

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5597336号
(P5597336)

(45) 発行日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(24) 登録日 平成26年8月15日(2014.8.15)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 0 7 K 1 4 / 4 3 5	(2006. 01)	C O 7 K 1 4 / 4 3 5
A 6 1 K 3 9 / 0 0	(2006. 01)	A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 3 5	(2006. 01)	A 6 1 K 3 9 / 3 5
A 6 1 P 3 7 / 0 8	(2006. 01)	A 6 1 P 3 7 / 0 8
C 1 2 N 1 5 / 0 9	(2006. 01)	C 1 2 N 1 5 / 0 9
		A
		請求項の数 17 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-541021 (P2001-541021)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月27日(2000.11.27)
 (65) 公表番号 特表2004-525601 (P2004-525601A)
 (43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2000/011776
 (87) 国際公開番号 W02001/040266
 (87) 国際公開日 平成13年6月7日(2001.6.7)
 審査請求日 平成19年11月27日(2007.11.27)
 審判番号 不服2011-21129 (P2011-21129/J1)
 審判請求日 平成23年9月30日(2011.9.30)
 (31) 優先権主張番号 199 57 904.0
 (32) 優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 591032596
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミット
 ベシュレンクテル ハフツング
 Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter Haftung
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
 ルムシュタット フランクフルター シュ
 トラーセ 250
 Frankfurter Str. 25
 O, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic of Germany
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g E 反応性の低減した昆虫毒アレルゲンおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可溶性スズメバチ毒アレルゲン抗原 5 であって、
 該抗原は、封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、
 該封入体は、還元剤を加えることなく変性し、および
 該変性により得られた変性体を、還元剤を含まない酸性緩衝液を用いて透析する、
 ことにより細菌中で組換えにより調製されることを特徴とする、天然アレルゲンと比較して I g E 反応性の低減した、スズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 2】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項 1 に記載の可溶性スズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 3】

前記透析が pH 3 . 5 から 6 . 5 の間の緩衝液で行われる、請求項 1 または 2 に記載のスズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 4】

前記スズメバチ毒アレルゲン抗原 5 が、Vespu l a 種または Paravespu l a 種から製造される、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のスズメバチ毒アレルゲン抗原 5。

【請求項 5】

前記スズメバチ毒アレルゲン抗原 5 が、Vespu l a vulgari s または Ve

10

20

*s p u l a g e r m a n i c a*から製造される、請求項1から4のいずれかに記載のスズメバチ毒アレルギー抗原5。

【請求項6】

請求項1から5のいずれかに記載のスズメバチ毒アレルギー抗原5、対応するアジュバント、および賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項7】

I g E 反応性の低減した可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原5の調製方法であって、該抗原は、封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、該封入体は、還元剤を加えることなく変性し、および該変性体を、還元剤を含まない酸性緩衝液を用いて透析する、
ことを含む調製方法。

10

【請求項8】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記透析がpH3.5から6.5の間の緩衝液で行われる、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

前記可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原5を蒸留水に対して更なる透析を行うことを含む、請求項7から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記スズメバチ毒アレルギー抗原5が、*V e s p u l a*種または*P a r a v e s p u l a*種から製造される、請求項7から10のいずれかに記載の方法。

20

【請求項12】

前記スズメバチ毒アレルギー抗原5が、*V e s p u l a v u l g a r i s*または*V e s p u l a g e r m a n i c a*から製造される、請求項7から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

天然アレルギーに匹敵するI g E 反応性可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原5の調製方法であって、

該抗原は、封入体として不溶の形で細菌細胞中で発現し、
該封入体は、還元剤を加えることなく変性し、および
該変性体を、システイン含有溶液を用いて透析する、
ことを含む調製方法。

30

【請求項14】

前記変性が塩化グアニジニウムを用いて行われる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記可溶性スズメバチ毒アレルギー抗原5を蒸留水に対して更なる透析を行うことを含む、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記スズメバチ毒アレルギー抗原5が、*V e s p u l a*種または*P a r a v e s p u l a*種から調製される、請求項13から15のいずれかに記載の方法。

40

【請求項17】

前記スズメバチ毒アレルギー抗原5が、*V e s p u l a v u l g a r i s*または*V e s p u l a g e r m a n i c a*から調製される、請求項13から16のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、製造方法の効率に応じて天然と同一または天然と反対の折りたたみ構造（コンフォメーション）による分化が可能な組換え昆虫毒アレルギーおよびこれをターゲットとするその製造方法に関する。

