントとのプレインキュベーションがI g E結合を特異的に阻害または明らかに低下するかを調べる。

【 0 1 0 5 】

【表 1】

表 1 未知ウマ皮膚コンポーネントの検出に使用した血清のIgE結合性

	CDE	rFel d 1	HDE	rEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4	rEqu c 15k
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	>100	>100	12,0	0,19	0,46	0,05	0,11	0,08
B	97,0	95,1	11,4	0,21	0,32	0,07	0,16	0,08
C	87,9	>100	10,9	0,13	0,21	0,03	0,08	0,06
D	61,9	69,0	7,36	0,11	0,16	0,04	0,09	0,06
E	67,6	61,0	6,28	0,02	0,04	0,14	0,02	0,00

10

CDE - ネコ皮膚抽出物

HDE - ウマ皮膚抽出物

【 0 1 0 6 】

【表 2 (a)】

表 2 阻害剤として Equ c 15k、Fel d 1 および Fel d 7 を用いた、a)ネコ皮膚抽出物および b)ウマ皮膚抽出物に対するIgE結合の阻害

20

a) ネコ皮膚抽出物固相への結合

血清	阻害剤	濃度 (kU _A /L)	阻害 (%)
A	緩衝液	73,3	0
	Equ c 15k	74,6	-2
	Fel d 1	13,5	82
	Fel d 7	76,2	-4
B	緩衝液	59,7	0
	Equ c 15k	56,4	6
	Fel d 1	8,5	86
	Fel d 7	58,7	2
C	緩衝液	55,9	0
	Equ c 15k	57,2	-2
	Fel d 1	9,06	84
	Fel d 7	57,6	-3
D	緩衝液	39,1	0
	Equ c 15k	39,1	0
	Fel d 1	6,17	84
	Fel d 7	37,7	4
E	緩衝液	53,6	0
	Equ c 15k	51,2	4
	Fel d 1	19,0	65
	Fel d 7	56,7	-6

30

40

【 0 1 0 7 】

【表 2 (b)】

b) ウマ皮膚抽出物固相への結合

血清	阻害剤	濃度 (kUA/L)	阻害 (%)
A	緩衝液	7,46	0
	Equ c 15k	7,87	-5
	Fel d 1	0,12	98
	Fel d 7	7,99	-7
B	緩衝液	6,42	0
	Equ c 15k	6,57	-2
	Fel d 1	0,22	97
	Fel d 7	6,84	-6
C	緩衝液	6,27	0
	Equ c 15k	5,97	5
	Fel d 1	0,11	98
	Fel d 7	6,09	3
D	緩衝液	4,20	0
	Equ c 15k	4,04	4
	Fel d 1	0,10	98
	Fel d 7	4,42	-5
E	緩衝液	4,64	0
	Equ c 15k	4,56	2
	Fel d 1	0,06	99
	Fel d 7	4,70	-1

10

20

【 0 1 0 8 】

【表 3】

表 3 固定化したウマ皮膚抽出物 SEC クロマトグラフィー画分に対する
検出血清の IgE 結合

画分	18	22	26	30	34	38
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	18,9	16,4	18,3	10,1	4,01	1,78
B	12,4	11,5	11,8	7,02	3,04	1,53
C	15,2	12,3	12,2	7,25	3,02	1,46
D	10,7	8,79	8,44	5,40	2,22	1,02
E	11,0	9,31	9,24	6,45	2,49	0,77

30

【 0 1 0 9 】

【表 4】

表 4 固定化した、ウマ皮膚抽出物からの濃縮画分の HIC クロマトグラフィーによる
画分に対する、検出血清の IgE 結合

画分	8	17	23	36	39	42	60
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	0,21	0,25	0,44	2,67	3,99	11,9	22,9
B	0,29	0,65	0,55	2,69	3,15	9,43	16,8
C	0,17	0,22	0,30	2,03	3,25	9,98	18,0
D	0,17	0,19	0,26	1,59	2,27	6,62	11,4
E	0,06	0,16	0,19	1,15	2,20	8,32	13,9

40

【 0 1 1 0 】

50

【表 5】

表 5 固定化した、ウマ皮膚抽出物の濃縮画分の陰イオン交換クロマトグラフィーによる画分に対する、検出血清の IgE 結合

a) 1:4 希釈での固定化画分

画分	B3	B2	C1	C2	C5	C8	D9
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	25,7	25,5	23,5	23,3	20,3	20,5	5,2
B	18,1	17,9	17,9	16,9	16,2	16,3	4,0
C	17,1	16,8	16,8	16,7	17,1	16,2	3,8
D	11,6	11,7	11,7	11,2	11,4	10,3	2,6
E	14,9	14,4	14,7	13,9	14,5	12,1	2,0

