

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 231563

(P2001 - 231563A)

(43)公開日 平成13年8月28日(2001.8.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/35	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/35		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18		C 1 2 P 21/02	C 4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/53	Q 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53			D

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 40930(P2000 - 40930)

(22)出願日 平成12年2月18日(2000.2.18)

(71)出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72)発明者 高井 敏朗

茨城県北相馬郡守谷町緑1 - 1 - 21 アサヒ

ビール株式会社食品薬品研究所内

(72)発明者 横田 豊一

東京都墨田区吾妻橋1 - 23 - 1 アサヒビー

ル株式会社研究開発本部内

(74)代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改変したダニアレルゲン (システイン変異体) 及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】本発明は、例えばアレルギー特異的免疫療法用に期待される、IgE結合活性が低減した、ヒョウヒダニ (Dermatophagoides属) のグループ2アレルギーに変異を導入した変異アレルギー、およびそれらをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】Dermatophagoides属のグループ2アレルギーの、2組 (21位-27位と73位-78位) または3組 (8位-119位、21位-27位と73位-78位) のSS結合の破壊によってアレルギー活性を低減した変異体。それらの製造法。それらをコードする遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列表の配列番号3または4に代表されるヒョウヒダニ (*Dermatophagoides*属) のグループ2アレルギーのアミノ酸配列のうち、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合の破壊を導く変異のいずれかを導入したアミノ酸配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項2】配列表の配列番号3または4に代表されるヒョウヒダニ (*Dermatophagoides*属) のグループ2アレルギーのアミノ酸配列のうち、21位、27位、73位、78位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列、または8位、21位、27位、73位、78位、119位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項3】配列表の配列番号3に代表されるコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farine*) のグループ2アレルギーであるDer f 2のアミノ酸配列のうち、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合の破壊を導く変異のいずれかを導入したアミノ酸配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項4】配列表の配列番号3に代表されるコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farine*) のグループ2アレルギーであるDer f 2のアミノ酸配列のうち、21位、27位、73位、78位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列、8位、21位、27位、73位、78位、119位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項5】配列表の配列番号3のコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farine*) のグループ2アレルギーであるDer f 2のclone 11のアミノ酸配列のうち、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合の破壊を導く変異のいずれかを導入したアミノ酸配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項6】配列表の配列番号3のコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farine*) のグループ2アレルギーであるDer f 2のclone 11のアミノ酸配列のうち、21位、27位、73位、78位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列、あるいは8位、21位、27位、73位、78位、119位のシステイン残基をセリン残基に置換した配列を有し、アレルギー活性を低減している配列表の配列番号1あるいは2のアミノ酸配列を有する変異体。

【請求項7】請求項1ないし6のいずれか1項記載の変異体から誘導された誘導体。

【請求項8】請求項1ないし6のいずれか1項記載の変異体を発現させるためのプラスミドを作製し、それらを宿主細胞に導入して変異アレルギーを生産する細胞を得、その細胞を培養することによって変異アレルギーを

生産することを特徴とする請求項1ないし7のいずれか1項記載の変異体または誘導体の製造方法。

【請求項9】宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする請求項8記載の製造方法。

【請求項10】請求項1ないし7のいずれか1項記載の変異体または誘導体を含有する治療薬用、予防薬用または検査薬用組成物。

【請求項11】請求項1ないし6のいずれか1項記載の変異体をコードする遺伝子DNA、RNAまたはその誘導体。

【請求項12】請求項11記載の変異体をコードする遺伝子DNA、RNAまたはその誘導体を含有する治療薬用または予防薬用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子工学によりヒョウヒダニ (*Dermatophagoides*属) のグループ2アレルギーを改変した改変アレルギーに関する。さらに具体的には、*Dermatophagoides*属のグループ2アレルギーの、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合の破壊のいずれかによってアレルギー活性を低減した変異体、その誘導体、それらの製造法、それらをコードする遺伝子、さらには該変異体あるいは該遺伝子を有効成分とする製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫系は生体防御に重要な役割を担っているが、アレルギーなどの好ましくない反応を引き起こすことがある。アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのI型アレルギーは大きな社会問題となっている。I型アレルギーの原因となる抗原はハウスダスト、花粉や食物などであり、アレルギーと呼ばれる (Moffatt ら、1994年、Lancet、343巻、1597-1600頁)。

【0003】アレルギー患者では、アレルギーに特異的なIgE抗体の血中濃度が上昇している。IgEは組織の肥満細胞や血液中の好塩基球の表面に発現している高親和性IgE受容体に結合する。アレルギーに暴露されることにより、IgE受容体が多価のアレルギーとIgEにより架橋されると、細胞が活性化され、ヒスタミンをはじめとする種々の化学伝達物質が放出されて即時型反応が誘導される。時間をかけてサイトカインの発現が誘導され、好酸球の集積による遅発型反応が誘導される (高井ら、1995年、内科、76巻、4号、761-766頁)。

【0004】アレルギー特異的免疫療法はアレルギーを長期間繰り返し患者に投与するアレルギー治療法であり、今世紀初頭より効果的な治療法として実施されてきた (Noon、1911年、Lancet、1巻、1572-1573頁)。一般にアレルギーの粗エキスが投与されており、品質および量に限界があったが、1990年代に様々なアレルギー遺伝子がクローニングされ、高純度かつ大量のリコンビナ