50

【0002】

アレルギー患者、特に昆虫毒アレルギー患者の単一アレルゲン分化診断法(インビトロ(in vitro)またはインビボ(in vivo))では、天然分子に対応する折りたたみ形が用いられる。

【0003】

天然と反対の折りたたみ形は特定の免疫的治療のために副作用の少ない薬剤として用いることができる。したがってこれらの組換え折りたたみ変異体によれば天然品よりも安全な治療が行える。本発明の方法は生物工学的な製造が医薬品に必要な条件(GMP)下に行えるように設計されている。

【0004】

昆虫刺毒アレルギーは主としてスズメバチやミツバチによって引き起こされ、重大な全身症状あるいは場合によっては致命的なアナフィラキシーをもたらすこともある(Muller, U. R.: Insect stinging allergy, Gustav Fischer Verlag; 1990)。タイプ1のアレルギーを誘発する物質は、昆虫毒のタンパク質、糖タンパク質またはポリペプチドである。これらのアレルゲンは注入後、感作された人間においてマスト細胞表面に結合したIgE分子と反応する。このタイプのFcRI結合IgE分子がアレルゲンによって互いに架橋すると、結果としてエフェクター細胞の働きによりメディエーター(例えば、ヒスタミン、ロイコトリエン)やサイトカインが放出されこれらに対応した臨床症状が発生する。

【0005】

ペプチドであるメリチンに加え酵素のヒアルロニダーゼおよびホスホリパーゼA2がミツバチ毒のアレルゲン性成分として働く(Habermann, E., 1972, Science 177, 314-322)。スズメバチの場合も同様に、主要な酵素的に活性なアレルゲンはハチ毒におけるものと類似したヒアルロニダーゼ(Hoffmann, D. R., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 337-343)およびホスホリパーゼA1である。スズメバチ毒の最も重要な主要アレルゲンは抗原5であり、これは現在までのところ酵素活性は検出されていない(King他、1978, Biochemistry 17, 5165-5174)。これらのアレルゲンはすべて分子生物学的に同定されており、対応するcDNA分子はクローン化されている(特に、Fang他、1988, PNAS, 895-899; Soldatova他、1993, FEBS, 145-149; Kuchler他、1989, Eur. J. Biochem. 184, 249-254)。cDNA配列を利用するとアレルギーの診断および治療に用い得る組換えアレルゲンを製造することが可能である(ScheinerおよびKraft, 1995, Allergy 50, 384-391)。

【0006】

本発明との関係では主要なアレルゲンである抗原5が特に重要である。なぜなら本発明はこの分子を例として用いているからである。これは約25kDaの大きさの非グリコシル化タンパク質である。一次配列は8つのシステイン残基を含むが、これは4個のジスルフィド架橋部があることを示すもめである(Hoffman, D. R., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 707-716)。昆虫毒アレルギーを効果的に治療するための古典的アプローチは特定の免疫療法すなわち減感作療法(hyposensitisation)である(Muller, U. R.: Insect stinging allergy, Gustav Fischer Verlag; 1990)。この方法では投与量を増大させつつ天然アレルゲン抽出物を患者に皮下注射する。しかしながら、この方法はアレルギー反応、場合によってはアナフィラキシーショックを起こすリスクを伴う。昆虫刺毒の減感作療法は特に強い反応が予想され得るため、治療は現在入院治療に限って行われる。

【0007】

組換え法により製造されたアレルゲンをを用いた治療の最適化は特に昆虫刺毒アレルギーの場合に可能でありうる。組換え法により製造された高純度アレルゲンの、場合によって

10

20

30

40

50

は患者の個人感作パターンに適合する、決められた多剤混合物 (Scheiner および Kraft、1995) を天然アレルゲン起源の抽出物に代えて用い得る。治療に不可欠な T 細胞エピトープを損なうことなく IgE エピトープを削除した慎重に変異された組換えアレルゲン (Schramm 他、1999、J. Immunol. 162、2406 - 2414) によって、このタイプの組換えアレルゲンをを用いたより安全な減感作療法をもたらし得る現実的な展望が得られる。

