

(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2013-528364

(P2013-528364A)

(43) 公表日 平成25年7月11日(2013.7.11)

(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 2 4
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 Z N A C	4 B 0 6 4
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	4 C 0 8 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Q	4 H 0 4 5
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-506115 (P2013-506115)	(71) 出願人	506329801 ファディア・アクチボラグ
(86) (22) 出願日	平成23年4月26日 (2011.4.26)		スウェーデン国 7 5 1 3 7 ウプサラ
(85) 翻訳文提出日	平成24年12月18日 (2012.12.18)		, ボックス 6 4 6 0
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/050503	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W02011/133105		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	1050406-6		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成22年4月23日 (2010.4.23)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		弁理士 富田 博行
		(74) 代理人	100092967
			弁理士 星野 修
		(74) 代理人	100135415
			弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規のアレルゲン

(57) 【要約】

非還元条件下で 1 5 k D a の分子量を有するセクレトグロビンであり、一緒に連結した約 5 k D a の分子量を有する第一のペプチド鎖と約 1 0 k D a の分子量を有する第二のペプチド鎖とを含む単離されたウマアレルゲン、ならびに該ウマアレルゲンと共通の抗体に対するエピトープを有するそれらの変異体およびフラグメントを開示する。さらに診断および治療におけるアレルゲンの使用、加えて該アレルゲンを含む診断キットおよび医薬組成物も開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非還元条件下で 15 kDa の分子量を有するセクレトグロビンであり、一緒に連結した 5 kDa の分子量を有する第一のペプチド鎖と 10 kDa の分子量を有する第二のペプチド鎖とを含む単離されたウマアレルゲン、ならびに抗体に対する該ウマアレルゲンと共通のエピトープを有するそれらの変異体およびフラグメント。

【請求項 2】

ウマから精製された、または、組換え生産された、請求項 1 に記載のウマアレルゲン。

【請求項 3】

第一のペプチド鎖が、N 末端アミノ酸配列 A T C P A V A T D I A S F F L L P D S L (配列番号 1) を含む、請求項 1 または 2 に記載のウマアレルゲン、ならびに、抗体に対するエピトープが該ウマアレルゲンと共通であるそれらの変異体およびフラグメント。

10

【請求項 4】

第二のペプチド鎖が、N 末端アミノ酸配列 G S G C Q L L E D V V E K T I T A E L S (配列番号 2) を含む、請求項 1 ~ 3 請求項のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、ならびに、抗体に対するエピトープが該ウマアレルゲンと共通であるそれらの変異体およびフラグメント。

【請求項 5】

第一のペプチド鎖が、アミノ酸配列 Q C I N E I S A G D R Y I I T E T L G K (配列番号 3) を有するセグメントを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、ならびに、抗体に対するエピトープが該ウマアレルゲンと共通であるそれらの変異体およびフラグメント。

20

【請求項 6】

第一のペプチドセグメントが、アミノ酸配列 A T C P A V A T D I A S F F L L P D S L F K L Q L I K Y Q A P P E A K D A T M Q V K Q C I N E I S A G D R Y I I T E T L G K I V L Q C G A (配列番号 4) を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、ならびに、抗体に対するエピトープが該ウマアレルゲンと共通であるそれらの変異体およびフラグメント。

【請求項 7】

第二のペプチドセグメントが、アミノ酸配列 G S G C Q L L E D V V E K T I T A E L S P A E Y V E A V Q E F I P D E A T E K A A I Q L K Q C Y L K Q S N E T L N D F R T M M N S M Y N S A Y C A L F (配列番号 5) を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、ならびに、抗体に対するエピトープが該ウマアレルゲンと共通であるそれらの変異体およびフラグメント。

30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンをコードする単離された核酸配列。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項 11】

インビトロでの 1 型アレルギーの診断に使用するための請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン。

【請求項 12】

インビトロでの 1 型アレルギーの診断のための診断剤組成物を製造するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンの使用。

【請求項 13】

アレルゲン抽出物および / または少なくとも 1 種の精製したアレルゲン構成要素を含む組成物に、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンを添加する工程を含む、

50

アレルゲン組成物の製造方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法によって得られるアレルゲン組成物。