ント・アレルゲンが供給可能となりつつある (Valentaら、1995年、Curr. Opin. Immunol.、7巻、751-756頁)。

【0005】ハウスダストは様々なアレルギー疾患に関わる、最も重要なアレルゲンである。その実体はハウスダスト中に生息する *Dermatophagoides* 属のヒョウヒダニ (コナヒョウヒダニ: *Dermatophagoides farinae* および ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus*) である。さらに、ほとんどのダニアレルギー患者がグループ1アレルゲン (Der f 1 および Der p 1) およびグループ2アレルゲン (Der f 2 および Der p 2) に対して皮膚テスト陽性かつ血清中の特異的IgE抗体陽性であり、これらの主要ダニアレルゲンに強く感作されていることが知られている (Platts-Millsら、1987年、J. Allergy Clin. Immunol.、80巻、755-775頁)。これらのダニ主要アレルゲンの遺伝子は現在までに既にクローニングされている (Derf 1: Dilworthら、1991年、Clin. Exp. Allergy、21巻、25-32頁。Der p 1: Chuaら、1988年、J. Exp. Med.、167巻、175-182頁。Der f 2: Yuukiら、1990年、アレルギー (Jpn. J. Allergol.)、39巻、557-561頁。Der p 2: Chuaら、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.、1990年、91巻、118-123頁)。

【0006】アレルゲン特異的免疫療法の抱える主要な問題点はアナフィラキシー反応である。これを解決する手段として、T細胞エピトープを含む合成ペプチド (Hoyneら、1995年、Curr. Opin. Immunol.、7巻、757-761頁)、プロテアーゼ消化によりペプチド断片化したアレルゲン (Litwinら、1991年、Clin. Exp. Allergy、21巻、457-465頁)、化学修飾によりアレルゲン活性を低下させたアレルゲン (Mistrelloら、1996年、Allergy、51巻、8-15頁)、遺伝子工学的手法によりアレルゲン活性を低下させた変異アレルゲン (Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁) などが提案されている。

【0007】*D. farinae* のグループ2アレルゲンである Der f 2 と、*D. pteronyssinus* のグループ2アレルゲンである Der p 2 はアミノ酸配列において非常に高い相同性を有している。これらのグループ2アレルゲンについてはダニ抽出物より精製したものと同等の活性を保持したりコンビナント・アレルゲンを調製することが可能となっている (Der f 2: Nishiyamaら、1994年、Int. Arch. Allergy Immunol.、105巻、62-69頁。Der p 2: Hakkaartら、1998年、Clin. Exp. Allergy、28巻、45-52頁)。本発明者らのグループにより、グループ2アレルゲンの3組の分子内SS結合の位置 (8位-119位、21位-27位、73位-78位) (Nishiyamaら、1993年、Int. Arch. Allergy Immunol.、101巻、159-166頁)、および、グループ2アレルゲンの立体構造 (Ichikawaら、1998年、J. Biol. Chem.、273巻、356-360頁) が決定された。さらに、本発明者らをはじめとする複数のグループによっ

て、遺伝子工学的手法によりグループ2アレルゲンの活性を低下させた変異体が作製されている (Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかし、アレルゲン分子上のエピトープを認識する患者血清中のIgEはポリクローナルな集団であり、アレルゲン分子上の各エピトープの各々の重要性の程度は全ての患者間で完全に一致しているわけではない。よって、変異アレルゲンを用いてアレルギー特異的免疫療法を行う場合、アナフィラキシーショックのリスクを回避して安全性を向上させるためには、これまでに作製された *Dermatophagoides* 属のグループ2アレルゲンの変異体よりもさらにアレルゲン活性を低減した新規な変異体が必要である。

【0009】本発明の目的は、これまでに作製された *Dermatophagoides* 属のグループ2アレルゲンの変異体よりもさらにアレルゲン活性を低減した新規な変異体、その誘導體、それらの製造法、それらをコードする遺伝子、さらには該変異体あるいは該遺伝子を有効成分とする治療薬、予防薬、および検査薬を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは *Dermatophagoides farinae* のグループ2アレルゲンの解析により、3組の分子内SS結合全てがIgE結合能に影響を及ぼすこと、3組のSS結合の中では8位-119位と73位-78位のSS結合の寄与が大きいことを見出した (特開平6-253851。Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁)。

【0011】このような状況下において、本発明者らは複数のSS結合を破壊した変異体では1組のSS結合を破壊した変異体よりもさらにIgE結合能が低下するのではないかと考え、本発明に着手した。

【0012】本発明者らは、*Dermatophagoides farinae* のグループ2アレルゲンの、2組 (21位-27位と73位-78位) または3組 (8位-119位、21位-27位と73位-78位) のSS結合の破壊によってアレルゲン活性を低減した変異体の作製に成功した。本発明における、配列表の配列番号3及び4をそのアミノ酸配列の代表的なものとして有する *Dermatophagoides* 属のグループ2アレルゲンへの変異の導入は合目的な任意の方法で行うことができるが、部位特異的変異および制限酵素認識部位の利用による遺伝子組換えの方法が望ましい。複数の患者血清中IgEとの反応性、野生型Der f 2へのIgEの結合を阻害する活性、アレルギー患者好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性を測定することにより、作製した変異体のアレルゲン活性を評価した。2組 (21位-27位と73位-78位) または3組 (8位-119位、21位-27位と73位-78位) のSS結合を破壊した変異体はいずれも野生型Der f 2と比較してIgE結合活性またはアレルゲン活性が大幅に低下していることが判明し、本発明を完成することができた。

【0013】本発明のDermatophagoides属のグループ2アレルギーの変異体とは、配列表の配列番号3及び4をそのアミノ酸配列の代表的なものとして有するDermatophagoides属のグループ2アレルギーの、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合を破壊した変異体、あるいは配列表の配列番号1および2のアミノ酸配列を有する変異体であることを特徴とする。