10

b) 1:20 希釈での固定化プール

画分	B4-B1	C1-C4	C5-C11
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	10,71	9,00	6,50
B	8,92	7,67	5,07
C	8,46	6,72	4,97
D	5,44	4,48	3,26
E	5,74	4,46	3,00

20

【 0 1 1 1 】

【表 6】

表 6 固定化した、ウマ皮膚抽出物の濃縮画分の RPC クロマトグラフィーによる画分に対する、検出血清の IgE 結合

画分	1	2	3
血清	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	17,8	21,1	5,52
B	13,2	15,1	4,41
C	13,5	15,2	4,14
D	9,68	11,0	2,97
E	8,10	9,99	1,92

30

【 0 1 1 2 】

【表 7】

表 7 理論的なトリプシン切断 Equ c s フラグメントとマッチする、還元サンプルの
 a) 5kDa バンドおよび b) 10kDa バンドならびに c) 非還元サンプルの 18kDa
 バンドのゲル内消化によるペプチドフラグメント

a)

m/z 実測値	m/z 理論値	Equ c s 鎖	範囲	ペプチド	配列 番号:
2609.29	2609.28	1	23-45	-.DICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVK.K	17
1825.85	1825.88	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	18
1953.97	1953.98	1	30-46	K.EDVNIFLTGTPDDYVKK.V	19
908.50	908.49	1	46-52	K.KVSQYQR.N	20
780.39	780.39	1	47-52	K.VSQYQR.N	21
1068.59	1068.6	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	22
1659.84	1659.88	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	23
891.39	891.35	1	86-92	K.IYSSDFC.-	24

10

b)

m/z 実測値	m/z 理論値	Equ c s 鎖	範囲	ペプチド	配列 番号:
1697.84	1697.89	2	24-39	-CPSFYAVLGVLSLGSK.T	25
1510.67	1510.72	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	26

20

c)

m/z 実測値	m/z 理論値	Equ c s 鎖	範囲	ペプチド	配列 番号:
2609.31	2609.28	1	23-45	-.DICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVK.K	27
1825.86	1825.88	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	28
1953.93	1953.98	1	30-46	K.EDVNIFLTGTPDDYVKK.V	29
908.46	908.49	1	46-52	K.KVSQYQR.N	30
1068.56	1068.6	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	31
1659.84	1659.88	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	32
1510.69	1510.72	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	33

30

【 0 1 1 3 】

【表 8】

表 8 RPC からの溶液内消化画分の MS/MS により同定されたペプチド

m/z 実測値	m/z 理論値	MS/MS スコア	Equ c s 鎖	範囲	ペプチド	配列 番号:
802.34	802.41	22.2	1	23-29	-.DICPAVK.E	34
1825.96	1825.88	88.0	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	35
908.46	908.49	55.3	1	46-52	K.KVSQYQR.N	36
780.34	780.39	25.9	1	47-52	K.VSQYQR.N	37
1068.58	1068.6	75.9	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	38
1659.89	1659.88	82.4	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	39
891.31	891.35	14.8	1	86-92	K.IYSSDFC.-	40
1510.75	1510.72	127.2	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	41
1697.90	1697.89	128.3	2	24-39	-CPSFYAVLGVLSLGSK.T	42
2573.50	2573.32	53.4	2	75-98	K.ISDLIIMGITTTSPECISHALSTL.T*	43

10

* タンパク質のセミトリプシン切断により同定されたペプチド

【 0 1 1 4 】

【表 9】

表 9 rEqu s c 調製物の IgE 反応性

血清	ピーク 1	ピーク 2	ピーク 1	ピーク 2
	rEqu c s ba	rEqu c s ba	rEqu c s ab	rEqu c s ab
	kU _A /l	kU _A /l	kU _A /l	kU _A /l
A	24,87	23,09	23,40	23,12
B	15,70	15,02	15,61	15,23
C	15,15	15,34	16,77	15,57
D	15,41	15,59	16,10	15,50
E	13,16	12,99	13,05	13,23