【0008】

大腸菌 (E. coli) 中の異種発現から、ほとんどの真核生物タンパク質は「天然の」コンフォメーションを取らず、取ったとしてもわずかであることが知られている。この不正確な折りたたみの結果、これらのタンパク質は多くの場合不溶性である。これは特にシステイン含有タンパク質において観察されている (Kuchler 他、1989、Eur. J. Biochem. 184、249 - 254)。特に抗原 5 は細菌中での発現において天然のコンフォメーションをとらない不溶性凝集体を生じることが報告されている (Monsalve 他、1999、Protein Express Purif. 16 (3) : 410 - 416)。このタイプの不溶性凝集体は診断や治療には用いることができない。

10

【0009】

大腸菌 (E. coli) に不溶のタンパク質は研究目的では真核生物の発現システム (例えば酵母または昆虫細胞) でしばしば製造されている (Monsalve 他、1999、Protein Express Purif. 16 (3) : 410 - 416; Soldatova 他、1998、J. Allergy Clin Immunol 101 : 691 - 698)。しかし、真核生物発現システムの不利な点は、特にハイパーグリコシル化が起こり得る点 (Grobe 他、1999、Eur. J. Biochem 263 : 33 - 40)、タンパク質分解プロセスおよび収量が比較的少ない点 (Glover および Hames (編集)、1995、Expression Systems、IRL Press、Oxford - New York - Tokyo) である。したがってこのタイプのタンパク質は、通常、医薬的な診断および治療という意味ではアレルギー学的用法に適さない。

20

【0010】

本発明の方法による天然のコンフォメーションを有する生成物は、アレルギー疾患、特に昆虫刺毒のインビトロまたはインビボでの診断に有利に用いることができる。この天然と同一の折りたたみ形は確立された方法により IgE 抗体の検出に利用できる。

30

【0011】

一方、本発明により得られ、実質的に IgE 反応性コンフォメーションを有さずまたは部分的にしか有しないものとして区別される変種は、特定の免疫療法製剤の低アレルギー性成分として用いることができる。これまでのおよび以下の記述において、「低アレルギー性」という用語は、本発明に従い、IgE 反応性が低減したことによりアレルギー性が (天然アレルゲンと比較して) 好ましくは 5 ~ 95%、より好ましくは 20 ~ 85% 低減したまたはなくなっているという意味である。

【0012】

本発明は組換えアレルゲンがバクテリア (大腸菌) 中で製造できる方法である。第 1 の精製ステップは不溶性凝集タンパク質を相当に富化することによって行う。次いでこれらの不溶性凝集物を還元剤の添加なしに変性する。これに続く透析条件に応じて異なる折りたたみ形が得られる。これらの分子はモノマーで可溶性であることが重要である。第 1 の可溶性折りたたみ変種は天然アレルゲンに匹敵する IgE 反応性を有し、したがって診断目的に用いることができる。このタイプの生成物はシステイン含有溶液を用いた透析により得られる。

40

【0013】

他方の可溶性折りたたみ変異体は天然のアレルゲンとは構造が異なっており、IgE 反応性が低いまたはないという点で区別される。この理由でこのタイプの変種はより容易に

50

実施できるように改良された免疫療法に適している。このタイプの低アレルギー性生成物は、本発明に従い、酸性緩衝液により好ましくはpH 3.5 ~ 6.5、より好ましくはpH 4.0から5.5の範囲での透析で得ることができる。

【0014】

このように、本発明はIgE反応性またはアレルギー性が低減されたことを特徴とする組換え昆虫アレルギーに関する。本発明によればこれらのタンパク質のアレルギー性は天然のアレルギーと比較して95%まで低減される。

【0015】

特に本発明は、対応する組換えスズメバチ昆虫アレルギー、特に*Vesputa vulgaris*および*Vesputa germanica*に由来するものに関する。

10

【0016】

本発明はさらに、細菌細胞中でアレルギータンパク質を封入体として不溶なかたちで製造し、前記不溶凝集物を変性し、この変性生成物を透析によって別の折りたたみコンフォメーションを有する可溶性単量体アレルギー変換して単離することを特徴とする実質的に純粋な組換え昆虫毒アレルギーを単離する方法に関する。この変性は好ましくは還元剤を添加せずに塩化グアニジニウムを用いて行われる。

【0017】

本発明は特に、前記の透析を緩衝液、好ましくは酸性緩衝液pH 4.5 ~ 5.0の酢酸ナトリウム緩衝液を用いて行うアレルギーまたはIgE反応性が低減された組換え昆虫毒アレルギーの単離方法に関する。