【0014】本発明のDer f 2の変異体とは配列表の配列番号3をそのアミノ酸配列の代表的なものとして有するDermatophagoides farinaeのグループ2アレルギーDer f 2の、2組(21位-27位と73位-78位)または3組(8位-119位、21位-27位と73位-78位)のSS結合を破壊した変異体、あるいは配列表の配列番号1および2のアミノ酸配列を有する変異体であることを特徴とする。

【0015】本発明の誘導体とは、上記の変異体にさらなるアミノ酸変異、欠失、他のタンパク質・生体高分子・化学物質などとの融合化、等の修飾を、遺伝子工学的な手法あるいは物理化学的手法により行って得られる物質であることを特徴とする。

【0016】本発明のDermatophagoides属のグループ2アレルギーの変異体またはDer f 2の変異体の製造法とは該変異体を作製し、それらを宿主細胞に導入して変異体を生産する細胞を得、その細胞を培養することによって変異体を生産することを特徴とする。

【0017】本発明の治療薬、予防薬、または検査薬用組成物は、上記の変異体を含有し、アレルギーの治療薬、予防薬、検査薬であることを特徴とする。本組成物をヒトまたは哺乳類に投与する方法としては、注射、点鼻、経口、吸入、塗布、点眼などのいずれでもよい。

【0018】本発明の変異アレルギーをコードする遺伝子DNA、RNA、その誘導体、およびそれらを含有する治療薬とは、遺伝子ワクチン療法(Razら、1996年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、5141-5145頁)に用いられることを特徴とする。本組成物をヒトまたは哺乳類に投与する方法としては、静脈内投与、経口投与、点鼻、吸入、点眼、皮膚への塗布、ジーンガンによる投与などのいずれでもよい。

【0019】ここで配列番号について、以下に説明する。

配列番号1: Der f 2 clone 11の変異体 Cのアミノ酸配列。6個のシステイン残基(8、21、27、73、78、119)が全てセリン残基に置換されている。分子内ジスルフィド結合が全て破壊されている。

配列番号2: Der f 2 clone 11の変異体8C-119Cのアミノ酸配列。4個のシステイン残基(21、27、73、78)が全てセリン残基に置換されている。1組のジスルフィド結合(Cys8-Cys119)だけを保存している。

配列番号3: Der f 2のアミノ酸配列。代表的なものとして結城らのクローニングしたclone 11の配列を示し

た。

配列番号4: Der p 2のアミノ酸配列。代表的なものとしてChuraらがクローニングしたクローンの配列を示した。

【0020】

【発明の実施の形態】1. ヒョウヒダニ(Dermatophagoides属)のグループ2アレルギーの変異体の発現プラスミドの構築

ヒョウヒダニ(Dermatophagoides属)のグループ2アレルギーの変異体の発現プラスミドの構築の主要な操作は野生型グループ2アレルギーの発現ベクター内の野生型グループ2アレルギーに部位特異的変異を導入することである。部位特異的変異はPCR法、市販のキットの使用、既にある変異体遺伝子の制限酵素断片との置換、などにより行うことができる。PCR法と既にある変異体遺伝子の制限酵素断片を利用した、システイン変異体の発現ベクター構築の具体例を実施例1に示す。

【0021】2. ヒョウヒダニ(Dermatophagoides属)のグループ2アレルギーの変異体の発現、精製

20 変異体の大腸菌での発現に用いるベクターは、大腸菌で安定的に存在するプラスミドベクターならば任意であるが、例えばpGEMEX1(Promega社製)を用いるのが便利である。本ベクターは発現プロモーターにT7プロモーターを用いており、その発現量が非常に多く、組換え蛋白は大腸菌中で封入体として蓄積する。封入体を変性剤存在下で可溶化し、再生操作を行った後、種々のカラムクロマトグラフィーにより、高純度の変異体タンパク質を精製することが可能である。具体例を実施例2に示す。

30 【0022】また、変異体はそれぞれの宿主細胞に適切なベクターを用いれば、大腸菌以外の細菌、Saccharomyces cerevisiae、やPichia pastorisなどの酵母、SF9などの昆虫細胞、CHOなどの哺乳動物細胞などにより発現させることもできる。

【0023】3. ヒョウヒダニ(Dermatophagoides属)のグループ2アレルギーの変異体のアレルギー活性の比較

40 変異体のアレルギー活性は、アレルギー患者血清中IgEとの結合能と、アレルギー患者末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離活性で評価した。ウエスタンブロットやRAST-EIA法により変異体とアレルギー患者血清中IgEとの結合能を調べることができる。アレルギー患者末梢血中好塩基球を用いて、変異体のヒスタミン遊離活性を調べることができる。具体例を実施例3、4、5に示す。

【0024】4. ヒョウヒダニ(Dermatophagoides属)のグループ2アレルギーの変異体あるいはそれをコードする遺伝子の投与経路と投与形態

本発明で得られた変異体を投与する場合、静脈内投与、経口投与、点鼻、吸入、点眼、あるいは皮膚への塗布等が行われ、さらに、投与形態としては投与経路により注射剤、内服剤、点鼻剤、吸入剤、点眼剤、塗布液、軟膏