20

【 0 1 1 5 】

30

【表 10】

表 10 ウマアレルギー患者 25 人の IgE 反応性

患者番号	症状	国名	e3	nEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4	rEqu c 15k	rEqu c s
1	Rhin	SE	1,55	0,06	0,21	0,12	0,30	1,31	0,14
2	Rhin, astm	SE	1,28	1,24	0,56	0,00	0,16	0,03	0,48
3	Rhin	ES	4,79	1,42	0,13	0,00	0,04	1,89	0,05
4	Rhin, astm	ES	5,87	4,96	2,32	0,07	0,53	0,16	1,14
5	Rhin, astm	ES	1,79	1,28	0,26	0,01	0,15	0,04	1,12
6	Rhin, astm	ES	8,74	5,41	5,56	0,00	0,34	0,02	0,80
7	Rhin, astm	ES	0,21	0,00	0,02	0,00	0,02	0,20	0,06
8	Rhin, astm	ES	4,55	1,41	2,02	0,00	0,53	0,86	0,10
9	Rhin	ES	0,55	0,00	0,01	0,00	0,02	0,63	0,06
10	astm, urt, a	ES	17,31	6,20	2,67	11,90	3,11	6,07	0,08
11	Rhin	ES	16,62	1,30	15,15	5,04	0,86	0,10	1,72
12	Rhin, urt	ES	13,49	2,91	1,19	0,03	0,30	12,96	1,31
13	hin, astm, u	SE	26,19	11,04	7,48	0,05	2,94	5,68	1,80
14	Rhin	SE	6,58	3,42	1,08	0,01	0,48	1,16	2,23
15	Rhin, astm	SE	7,01	0,03	0,04	0,04	0,20	7,45	0,13
16	Rhin	ES	6,78	5,77	0,95	9,43	0,28	0,02	0,97
17	Rhin	ES	28,73	21,92	5,89	33,75	1,19	0,24	9,25
18	Rhin, urt	ES	13,81	5,44	14,10	0,05	0,13	0,07	0,14
19	Rhin, astm	ES	5,18	0,06	0,08	0,06	0,18	5,81	1,54
20	Rhin, astm	ES	0,78	0,76	0,09	0,01	0,02	0,02	0,06
21	Rhin, astm	ES	1,96	1,63	0,58	0,01	0,16	0,04	0,32
22	Rhin, urt	ES	1,28	0,24	1,75	0,01	0,02	0,06	0,23
23	Rhin, astm	ES	6,94	2,49	0,30	0,00	0,10	1,36	4,02
24	Rhin, astm	ES	3,18	1,46	1,31	0,00	0,13	0,60	0,05
25	Rhin	ES	7,78	5,46	1,32	4,61	0,08	0,03	4,99

10

20

【 0 1 1 6 】

30

【表 1 1 (a)】

表 11 阻害剤として Equ c 15k、Equ c s および Fel d 1 を用いた、a)ウマ皮膚抽出物、b) rFel d 1 および c) rEqu c s の固相に対する IgE 結合の阻害

a) ウマ皮膚抽出物固相への結合

血清	阻害剤	濃度 (kUA/L)	阻害 (%)
A	緩衝液	6,71	0
	Equ c 15k	7,40	-10
	Equ c s	0,27	96
	Fel d 1	0,13	98
B	緩衝液	5,03	0
	Equ c 15k	5,10	-2
	Equ c s	0,33	93
	Fel d 1	0,20	96
C	緩衝液	5,49	0
	Equ c 15k	5,50	0
	Equ c s	0,25	96
	Fel d 1	0,12	98
D	緩衝液	5,01	0
	Equ c 15k	5,32	-6
	Equ c s	0,22	96
	Fel d 1	0,13	97
E	緩衝液	3,70	0
	Equ c 15k	4,06	-10
	Equ c s	0,09	98
	Fel d 1	0,06	98

10

20

30

【 0 1 1 7 】

【表 1 1 (b)】

b) rFel d 1 固相への結合

血清	阻害剤	濃度 (kUA/L)	阻害 (%)
A	緩衝液	54,97	0
	Equ c 15k	57,45	-5
	Equ c s	58,70	-7
	Fel d 1	5,22	91
B	緩衝液	42,07	0
	Equ c 15k	43,80	-4
	Equ c s	43,20	-3
	Fel d 1	3,87	91
C	緩衝液	47,30	0
	Equ c 15k	49,98	-6
	Equ c s	48,35	-2
	Fel d 1	4,01	92
D	緩衝液	44,15	0
	Equ c 15k	45,25	-2
	Equ c s	41,90	5
	Fel d 1	3,85	91
E	緩衝液	32,38	0
	Equ c 15k	33,32	-3
	Equ c s	29,99	7
	Fel d 1	2,02	94