【請求項 15】

インビトロでの 1 型アレルギーの診断方法であって、該方法は：

1 型アレルギーを有する疑いのある患者からの免疫グロブリンを含む体液サンプルを、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、請求項 14 に記載のアレルゲン組成物と接触させる工程、および、

サンプル中の、前記ウマアレルゲンに特異的に結合する I g E 抗体の存在を検出する工程、

を含み、ここで、このような前記ウマアレルゲンに特異的に結合する I g E 抗体が存在することは、1 型アレルギーであることを示す、上記方法。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、請求項 14 に記載の組成物を含む、請求項 15 に記載の方法を行うための診断キット。

【請求項 17】

1 型アレルギーの予防的または治療的処置に使用するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン。

【請求項 18】

1 型アレルギーの予防的または治療的処置のための治療用組成物を製造するための、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲンの使用。

【請求項 19】

1 型アレルギーの治療に感受性を有する個体に、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、I g E 結合反応を排除するかまたは弱められるように改変された形態のウマアレルゲンを投与することを含む、1 型アレルギーの治療方法。

【請求項 20】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウマアレルゲン、または、I g E 結合反応を排除するかまたは弱められるように改変された形態のウマアレルゲン、および、任意に医薬的に許容されるキャリアー、賦形剤、緩衝液および希釈剤の少なくとも 1 種を含む医薬組成物。

【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。より具体的には、本発明は、哺乳動物からの新規のアレルゲンの同定、および、哺乳動物に対するアレルギーの診断および治療に関する。

【背景技術】

【0002】

先進工業国における人口のおよそ 20 % が、様々な環境要因由来の抗原に曝露されると過剰反応（アレルギー性）を示すようになっている。このような即時のおよび / または遅延型の過敏症を誘発させる抗原は、アレルゲンとして知られている（Breiteneder et al. 1997）。このようなアレルゲンとしては、イネ科植物の産物、木、草類、動物の鱗屑、昆虫、食物、薬物および化学物質が挙げられる。アトピー性アレルギーに関与する抗体は、主として免疫グロブリン E アイソタイプ（I g E）に属する。I g E は、特異的な高親和性受容体 F c ε R I を介して好塩基球、肥満細胞および樹状細胞に結合する。アレルゲンに曝露されると、細胞表面にアレルゲン特異的な I g E 抗体と架橋を形成し、それによりヒスタミンやロイコトリエンなどの炎症性メディエータの放出が起こり、結果としてアレルギーの生理学的徴候が生じる（Akdis 2006）。

【0003】

アレルギーの診断テストは、アレルゲン源由来のタンパク質に特異性を有する患者からの I g E 抗体を検出することを含む。これらの試験には、典型的には、タンパク質の混合物を含むアレルゲン源からの水性抽出物が用いられる。ほとんどのアレルゲン源について、粗抽出物中に存在するアレルゲンタンパク質の一部しか同定および特徴付けがなされていない。患者における特異的な I g E 抗体を検出するための診断テストの手順は、患者由来の血清を用いたインビトロでのイムノアッセイを利用するか、または、患者の皮膚に特異的な抽出物を局所的に塗布することによって行われる皮膚プリックテスト (S P T) (Wainstein et al. 2007) によって行うことができる。

【 0 0 0 4 】

近年、アレルゲン抽出物中の重要な様々なアレルゲンタンパク質が同定され特徴付けられている。これにより、これら個々のアレルギーを起こす構成要素それぞれに特異的な I g E 抗体の定量が可能になり、これは、しばしば構成要素分解診断法 (component resolved diagnostics ; CRD) (Valenta et al. 1999) (Hiller et al. 2002) と称され、多くの場合、それにより過敏症の診断を改善することができる (Stumvoll et al. 2003) 。また C R D の使用は、最適な免疫療法における処置の選択にも役立つことが示唆されている (Valenta et al. 2007) 。さらに個々のアレルゲンは、抽出物にアレルゲン構成要素を加えることによって抽出物の診断感度を高めるのに用いられることもある。結論付けると、各アレルゲン源中の全ての重要なアレルゲンタンパク質を同定して特徴付けることは、上記の理由から非常に重要である。