剤、あるいはクリーム剤などのいずれかが選ばれる。さらに、賦形剤としては、これらの剤形に通常用いられる賦形剤の中から選ばれる。本発明で得られた変異体をコードする遺伝子DNA、RNAあるいはその誘導体をリニアな遺伝子あるいはその誘導体、哺乳類細胞内で発現可能なベクターに組み込んだもの、あるいはそれらを適当な担体に結合あるいは包含させたもの、などの形で投与することによる遺伝子ワクチン療法を行う場合もある。その場合、静脈内投与、経口投与、点鼻、吸入、点眼、皮膚への塗布、ジーンガンによる移入等が行われ、さら

【0025】

【実施例】以下、実施例で本発明を説明する。実施例にはDer f2のクローン clone 11 (配列番号3)を用いた変異体の製造例を記載したが、Der f2には多型が知られており、使用できるクローンは clone 11 に限定されない。また、相同性の非常に高い Der p 2についても同様の方法で配列番号4に代表されるクローンをを用いて、変

【0026】実施例1 Der f2の変異体の発現プラスミドの構築

2個所のシステインをセリンに置換した clone 11の変異体C21/27S (Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁)の発現ベクターpFLT11-C21/27SのClaI/HindIII断片と同変異体C73/78S (Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁)の発現ベクターpFLT11-C73/78SのClaI/HindIII断片をライゲイ

ションし、21、27、73、78番目のCys残基がSer残基に置換されたDer f2変異体C21/27/73/78S (8C-119C)の発現ベクターを作製した。これをpFLT11-8Cと命名した。

【0027】pFLT11-C21/27SのClaI/HindIII断片、pFLT11-C73/78SのClaI/HindIII断片、そしてC8/119S (Takaiら、1997年、Nature Biotechnology、15巻、754-758頁) pFLT11-C8/119SのHincII/HindIII断片をライゲイションし、21、27、73、78、119番目のCys残基がSer残基に置換されたDer f2変異体C21/27/73/78/119S (8C) (図1)の発現ベクターを作製した。これをpFLT11-8Cと命名した。

【0028】NdeIサイト、開始コドンを含み、8番目のアミノ酸残基に対応するコドンがSer残基のコドンに変異させてあるプライマーと、Der f2のC末端領域に対応し、HindIIIサイトを含むプライマーとによって、pFLT11-8Cを鋳型としてPCRを行い、全てのCys残基のコドンがSer残基のコドンに変更された変異体の遺伝子断片を取得した。これをNdeI、HindIIIで消化し、pGEMEX-I-DNdeIのNdeI/HindIII断片とライゲイションし、全てのCys残基をSer残基に置換した変異体 (C) (図1)の発現ベ

クターを作製した。これをpFLT11-Cと命名した。

【0029】実施例2 Der f2の変異体の発現、精製大腸菌BL21(DE3)株のコンピテントセル (Stratagene社)を各変異体の発現ベクターで形質転換した。50µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地のに形質転換株を展開し、30℃一晩培養した。生じた新鮮なコロニーを50µg/mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌し、30℃一晩振とう培養した。この培養液を50-100倍の容積の50µg/mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌し、坂口フラスコで30℃で激しく振とう培養した。波長600nmでの吸光度が0.4-0.6に達したら、IPTGを最終濃度が0.4mMになるように添加して発現誘導を開始した。30℃で4時間振とう培養した。顕微鏡で封入体の形成を確認した後、遠心により菌体を回収した。野生型Der f2及びその変異体はいずれも封入体として菌体内に蓄積した。還元下のSDS-PAGEにより、著量に発現していることを確認した。菌体をミリQ水で洗浄後、凍結融解した。菌体に100mM TrisCl、10mM EDTA (pH7.4)を添加懸濁し、超音波破碎を行った。遠心して封入体を回収した。さらに洗浄を行った後、遠心して封入体を回収した。

【0030】封入体を8M尿素、20mM TrisCl (pH8.5)に懸濁溶解した。封入体可溶化液を20mM TrisCl (pH8.5)に希釈することによりリフォールディングを行った。リフォールディング中に生じた不溶化画分を遠心、0.45ミクロンのフィルターを通すことにより除去した。次いで陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより変異アレルゲンの精製を行った。これにはFPLCシステム (Pharmacia社)を利用し、陰イオン交換体としてQ-sepharoseおよびDEAE-sepharoseを用いた。溶出画分をSDS-PAGEに供し、分子量約14,000から16,000付近に単一バンドが確認された画分を精製標品とした (図2)。

【0031】実施例3 ウエスタンブロッティングによるDer f2の変異体のIgE結合能の比較
2-メルカプトエタノール存在下で可溶化した菌体をSDS-PAGE (18%)に供した後、ニトロセルロース膜にブロッティングした。患者血清中IgEとの反応の検出ではブロッティング、洗浄、化学発光反応にBM Chemiluminescence Biotting Substrate (Boehringer Mannheim)を用いた。ニトロセルロース膜を1/50倍に希釈した患者血清と反応させ、1/1000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体 (Biosource)で膜上のIgEを検出した。

【0032】6名の患者血清を用いてウエスタンブロッティングによりIgE反応性を比較した (図3)。Cys変異体については全ての患者血清で同じ傾向がみられた：C、8C、8C-119CはC8/119Sとともに顕著な低反応性を示した。

【0033】実施例4 RAST-EIA法によるDer f2の変異体のIgE結合能の比較
臭化シアン活性化濾紙と0.1Mホウ酸緩衝液 (pH8.5)に希釈した抗原溶液 (濾紙1枚当たり50µl、Cys変異体のIg