10

20

【 0 1 1 8 】

【表 1 1 (c)】

c) rEqu c s 固相への結合

血清	阻害剤	濃度 (kUA/L)	阻害 (%)
A	緩衝液	13,39	0
	Equ c 15k	11,73	12
	Equ c s	5,30	60
	Fel d 1	0,59	96
B	緩衝液	9,08	0
	Equ c 15k	8,63	5
	Equ c s	3,47	62
	Fel d 1	0,45	95
C	緩衝液	10,05	0
	Equ c 15k	9,37	7
	Equ c s	3,82	62
	Fel d 1	0,40	96
D	緩衝液	9,22	0
	Equ c 15k	8,44	8
	Equ c s	3,76	59
	Fel d 1	0,40	96
E	緩衝液	6,60	0
	Equ c 15k	6,33	4
	Equ c s	1,59	76
	Fel d 1	0,24	96

10

20

【 0 1 1 9】

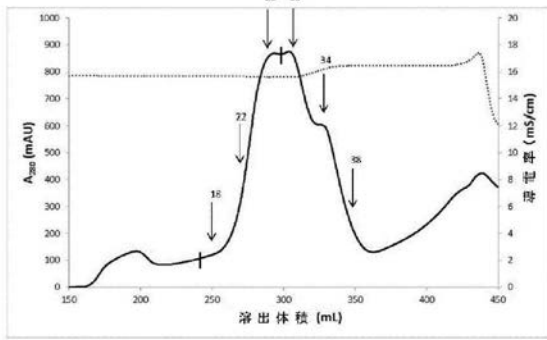
文献

- Akdis, C. A. (2006). "Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease." Curr Opin Immunol **18**(6): 718-726.
- Akdis, M. and C. A. Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **119**(4): 780-791.
- Asarnoj, A., R. Moverare, et al. (2010). "IgE to peanut allergen components: relation to peanut symptoms and pollen sensitization in 8-year-olds." Allergy.
- Asarnoj, A., C. Nilsson, et al. (2012). "Peanut component Ara h 8 sensitization and tolerance to peanut." J Allergy Clin Immunol **130**(2): 468-472.
- Breiteneder, H., K. Hoffmann-Sommergruber, et al. (1997). "Recombinant allergens; basic and practical considerations." Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut - Bundesamt für Sera und Impfstoffe - Zu Frankfurt Am(91): 80-86.
- Cabañas, R., M. C. López-Serrano, et al. (2000). "Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens." Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology **10**(2): 71-77. 10
- Canonica, G. W., I. J. Ansotegui, et al. (2013). "A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics." World Allergy Organ J **6**(1): 17.
- Caubet, J. C., R. Bencharitiwong, et al. (2012). "Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG(4) ratios in egg allergy." J Allergy Clin Immunol **129**(3): 739-747.
- Codreanu, F., O. Collignon, et al. (2011). "A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis." Int Arch Allergy Immunol **154**(3): 216-226.
- Cromwell, O., H. Fiebig, et al. (2006). "Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies." Immunol Allergy Clin North Am **26**(2): 261-281, vii.
- Custovic, A., L. Soderstrom, et al. (2011). "Allergen-specific IgG antibody levels modify the relationship between allergen-specific IgE and wheezing in childhood." J Allergy Clin Immunol **127**(6): 1480-1485.
- Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ. Cl, the Horse Major Allergen." Journal of Chromatography-Biomedical Applications **621**(1): 23-31. 20
- Du Toit, G., G. Roberts, et al. (2015). "Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy." N Engl J Med **372**(9): 803-813.
- Ebisawa, M., R. Moverare, et al. (2012). "Measurement of Ara h 1-, 2-, and 3-specific IgE antibodies is useful in diagnosis of peanut allergy in Japanese children." Pediatr Allergy Immunol **23**(6): 573-581.
- Ebisawa, M., R. Shibata, et al. (2012). "Clinical utility of IgE antibodies to omega-5 gliadin in the diagnosis of wheat allergy: a pediatric multicenter challenge study." Int Arch Allergy Immunol **158**(1): 71-76.
- Goubran Botros, H., C. Gregoire, et al. (1996). "Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies." Immunology **88**(3): 340-347.
- Goubran Botros, H., P. Poncet, et al. (2001). "Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens." Eur J Biochem **268**(10): 3126-3136. 30
- Goubran Botros, H., J. Rabillon, et al. (1998). "Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat." Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications **710**(1-2): 57-65.
- Gregoire, C., I. Rosinski-Chupin, et al. (1996). "cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily." Journal of Biological Chemistry **271**(51): 32951-32959.
- Gronlund, H., T. Saame, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." Int Arch Allergy Immunol **151**(4): 265-274.
- Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." FASEB Journal **16**(3): 414-416.
- Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." J Allergy Clin Immunol **116**(3): 608-613.
- Kim, J. L., L. Elfman, et al. (2005). "Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment." Indoor Air **15**(3): 170-182. 40
- Laukaitis, C. and R. Karn (2005). "evolution of the secretoglobins: a genomic and proteomic view." biol J Linnean Soc **84**: 493-501.