20

【0018】

しかしながら、本発明はまた前記の透析をシステイン含有溶液を用いて行う、通常のアレルギーまたはIgE反応性を有する組換え昆虫毒アレルギーの単離方法にも関係する。

【0019】

本発明はまた上述のおよび下記の対応する方法によって得られる組換えスズメバチ毒アレルギーに関する。

【0020】

本発明はさらにIgE反応性が低減されたまたは消失した対応する組換えアレルギーおよび対応するアジュバントおよび賦形剤を含む医薬調剤に関する。

30

【0021】

最後に、本発明は上述のまたは下記の対応する方法によって得られる昆虫毒アレルギーのインビボおよびインビトロでの昆虫刺毒アレルギー診断のための使用に関する。

【0022】

本発明の方法を以下さらに詳細に説明する。

【0023】

実施例として*Vesputa vulgaris*に由来するスズメバチ毒アレルギー抗原5 (*Ves v 5*) および*Vesputa germanica*に由来する抗原5 (*Ves g 5*) を発現ベクターpSE420にクローン化し、K12細菌株M15pREP4内に形質転換した。この方法のフローチャートを図1に示す。

40

【0024】

発現培養物の接種のために株の前培養を用いて組換えアレルギーを製造する。発現はIPTGによって誘導され、シカンフラスコ中LB培地において37℃、酸素供給制限条件(90rpm/分)で行う。5時間発現させた後、細菌を遠心分離(5000xg、10分、20℃)で回収する。細胞をリゾチーム添加(10μg/g、湿潤重量)により緩衝液(50mM Tris/HCl、25%(w/v)シヨ糖、pH8.0)に細胞を再分散させた後、細菌の消化を行う。続いて界面活性剤溶液(0.2M NaCl, 1%(w/v)DOC, 1%(w/v)Nonidet P40)を等量添加する。次いでこの界面活性剤溶液を超音波(氷上3分間、130ワット、0.5秒パルス)で処理する。発現生成物は主として不溶性凝集物(封入体)のかたちで存在するため、これらが高密度であ

50

ることから、遠心分離 (3000 × g) により残りの部分 (細胞壁断片、リボゾームなど) の大部分から分離することができる。界面活性剤を含む溶液 (1% Triton X-100) による洗浄を3回連続することによりさらなる精製を行う。次いで、精製された封入体を変性緩衝液 (6 M 塩化グアニジニウム、20 mM tris / HCl、pH 8.0) の添加および室温で2時間振盪することにより消化する。

【0025】

IgE 反応性折りたたみ形を得るためには、変性バッチを透析チューブ (消化限界 12 ~ 14 kDa) に導入し、室温で攪拌しながら12時間、システイン溶液 (5 mM システイン) の100倍量に対して透析する。その後システインを除くためにこれを蒸留水に対して透析する。

10

【0026】

IgE 反応性が低減されたコンフォメーションを得るためには最初の透析を20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して行う。ここでも蒸留水に対してさらなる透析を行う。除去後水溶性アレルゲンを遠心分離により沈殿凝集物から分離する。上清は所望の可溶性組換えアレルゲンを含む。酢酸ナトリウム緩衝液の代わりに3.5 ~ 6.5、好ましくは4.0 ~ 5.5の緩衝能を有する他の酸性緩衝液を用いることも可能である。このタイプの緩衝系の例は文献に適宜記載されている。

【0027】

いずれの方法でも沈殿した組換えアレルゲン生成物は同様なスキームに従ってさらに変性、処理することができる。これにより収量が顕著に増加する。

20

【0028】

透析ステップ後生成物の純度は95%である。塩基性昆虫毒アレルゲンのさらなる精製ステップは、例えば、Source S (ドイツ国フライブルク所在のファルマシア (Pharmacia)) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィおよびゲルろ過により行う。ゲルろ過は高分子量および低分子量の微量の不純物除去に加えて脱塩にも有効である。

【0029】

生成物の品質管理は以下の特徴に基づいて行う。これは抗原5に対して表にまとめてある。表中n抗原は天然抗原の意味である。

【0030】

30

【表1】

性質	天然 IgE 反応性を有する折りたたみ体	IgE 反応性が低減された折りたたみ体
SDS-PAGE (非還元条件) における装置分子量	25 kDa	26~27 kDa
Source S 中の溶離のための塩濃度	320 mM NaCl	400 mM NaCl
プロテアーゼ V8 による開裂	15 kDa 断片 + ペプチド	ペプチド < 10 kDa
抗原 5 特異的モノクローナル抗体	8E3、1E11 による検出	8E3 によってのみ検出可能
アレルギー患者から得た血清による IgE 反応頻度	> 95%	< 10%
アレルゲン性反応効力	n 抗原 5 に類似	>10 × n 抗原 5 未満