E結合実験では600ng/ml、それ以外では100ng/ml)を室温で一晩反応させ、抗原を濾紙へ固定化した。液を除去後、濾紙を0.1MNaHCO₃溶液(濾紙1枚当たり500μl)で1回洗浄し、1Mアミノメタノール(pH9.0)(濾紙1枚当たり250μl)を加え、室温で3時間静置し、濾紙上の未反応の活性部位をブロッキングした。インキュベーション・バッファ(50mMリン酸バッファ, 0.9% NaCl, 0.1% Tween20, 0.3% BSA, 0.05% NaN₃, PH7.4)で2-8倍希釈したヒト血清(濾紙1枚当たり50μl)と37で3時間反応させた。血清溶液を除去後、1%Tween20を含有するPBS(濾紙1枚当たり2.5ml)を加え室温で10分間静置した後、液を除去した。この洗浄操作を合計3回行った。インキュベーション・バッファで1/2倍に希釈したRAST-FEIAキットに添付のβ-ガラクトシダーゼ溶液(濾紙1枚当たり50μl)と室温で一晩反応させた。1%Tween20を含有するPBSによる洗浄操作を合計3回行った。1mM MgCl₂を含有するPBSで1/2倍に希釈したRAST-FEIAキットに添付の基質溶液(濾紙1枚当たり200μl)と遮光下、37で振とうし酵素反応を行った。20-60分間反応後にRAST-FEIAキットに添付の反応停止液を添加混合(濾紙1枚当たり250μl)した後、400ulを蛍光測定用プレートのウェルに移し、励起波長355nm、測定波長460nmでの蛍光強度を測定した(ICN, Titertek Fluoroskan)。抗原を固定化していない濾紙と血清溶液をインキュベートした場合の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いた値をデータとした。

【0034】18名の患者血清を用いてCys変異体のRAST-EIAを行った(図4)。全ての患者についてCys変異体のうちでCで最も活性が低下しており、8C-119Cがこれに次いでいた。Cと8C-119Cはこれまでで最も低反応性であったC8/119も大幅に下回る活性であることが確認できた。

【0035】実施例5 Der f 2の、アレルギー患者末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性の比較0.5mlの100mM EDTAで内壁を処理した20mlのシリンジに、アレルギー患者より20mlの血液を採取した。生理食塩水に硫酸デキストラン(Sigma社)を溶解して調製した4.5%硫酸デキストラン溶液5mlを、採血に用いたシリ

*ンジに吸い込み、おだやかに混和した。シリンジをたてて室温で30-60分間静置した。50ml遠心管に白血球を含む上層を回収した。30mlの氷冷したカルシウム及びマグネシウムイオンを含まないタイロッドバッファ(36.9g/L NaCl, 1.50g/L KCl, 436mg/L KH₂PO₄, 5g/L glucose, 0.03% HSA, 1mM CaCl₂, 0.6mM MgCl₂)を加えおだやかに混和し、4 1200rpm5-10分間遠心し、細胞を回収した。細胞を10mlの氷冷したカルシウム及びマグネシウムを含まないタイロッドバッファに懸濁し、遠心し洗浄した。細胞をタイロッドバッファに懸濁し、37 温浴で5分間インキュベートした。この細胞懸濁液をおだやかに混和した後、タイロッドバッファに希釈した抗原溶液(50μl/vial)に200μlづつ添加、混合した。37 温浴で40分間インキュベートし、ヒスタミン遊離反応を行った。反応終了後、氷浴上におき、反応停止させた後、4 1500rpmで3分間遠心し、200μlの上清を回収して96穴プレートに移した。さらに4 2000rpmで3分間遠心し、残存した細胞や沈殿物を除去した上清を回収した。この上清中のヒスタミン濃度を測定キット(ICN, Histamine-ELISA)を用いて測定した。細胞懸濁液を0.1%Triton X 100を含むタイロッドバッファで可溶化し、遠心後の上清中のヒスタミン濃度に対する割合をヒスタミン遊離率とした(図5、図6)。

【0036】図5、図6中のそれぞれのカーブを比較するとシステイン変異体はいずれもヒスタミン遊離活性が低下しており、Cと8C-119Cで最も活性が低下しており(野生型Der f 2の1/1000程度)、C8/119S(1/100程度)、C73/78S(1/10程度)、C21/27S(1/10程度)よりも活性低下の程度が大きかった。

【0037】

【発明の効果】本発明により、野生型グループ2ダニアレルゲンに比べて、大幅にアレルゲン活性、IgE結合能が低減されたグループ2ダニアレルゲン変異体が提供された。ダニアレルゲンの治療、予防診断に本発明の変異体を利用できる。

【0038】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Breweries, LTD
 <120> Engineered house dust mite allergens (cysteine mutants) and methods for their preparation
 <130>
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Der f 2 mutant, substitution of 8th, 21th, 27th, 73th, 78th and 1

9th cysteines to serines

<400> 1

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn

Asn Glu Ile Lys Lys Val

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Ser His Gly Ser Asp Pro

Ser Ile Ile His Arg Gly

 20 25 30

Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp

Ala Asn Gln Asn Thr Lys

 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu

Asp Gly Leu Glu Ile Asp

 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Ser His

Phe Met Lys Ser Pro Leu

65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ala Lys Tyr

Thr Trp Asn Val Pro Lys

 85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val

Thr Val Lys Leu Val Gly

 100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Ser Ala Ile Ala

Thr His Ala Lys Ile Arg

 115 120 125

Asp

129

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Der f 2 mutant, substituti

on of 21th, 27th, 73th and 78th cystein

e

s to serines

<400> 2

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn

Asn Glu Ile Lys Lys Val

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Ser His Gly Ser Asp Pro

Ser Ile Ile His Arg Gly

 20 25 30

Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp

Ala Asn Gln Asn Thr Lys

 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu

Asp Gly Leu Glu Ile Asp

 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Ser His

Phe Met Lys Ser Pro Leu

<300>

<301> Yuuki, T., Okumura, Y., Ando, T., Yamakawa, H., Suko, M., Haida, M

., and Okudaira, H.