- Liccardi, G., G. D'Amato, et al. (2011). "Sensitization to Horse Allergens in Italy: A Multicentre Study in Urban Atopic Subjects without Occupational Exposure." *Int Arch Allergy Immunol* **155**(4): 412-417.
- Marknell DeWitt, Å., V. Niederberger, et al. (2002). "Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11." *Clinical & Experimental Allergy* **32**(9): 1329-1340.
- Masthoff, L. J., L. Mattsson, et al. (2013). "Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults." *J Allergy Clin Immunol* **132**(2): 393-399.
- Matsuo, H., J. Dahlstrom, et al. (2008). "Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis." *Allergy* **63**(2): 233-236.
- Mattsson, L., T. Lundgren, et al. (2009). "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen." *J Allergy Clin Immunol* **123**(2): 362-368. 10
- McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." *PLoS One* **4**(5): e5726.
- Müller, U., P. Schmid-Grendelmeier, et al. (2012). "IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy." *Allergy* **67**(8): 1069-1073.
- Nicolaou, N., M. Poorafshar, et al. (2010). "Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics." *J Allergy Clin Immunol* **125**(1): 191-197 e191-113.
- Ronmark, E., M. Perzanowski, et al. (2003). "Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies." *Pediatr Allergy Immunol* **14**(2): 91-99.
- Saarelainen, S., M. Rytönen-Nissinen, et al. (2008). "Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity." *Clin Exp Allergy* **38**(2): 374-381. 20
- Saarni, T., L. Kaiser, et al. (2005). "Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1." *Clin Exp Allergy* **35**(5): 657-663.
- Smith, W., A. J. Butler, et al. (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." *Clinical & Experimental Allergy* **34**(11): 1732-1738.
- Spitzauer, S., C. Schweiger, et al. (1993). "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting." *International Archives of Allergy and Immunology* **100**: 60-67.
- Stumvoll, S., K. Westritschmig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parictaria judaica* pollen allergens." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**(5): 974-979.
- Tutluoglu, B., S. Atis, et al. (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." *Clin Exp Allergy* **32**(8): 1170-1173.
- Uersmosi, C., R. R. Beerli, et al. (2010). "Mechanisms of allergen-specific desensitization." *J Allergy Clin Immunol* **126**(2): 375-383. 30
- Uersmosi, C., F. Zabel, et al. (2014). "IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization." *Allergy* **69**(3): 338-347.
- Wainstein, B. K., A. Yee, et al. (2007). "Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children." *Pediatr Allergy Immunol* **18**(3): 231-239.
- Valenta, R., J. Lidholm, et al. (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." *Clinical and Experimental Allergy* **29**(7): 896-904.
- Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* **119**(4): 826-830.