【 0 0 0 5 】

例えば抗ヒスタミンによってアレルギーの症状を軽減することとは別に、特異的な免疫療法を用いてより長期にわたる治癒的なアレルギー治療を行うことができる。病気を引き起こすアレルゲン抽出物を、最も一般的には皮下または舌下のいずれかに塗布することにより、アレルゲンタンパク質に対する予防的な免疫反応の特異的な活性化が起る。正確なメカニズムは完全にはわかっていないが、このような免疫系の特異的な活性化は、その後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緩和する (Akdis et al. 2007) 。一定の免疫療法のさらなる開発は、未精製の天然抽出物の代わりに、1 種または数種の精製アレルゲンタンパク質を使用することである。このような免疫療法は、イネ科植物の花粉アレルギー患者には成功しており (Jutel et al. 2005) 、さらに動物の鱗屑に対するアレルギーも治療することが示唆されている (Gronlund et al. 2009) 。

【 0 0 0 6 】

ウマ鱗屑は、一般的な呼吸器のアレルギーの原因になりつつあり (Liccardi et al. 2011) 、このアレルギーは鼻炎、結膜炎、気管支炎症および喘息などの症状を示す。アレルギー感作の決定的な危険因子は、職業的にウマアレルゲンに曝露されることであるが (Tutluoglu et al. 2002) 、学校などその他の場所でもかなりの濃度のアレルゲンを検出することができる (Kim et al. 2005) 。ある研究では、ウマ鱗屑に対する I g E 感作は、喘息を発症させる高い危険と関連することが示された (Ronmark et al. 2003) 。

【 0 0 0 7 】

ウマの毛および鱗屑の抽出物はアレルゲンタンパク質の複雑な混合物を含んでおり、これまでに 4 種のウマアレルゲン : E q u c 1 、 E q u c 2 、 E q u c 3 および E q u c 4 / 5 が同定されている。最初の 2 種はいずれもリボカリンタンパク質ファミリーに属するもので、それらの自然源から精製されているが (Dandeu et al. 1993 ; Goubran Botros et al. 1998) 、 E q u c 1 のみが組換えタンパク質として発現されている (Gregoire et al. 1996) 。 E q u c 1 のアミノ酸配列は、ネコアレルゲン F e l d 4 と 6 7 % 類似している (Smith et al. 2004) 。 E q u c 3 はウマ血清アルブミンであり、これは、比較的保存されたタンパク質であり、他の哺乳動物アルブミンに対して広範な交差反応性を示す (Goubran Botros et al. 1996) 。 E q u c 4 / 5 は、最初に精製され、ウマ鱗屑における I g E 結合タンパク質として報告されたものであるが (Goubran Botros et al. 1998 ; Goubran Botros et al. 2001) 、ウマの汗のラセリン (latherin) と同定されたのは後になってからである (McDonald et al. 2009) 。 E q u c 1 は、既知のウマアレルゲンのな

かでも最も重要なものと言われており (Dandeu et al. 1993)、組換えタンパク質の I g E 抗体認識は、研究対象のウマアレルギーの被験者の 76% で観察されている (Saarelainen et al. 2008)。精製した天然アレルゲンを用いた別の研究では、ウマアレルギー患者のうち 33% しか E q u c 2 に感作されておらず、E q u c 4 / 5 には 23% しか感作されていなかった (Goubran Botros et al. 1998)。いくつかの研究で、ウマ血清アルブミンへの I g E 結合の頻度を検討したところ、ウマアレルギーの被験者の最大 40% において反応性が認められた (Spitzauer et al. 1993; Cabanas et al. 2000)。しかしながら、血清アルブミンに感作すると、それに伴い他のアレルゲン構成要素に対する I g E 抗体がより高濃度になることが多いことから、その特異的な臨床的関連性は不明確である。

【0008】

長い間、ウマ鱗屑アレルゲンの E q u c 1、E q u c 2、E q u c 3 および E q u c 4 / 5 が知られていたにもかかわらず、ウマ鱗屑に対する全 I g E 反応に対する各構成要素の寄与率の定量的な推定はなされていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】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 .