<302> Cloning and sequencing of cDNAs corresponding to mite major allergen Der f II.

<303> Japanese Journal of Allergology

<304> 39

<306> 557-561

<307> 1990

<400> 3

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn
Asn Glu Ile Lys Lys Val

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Cys His Gly Ser Asp Pro
Cys Ile Ile His Arg Gly

20 25 30

Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp
Ala Asn Gln Asn Thr Lys

35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu
Asp Gly Leu Glu Ile Asp

50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His
Phe Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ala Lys Tyr
Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val
Thr Val Lys Leu Val Gly

100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala
Thr His Ala Lys Ile Arg

115 120 125

Asp

129

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

<213> House dust mite (Dermatophagoides pteronyssinus)

<300>

<301> Chua, K.Y., Doyle, C. R., Simpson R. J., Turner, K. J., Stewart, G

. A., and Thomas, W. R.

<302> Isolation of cDNA coding f

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His
 Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

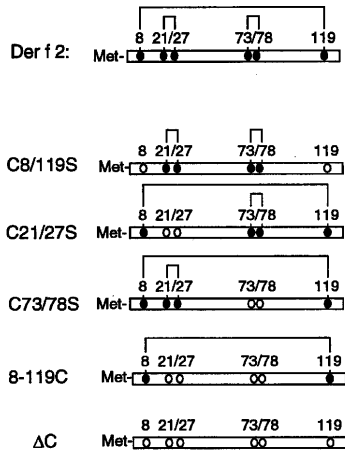
Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr
 Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val
 Thr Val Lys Val Met Gly
 110 115 120

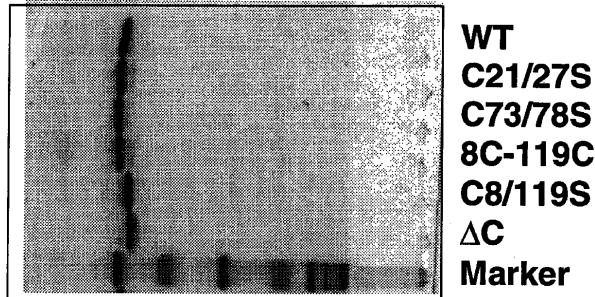
【図面の簡単な説明】
 【図1】実施例1において、野生型Der f 2タンパク質の概念図である。
 【図2】実施例2において、精製された野生型及び変異型Der f 2の精製度をSDS-PAGE法により確認した結果を示す説明図である。
 【図3】実施例3において、野生型Der f 2及びシステイン変異体のヒトIgE結合能をウエスタン・ブロッティング法により比較した結果を示す説明図である。

【図4】実施例4において、野生型Der f 2及びシステイン変異体のヒトIgE結合能をRAST-EIA法により比較した結果を示す説明図である。
 【図5】実施例5において、野生型Der f 2及びシステイン変異体のヒト末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性を比較した結果を示す説明図である。
 【図6】同様に実施例5において、野生型Der f 2及びシステイン変異体のヒト末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性を比較した結果を示す説明図である。