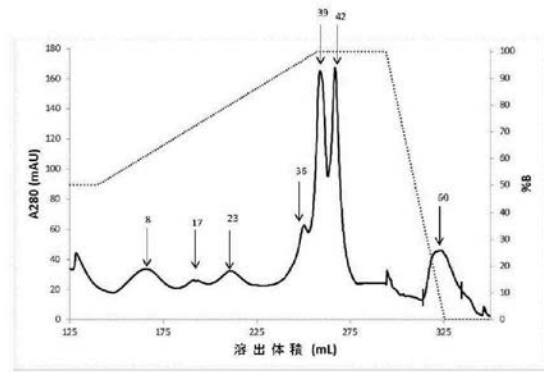
【 図 1 】

Figure 1



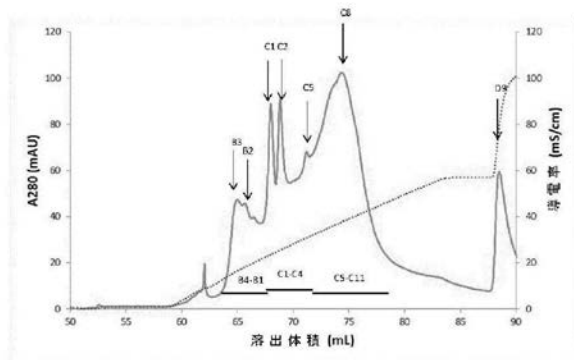
【 図 2 】

Figure 2



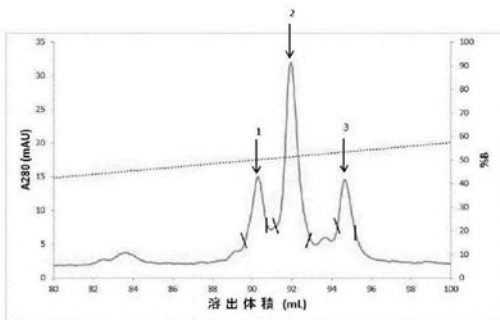
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【 図 6 】

Figure 6

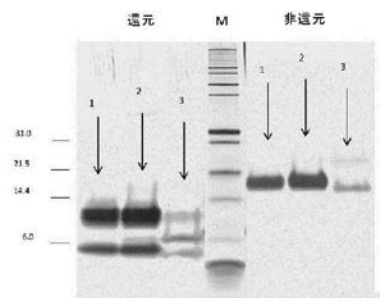
a)
 ATGAAGCGGGCTGGTCTCTCGTCTGCTCTGGACCACCTTGCTTCTGA
 TCCAGGCAGAAATTGTGACATTTGCCAGCCGTGAAGGAAGATGTAA
 TATATCTCTGACAGGAACCCCTGATGACTATGTAAAAAGTTTCACAGT
 ACCAACGCAATCCTGTAATATTGCCAATGCTGAAAAGCTAAAGAACTG
 CATTGATAAGAAATTGACAGCCGAGGATAAGGAGAATGCCCTCAGTGTG
 CTGGAGAAAATATACTCAAGTGATTTTGTAA (SEQ ID NO: 45)

b)
 MKRAGALVLLWTTLLIIPGRNCDICPAVKEDVINFLTGTDDYVKKVSQYQ
 RNPVILANAELKNCIDKLLTAEDKENALSLEKIYSSDFC (SEQ ID NO: 1)

c)
 Eqn o s 1 EICPAVKEDKNEFLDQTPDGVKQKQYVGRNPFILANAEKIKNCIDKLTAEKRNALNV 80
 =EIQDQK DV+EL QTPD DV+VQVQ FV+LANA IASQSD R+Y EGRNALSQV 78
 Fol d l 1 EICPAVNDVQLFNDTFCREVEQVQVQVAVVLANASRLKNCYDANTEEGRNALSQV 78
 Eqn o s 1 LEKIYSSDFC 79
 I+KIYAS C
 Fol d l 1 LEKIYSSDFC 89

【 図 5 】

Figure 5



【 図 7 】

Figure 7

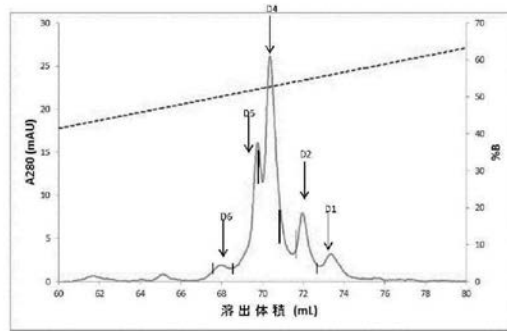
a)
 ATGAAGGGGGCACTGCTTGTGCTGGCCTTGTGGTGACCAGAGAGC
 TGGGCATCAAGATGGCGGAAGCTTGCCCGAGTTTTATGCAGTCCTT
 GGTGTGTGTGCTCTGGAAGCAAGACACTTGGACACCTCCCTCAA
 TCTGGTCAATGCTACTGAACCGAAAAAGTAGCCATGGGAAAAATCC
 AGGATTGCTACAATGAGCGGGAGTCATAACCAAGATCTCGGATCTG
 ATCATCATGGGTACTATCACCCAGCCGAGAATGCATCAGCCACGCA
 CTGAGCACATTGACGACGGATGTTCAAGAAGGCATTCTAAGCTGAA
 CCCTCTGGGGAGATGA (SEQ ID NO: 46)