【非特許文献 2】Akdis, C. A. (2006). "Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease." Curr Opin Immunol 18(6): 718-726

【非特許文献 3】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

【非特許文献 4】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

【非特許文献 5】Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." FASEB Journal 16(3): 414 -416

【非特許文献 6】Stumvoll, S., K. Westritschnig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine Parietaria judaica pollen allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology 111(5): 974-979

【非特許文献 7】Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." J Allergy Clin Immunol 119(4): 826-830

【非特許文献 8】Akdis, M. and C. A. Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." J Allergy Clin Immunol 119(4): 780-791

【非特許文献 9】Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." J Allergy Clin Immunol 116(3): 608-613

【非特許文献 10】Gronlund, H., T. Saarne, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." Int Arch Allergy Immunol 151(4): 265-274

【非特許文献 11】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

【非特許文献 12】Tutluoglu, B., S. Atis, et al. (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." Clin Exp Allergy 32(8): 1170-1173

【非特許文献 1 3】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

【非特許文献 1 4】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

【非特許文献 1 5】Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.C1, the Horse Major Allergen." *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 621(1): 23-31

【非特許文献 1 6】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.

【非特許文献 1 7】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

【非特許文献 1 8】Smith, W., A. J. Butler, et al. (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." *Clinical & Experimental Allergy* 34(11): 1732-1738

【非特許文献 1 9】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

【非特許文献 2 0】Goubran Botros, H., P. Poncet, et al. (2001). "Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens." *Eur J Biochem* 268(10): 3126-3136.

【非特許文献 2 1】McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." *PLoS One* 4(5): e5726

【非特許文献 2 2】Saarelainen, S., M. Rytönen-Nissinen, et al. (2008). "Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity." *Clin Exp Allergy* 38(2): 374-381

【非特許文献 2 3】Spitzauer, S., C. Schweiger, et al. (1993). "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting." *International Archives of Allergy and Immunology* 100: 60-67

【非特許文献 2 4】Cabanac, R., M. C. Lopez-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

【発明の概要】

【0010】

上述したように、うまく設計された特異的な IgE 抗体のための実験用イムノアッセイを用いれば、天然ウマ鱗屑抽出物を用いてウマへの感作のほとんどのケースを検出することができる。しかしながら、小型化された、または、実験用ではないイムノアッセイ、例えばアレルゲンマイクロアレイ、または、医師の診察室で行われる試験の場合、分析条件があまり好適ではないこと、抗体結合アレルゲン試薬の能力が低いこと、さらに天然アレルゲン抽出物は限定的な効力しか有さないことが組み合わさって、不十分な診断感度しか得られない可能性がある。他の動物上皮に対する特異的な IgE のイムノアッセイについても同様の状況が起こり得る。従って、動物上皮に対する特異的な IgE 抗体のための診断テストにおいて十分な感受性を達成するために、場合によっては純粋なアレルゲンタンパク質を使用することが必要である。

【 0 0 1 1 】

このようなアレルゲンは、慣例的な診断テストにおいて感受性を高めるための試薬としてだけでなく、異なるタイプの構成要素分解診断法の適用においても有用であり得る (Valenta et al. 1999) (Hiller et al. 2002)。免疫療法における新規の試薬として、改善された非アナフィラキシー性を有する純粋なアレルゲンタンパク質またはフラグメントおよびそれらの変異体も使用される可能性がある (Valenta et al. 1999) (Cromwell et al. 2006) (Saarne et al. 2005) ; (Jutel et al. 2005) ; (Cromwell et al. 2006)。

【 0 0 1 2 】

全ての既知のウマアレルゲン構成要素の精製および解析から、ウマ鱗屑抽出物に対して、個々のウマアレルゲン構成要素に対する反応を全て合計した値よりも有意に高い I g E 反応を示す数人の患者の血清が同定された。これらの血清は、これまで知られていなかったウマアレルゲン構成要素に対する I g E 結合反応性を有することが見出された。