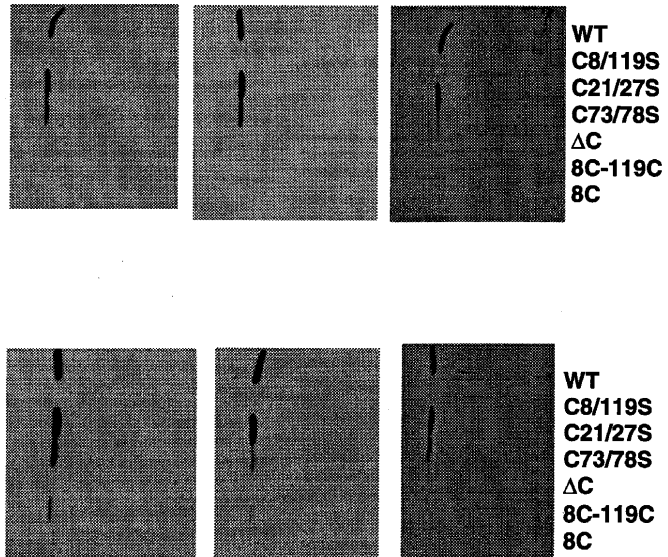
【図1】



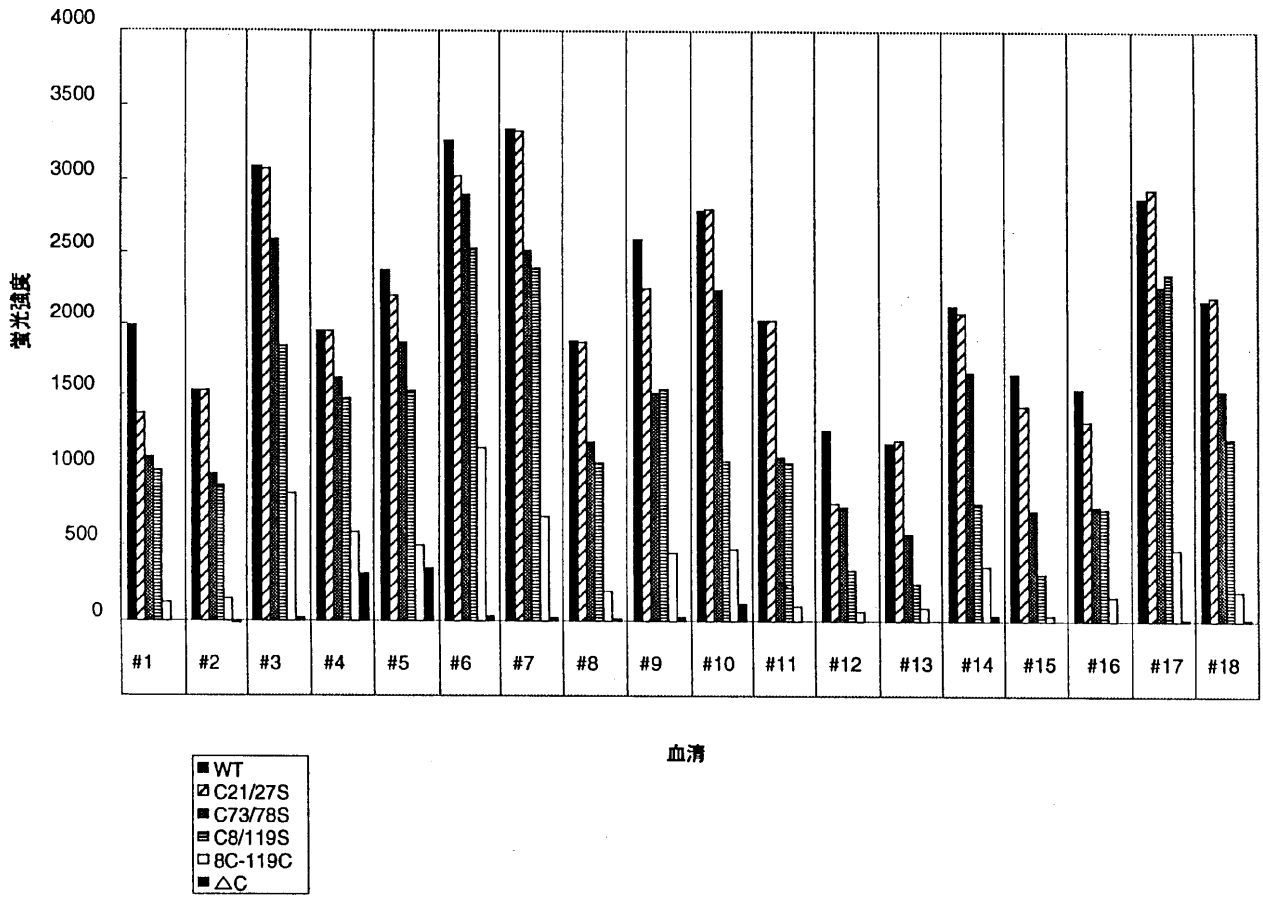
【図2】



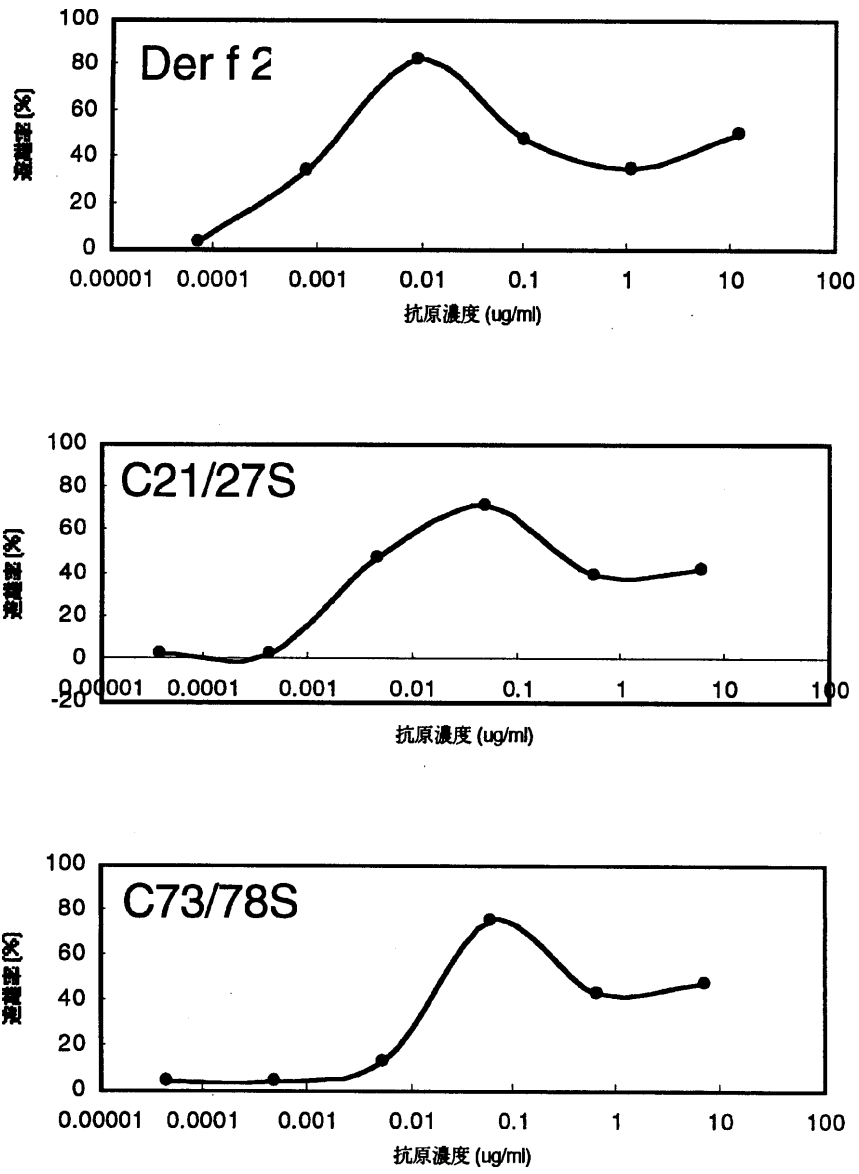
【図3】



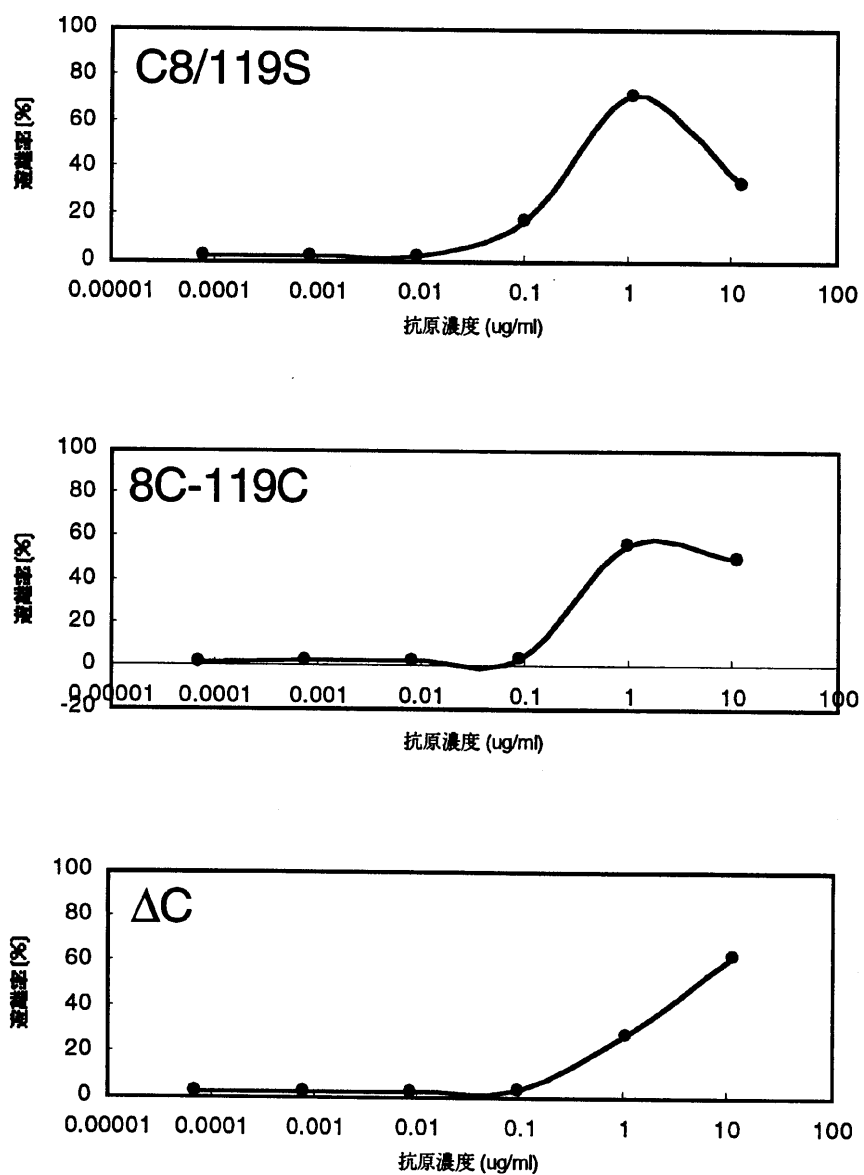
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

// A 6 1 K 39/395

識別記号

F I

A 6 1 K 39/395

C 1 2 N 15/00

テ-マコード (参考)

D

N

Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 DA06
EA04 GA11 HA01 HA15
4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01
DA13
4C085 AA06 BA99 CC05 CC32 DD62
EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA50 DA86 EA22 EA50 FA74
GA01 GA15 GA23 HA05

专利名称(译)	改良螨过敏原 (半胱氨酸突变体) 及其制备方法		
公开(公告)号	JP2001231563A	公开(公告)日	2001-08-28
申请号	JP2000040930	申请日	2000-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	朝日啤酒株式会社		
申请(专利权)人(译)	朝日啤酒有限公司		
[标]发明人	高井敏朗 横田豊一		
发明人	高井 敏朗 横田 豊一		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/35 A61K39/395 C07K16/18 C12P21/02 G01N33/53		
FI分类号	A61K39/35 C07K16/18 C12P21/02.C G01N33/53.Q G01N33/53.D A61K39/395.D A61K39/395.N C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA06 4C085/BA99 4C085/CC05 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA50 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA23 4H045/HA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种突变过敏原，其中已经将变异引入了 Dermatophagoides (Dermatophagoides属) 的第2组过敏原，例如预期用于过敏原特异性免疫疗法，和编码它们的基因。 解决方案：第2组尘螨属过敏原的两组 (第21-27组和第73-78组) 或第3组 (第8-119组，第21-27位和第2组) 通过破坏位置73-78处的SS键降低过敏原活性的突变体。它们的生产方法。编码它们的基因。