b)
 MKGALLVLALLVRELGIKMAEACPSFYAVLGVLSLGSKTLTDSLNLVN
 ATEPEKVMGKIQCYNAGVITKISDLIIMGTTTTSPECISHALSTLTDD
 VQEGISKLNPLGR (SEQ ID NO: 2)

c)
 Equ c = 2 CPSPYAVLGVLSLGSKTLTDSLNLVNATKPSNYMNSKLGCTNAGVITKISDLIINTE 69
 CP SY V ++ G++ LLD SL *NATERS+ AM KEGCOY E G+I++ D +NS I
 PeL d 1 2 CPITVYFFAVANGKLLLDLGLKKNAPSPRYAMKTKQCVYVNLISAVTKLQVNT 93
 Equ c = 2 ITTSDGKISMLTSTTIVDGGSLKMLQGR 91
 I+NS +G+ *K + D+ *KLV LQR
 PeL d 1 2 ISSSDKNSRVAQNTVSDI-----KLVTLGR 199

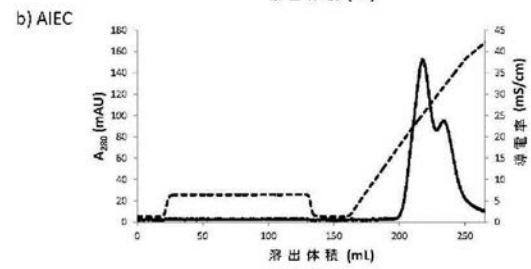
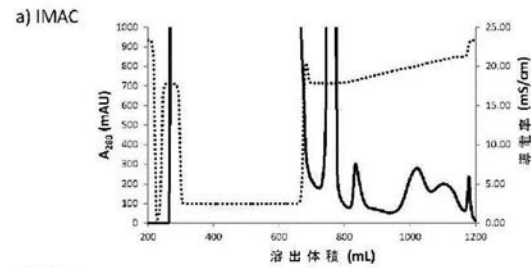
【 図 8 】