10

【 0 0 1 3 】

上述の血清を用いて、ウマ鱗屑から新しい主要アレルゲンを精製したところ、セクレトグロビンタンパク質ファミリーの一員と同定することができた。本明細書において E q u c 1 5 k と称される新規のウマタンパク質は、ジスルフィド架橋で一緒に結合した 1 つの 1 5 k D a のアミノ酸鎖と 1 つの 1 0 k D a のアミノ酸鎖からなる。2 種のポリペプチド鎖は別個の遺伝子によってコードされていることを考慮すると、この研究から、これまでウマゲノムの生物情報学的な研究では予測されなかったヘテロ二量体タンパク質の存在が示された。このアレルゲンは、あらゆる形態においてこれまでに知られていたウマアレルゲンとは異なっている。このアレルゲンは、既知のウマアレルゲンのパネルへの重要な追加となり、ウマアレルギーの診断において有用であると予想される。

20

【 0 0 1 4 】

一形態において、本発明は、非還元条件下でおよそ 1 5 k D a に相当する電気泳動移動度 (見かけの分子量) を示し、1 個またはそれより多くのジスルフィド結合で一緒に連結した約 5 k D a の分子量を有する第一のペプチド鎖と約 1 0 k D a の分子量を有する第二のペプチド鎖とを含む、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の E q u c 1 5 k に関する。この本発明の形態はまた、E q u c 1 5 k と共通の抗体に関するエピトープを有する E q u c 1 5 k の変異体およびフラグメントも含み、ここでこのような変異体およびフラグメントは、このような抗体と少なくとも約 5 0 % まで交差反応する。このような変異体およびフラグメントとしては、例えば、同じ種由来の関連アレルゲンが挙げられる。以下で説明されるその他の本発明の形態においても、用語「E q u c 1 5 k」は、便宜上、このようなそれらの変異体およびフラグメントも含むものとして用いられる。

30

【 0 0 1 5 】

その他の形態において、本発明は、最初に述べられた形態に係るアレルゲンをコードする単離された核酸に関し、加えて、核酸分子を含むベクター、および、このようなベクターを含む宿主細胞にも関する。このようなベクターを含む宿主細胞によって生産された組換えタンパク質またはペプチドは、用いられる宿主細胞に応じてグリコシル化されていてもよいし、またはグリコシル化されていなくてもよい。

40

【 0 0 1 6 】

さらなる形態において、本発明は、I 型アレルギーの診断のための組成物を製造するための E q u c 1 5 k の使用に関する。

さらなる形態において、本発明は、E q u c 1 5 k で「スパイクされた」アレルゲン組成物に関する。このようなアレルゲン組成物は、E q u c 1 5 k 含量がゼロか低いアレルゲン抽出物または精製もしくは組換えアレルゲン構成要素の混合物であってもよく、ここで E q u c 1 5 k は、自身の I g E が組成物中の他のアレルゲン構成要素と結合しないか、または不十分にしか結合しないと予想される患者由来の I g E と結合させるために添加される。またこの本発明の形態は、このような組成物を生産する方法にも関し、本方法は

50

、例えばアレルゲン抽出物などのアレルゲン組成物（任意に他の構成要素でスパイクされていてもよい）、または、精製した天然または組換えアレルゲン構成要素の混合物に E q u c 1 5 k を添加する工程を含む。

【 0 0 1 7 】

さらにその他の形態において、本発明は、患者において I 型アレルギーを診断するインビトロでの診断方法に関し、ここで体液サンプル、例えば患者からの血液または血清サンプルと、E q u c 1 5 k または前述の形態に係る組成物とを接触させることにより、患者のサンプルが E q u c 1 5 k に特異的に結合する I g E 抗体を含むかどうかを決定することができる。このような診断方法は、当業界でよく知られているあらゆる方法で行うことができる。E q u c 1 5 k は、例えば従来の実験室レベルのイムノアッセイ、マイクロアレイ、または、ラテラルフロー分析においては、例えば固体支持体に固定されていてもよいし、または、流体相試薬として用いてもよい。

10

【 0 0 1 8 】

その他の形態において、本発明は、前述の形態に係る方法を行うための診断キットに関する。

上述した形態において、野生型 E q u c 1 5 k 分子は、上述したように、以下で定義されるような、野生型タンパク質と共通の抗体に対するエピトープを有する E q u c 1 5 k の天然または人工のフラグメントまたは変異体で置き換えることができる。