40

【0031】

本発明による方法はすべての種類の昆虫毒アレルゲンに適している。用いた精製技術および組換えクローンおよびクローン発現技術は当業者に公知であり利用可能なものであって、さらに同様の公知の方法で置き換えることができる。

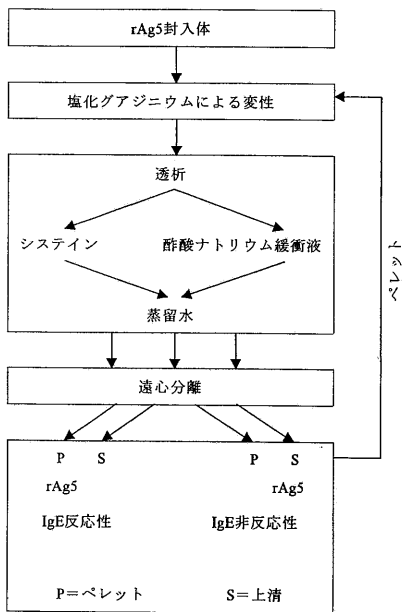
50

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例の方法のフローチャートである。

【図1】

方法のフローチャート
rAg5 = 組換え抗原5



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(74)復代理人 100129735

弁理士 太田 顕学

(74)代理人 100127454

弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 サック、 ローラント

ドイツ連邦共和国 2 2 3 0 3 ハンブルク ミューレンカンブ 1 9

(72)発明者 クロムヴェル、 オリヴァー

ドイツ連邦共和国 2 1 4 6 5 ヴェントルフ ロエンスハーエ 2

(72)発明者 フィービク、 ヘルマット

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

合議体

審判長 今村 玲英子

審判官 富永 みどり

審判官 三原 健治

(56)参考文献 J. Immunol., 1995年, 154, 577-84

Protein Expr. Purif., 1999年 8月, 16(3), 410-6

J. Allergy Clin. immunol., 1998年, 101, 691-8

J. Immunol, 1993, Vol. 150, p. 2823-2830

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

CPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	具有降低的IgE反应性的昆虫毒液过敏原及其制备方法		
公开(公告)号	JP5597336B2	公开(公告)日	2014-10-01
申请号	JP2001541021	申请日	2000-11-27
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	サックローラント クロムヴェルオリヴァー フィービクヘルマツト		
发明人	サック、ローラント クロムヴェル、オリヴァー フィービク、ヘルマツト		
IPC分类号	C07K14/435 A61K39/00 A61K39/35 A61P37/08 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 C07K14/00 C12P21/00		
CPC分类号	C07K14/43568 A61K39/00 C07K14/43563		
FI分类号	C07K14/435 A61K39/00.D A61K39/35 A61P37/08 C12N15/00.A C12P21/02.C		
代理人(译)	宮崎昭雄 大田Arawagaku 绪方明		
助理审查员(译)	三原贤治		
优先权	19957904 1999-12-01 DE		
其他公开文献	JP2004525601A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种重组昆虫毒液过敏原及其具体制备方法。过敏原可以根据它们是否使用与天然存在的相同折叠（构象）或使用不同折叠制造而变化。非天然存在的折叠蛋白质的IgE反应性或变应原性降低，因此可用作过敏性免疫疗法中的治疗剂。

性質	天然 IgE 反応性を有する折りたたみ体	IgE 反応性が低減された折りたたみ体
SDS-PAGE（非還元条件）における装置分子量	25 kDa	26~27 kDa
Source S 中の溶離のための塩濃度	320 mM NaCl	400 mM NaCl
プロテアーゼ V8 による開裂	15 kDa 断片+ペプチド	ペプチド<10 kDa
抗原 5 特異的モノクローナル抗体	8E3、1E11 による検出	8E3 によってのみ検出可能
アレルギー患者から得た血清による IgE 反応頻度	>95%	<10%
アレルギー性反応効力	n 抗原 5 に類似	>10 x n 抗原 5 未満