Figure 8



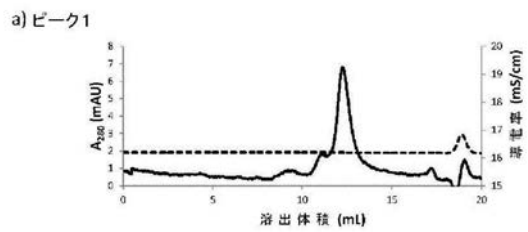
【 図 9 】

Figure 9



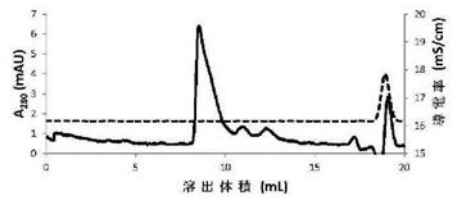
【 図 10 (a) 】

Figure 10



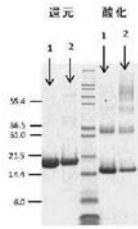
【 図 10 (b) 】

b) ピーク2



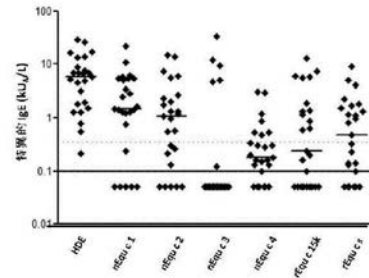
【 図 10 (c) 】

Fig 10 c)
SDS PAGE



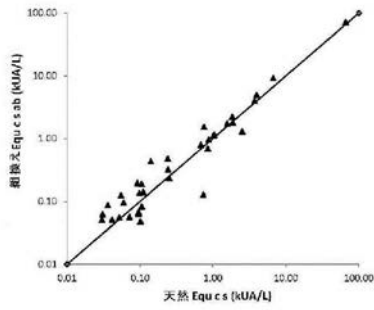
【 図 1 2 】

Figure 12



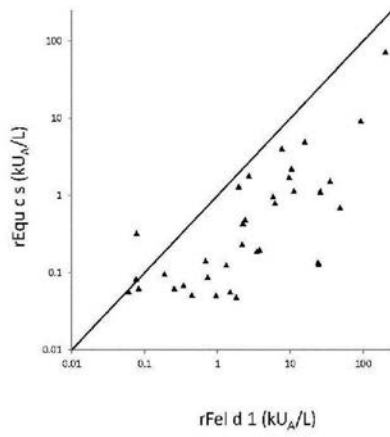
【 図 1 1 】

Figure 11



【 図 1 3 】

Figure 13



【配列表】

2017524358000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SE2015/050828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/35 ADD.		
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) A61K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/133105 A1 (PHADIA AB [SE]; MATTSSON LARS [SE]; LIDHOLM JONAS [SE]; LUNDGREN THOMA) 27 October 2011 (2011-10-27) cited in the application page 4, paragraph 2 page 6, paragraph 4 claims 12, 15, 16, 19	1-8, 10-27
X	----- DATABASE Nucleotide [Online] 14 July 2014 (2014-07-14), XP002745342, retrieved from NCBI Database accession no. XM_008515073	9
Y	----- abstract	1-8, 10-27
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2 October 2015		Date of mailing of the international search report 16/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barnas, Christoph

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SE2015/050828

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE Nucleotide [Online]</p> <p>14 July 2014 (2014-07-14), XP002745343, retrieved from NCBI Database accession no. XM_008515074</p>	9
Y	<p>abstract</p> <p>-----</p>	1-8, 10-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/SE2015/050828

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011133105 A1	27-10-2011	AU 2011243277 A1	25-10-2012
		CA 2794556 A1	27-10-2011
		CN 103108883 A	15-05-2013
		EP 2560990 A1	27-02-2013
		JP 2013528364 A	11-07-2013
		RU 2012150039 A	27-05-2014
		US 2013045233 A1	21-02-2013
		WO 2011133105 A1	27-10-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/06 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Q
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
A 6 1 K	39/35 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/35	
		A 6 1 P	37/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72)発明者 ラーシュ・マットソン
スウェーデン、エス - 7 5 4 3 0 ウブサラ、レヴァーティンスガータン 2 6 番
- (72)発明者 ウルリカ・オルソン
スウェーデン、エス - 7 5 7 5 4 ウブサラ、ヴェーストゲータレサン 5 5 番
- (72)発明者 トーマス・ルンドグレン
スウェーデン、エス - 7 5 2 6 0 ウブサラ、ステンハグスヴェーゲン 1 0 2 番
- (72)発明者 ヨナス・リードホルム
スウェーデン、エス - 7 4 1 4 2 クニヴスタ、ビョルクネスヴェーゲン 9 番
- (72)発明者 ホーカン・ラーション
スウェーデン、エス - 7 4 3 8 1 ベーリンイエ、モールスタヴェーゲン 5 セー番

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ79 QR16 QR55 QS12 QX02
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01
4B065 AA26X AA90Y AB01 AC14 CA44 CA46
4C085 AA03 BB03 BB11 CC21 DD62 EE01
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017524358A5	公开(公告)日	2018-08-16
申请号	JP2017503551	申请日	2015-07-20
申请(专利权)人(译)	Phadia激活因子宝来得到		
[标]发明人	ラーシュマットソン ウルリカオルソン トーマスルンドグレン ヨナスリードホルム ホーカンラーション		
发明人	ラーシュ・マットソン ウルリカ・オルソン トーマス・ルンドグレン ヨナス・リードホルム ホーカン・ラーション		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/06 G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00 A61K39/35 A61P37/08		
CPC分类号	A61K39/35 C07K14/00 G01N33/6854 A61P37/08 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.A C07K19/00.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C C12Q1/06 G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N37/00.102 A61K39/35 A61P37/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR55 4B063 /QS12 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BB03 4C085/BB11 4C085 /CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	1450907 2014-07-21 SE		
其他公开文献	JP2017524358A		

摘要(译)

本发明涉及筛选具有第一肽链和第二肽链的化合物的方法，并将它们作为整体组合在一起，至少与SEQ ID NO：3的序列和SEQ ID NO：4的序列具有序列同一性。70%，以及由分离的异二聚体蛋白组成的新型马过敏原，其是SEQ ID NO：3的氨基酸序列和SEQ ID NO：4的氨基酸。其中与序列组合的总体序列同一性为至少70%，例如75%，80%，85%，90%，95%或98%。本发明还涉及所述蛋白质在I型变态反应的诊断和治疗方法中的用途和治疗方法以及用于所述方法的试剂盒和组合物。