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、I 型アレルギーの治療方法に関し、本方法は、以下で説明するように、このような治療が必要な患者に、E q u c 1 5 k または改変された E q u c 1 5 k を投与することを含む。この本発明の形態はまた、例えば構成要素分解免疫療法 (Valenta et al. 2007) などの免疫療法における E q u c 1 5 k の使用にも関する。この形態の一実施態様において、E q u c 1 5 k は、その天然の形態で用いてもよいし、または、天然分子と類似した生化学的および免疫学的な特性を示す組換えの形態で用いてもよい。その他の実施態様において、E q u c 1 5 k は、治療された個体においてその I g E 抗体結合能力を排除 (abrogate) するかまたは弱める (attenuate) ために、同時に好ましくは I g G 反応を惹起できるようにするために化学的または遺伝学的に生成した改変された形態で用いてもよい。改変例としては、これらに限定されないが、分子の断片化、トランケーション、タンデム化もしくは凝集、内部セグメントの欠失、アミノ酸残基の置換、他の高分子構造または他方の低分子量化合物へのジスルフィド架橋または結合を壊すことによるドメインの再構成もしくは少なくとも部分的な三次構造の破壊が挙げられる。この形態のさらにその他の実施態様において、改変された E q u c 1 5 k として、無傷の分子と比較して低い I g E 結合活性を示す E q u c 1 5 k の個々の 1 0 k D a および / または 5 k D a のサブユニットが用いられる。

20

30

【 0 0 2 0 】

上述した全ての本発明の形態において、E q u c 1 5 k タンパク質は、例えば尿、唾液またはその他の体液などのその自然源から精製してもよいし、または、例えばウマの毛髪または鱗屑などの組織から精製してもよい。また、上述したように、当業者によく知られた方法によって組換え D N A 技術によって生産してもよいし、または化学合成によって生産してもよい。

40

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、I 型アレルギーの予防的または治療的処置に使用するための E q u c 1 5 k にも関し、加えて診断でも使用するための E q u c 1 5 k にも関する。

定義

ここで述べられるアレルギーを起こすウマタンパク質である E q u c 1 5 k は、セクレトグロビンタンパク質ファミリーに属しており、具体的には 2 個のヘテロ二量体サブユニットによって形成された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。ヘテロ二量体は、ジスルフィド架橋によって一緒に連結した異なる遺伝子から誘導された 2 つの鎖からなる (Klug et al. 2000)。ここで述べられるウマセクレトグロビンは、本明細書

50

においてE q u c 1 5 kと称される1 5 k D aのヘテロ二量体であって、これは、それぞれ5 ± 2 k D aのサブユニットと1 0 ± 2 k D aのサブユニットとからなり、これらはそれぞれ、本発明の目的において5および1 0 k D aサブユニットと称される。分子量の割り当ては、以下の実施例4で説明されてるS D S - P A G Eで観察されたそれらの見かけの分子量に従う。当然ながら見かけの分子量は、例えば電気泳動による分離の媒体およびそれらの濃度、用いられる直線的または濃度勾配のある緩衝液などの分離条件に応じて変動すると予想される。また1 0 k D aサブユニットにはN - グリコシル化部位が含まれるが、グリカン構造にこのような部位が含まれると、見かけの分子量に影響を与える可能性がある。

【0022】

5 k D a鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列A T C P A V A T D I A S F F L L P D S L F K L Q L I K Y Q A P P E A K D A T M Q V K Q C I N E I S A G D R Y I I T E T L G K I V L Q C G A (配列番号4)を有し、理論上の分子量は、7 . 5 k D aである。

【0023】

1 0 k D a鎖のアミノ酸配列は、予測アミノ酸配列G S G C Q L L E D V V E K T I T A E L S P A E Y V E A V Q E F I P D E A T E K A A I Q L K Q C Y L K Q S N E T L N D F R T M M N S M Y N S A Y C A L F (配列番号5)を有し、理論上の分子量は、8 . 4 k D aである。

【0024】

特筆すべきことに、様々な哺乳動物種において構造的に関連するタンパク質が説明されているが、アレルゲンと定義されたタンパク質は、主要なネコアレルゲンF e l d 1のわずか1種である(登録番号P 3 0 4 3 8およびP 3 0 4 4 0)。

【0025】

E q u c 1 5 kの変異体およびフラグメントは、ヘテロ二量体における各鎖が少なくとも1 0個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも4 0個、さらにより好ましくは少なくとも5 0個または6 0個のアミノ酸残基の長さを有し、前記E q u c 1 5 kとの配列同一性が少なくとも5 0%、好ましくは6 0%より高い、7 0%、8 0%、9 0%または9 5%であるタンパク質またはペプチドを意味するものと解釈されるべきである。

【0026】

本発明の環境において、改変されたE q u c 1 5 kは、例えば上記で本発明の免疫療法の形態に関して例示されたように、その免疫学的な特性を変えるために化学的に改変された、または、遺伝子組換えされたE q u c 1 5 k変異体を意味するものとして解釈されるべきである。

【0027】

E q u c 1 5 kと共通の抗体に対するエピトープを有するE q u c 1 5 kの変異体およびフラグメントは、代表的なE q u c 1 5 kに感作した患者の血清サンプルからの抗体(例えばI g EまたはI g G抗体)との結合が、E q u c 1 5 kによって有意に阻害される可能性があるフラグメントおよび変異体と解釈されるべきである。このような阻害分析は、例えば、Mattsson et al. 2009(この開示は、参照により本明細書に組み入れられる)で説明されている方法に従って行ってもよい。

【0028】

低アレルギー性の改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントは、例えば以下に記載された実施例7に従ったプロトコールによって決定した場合に、代表的なE q u c 1 5 kに感作した患者の血清サンプルからのE q u c 1 5 k反応性I g E抗体と結合できない改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントであるか、または、例えば好塩基球のヒスタミン放出分析(Demoly et al. 2003; Ebo et al. 2004)などの細胞活性化分析によって決定した場合に、生物学的なアレルゲン活性がないか、または極めて低い生物学的なアレルゲン活性しか示さない改変されたE q u c 1 5 kまたはE q u c 1 5 kの変異体もしくはフラグメントである

10

20

30

40

50

と解釈されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】図1Aは、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によるウマ鱗屑タンパク質の分画化を示す。それに続く精製工程に用いられたピークAおよびBは矢印で指定した。

【図1B】図1Bは、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるnE q u c 1の精製を示す。ピークCおよびDは、それに続く精製工程に用いられた。

【図1C】図1Cは、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるnE q u c 2およびE q u c 4 / 5の精製を示す。ピークE、FおよびGは、それに続く精製工程に用いられた。

【図1D】図1Dは、陰イオン交換クロマトグラフィーによるnE q u c 2の精製を示す。ピークHおよびIは、それに続く解析に用いられた。

【図1E】図1Eは、精製したタンパク質のE q u c 1のAおよびBの形態、E q u c 2およびE q u c 4 / 5の14 k D aおよび19 k D aの形態のSDS - PAGE解析を示す。レーンMは、分子量マーカータンパク質を含み、分子量は左側に示した。

【図2A】図2Aは、35種のウマ鱗屑反応性血清を用いてnE q u c 1の2つのA型およびB型のI g E 結合（それぞれピークCおよびピークD）を比較した図である。点線は、0.35 k U A / Lのカットオフレベルを示す。

【図2B】図2Bは、38種のウマ鱗屑反応性血清を用いてnE q u c 4 / 5の19 k D aおよび14 k D aの形態のI g E 結合を比較した図である。点線は、0.35 k U A / Lのカットオフレベルを示す。

【図3A】図3は、新規のI g E 結合タンパク質を検索するのに使用された分画の精製を示す。A：陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画Aの精製。

【図3B】図3は、新規のI g E 結合タンパク質を検索するのに使用された分画の精製を示す。B：疎水性相互作用クロマトグラフィーによる分画BおよびCの精製。

【図4A】図4は、15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。A：サイズ排除クロマトグラフィーによるウマ鱗屑抽出物の分画化。ピークAは、それに続く精製工程に用いられた。

【図4B】図4は、15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。B：疎水性相互作用クロマトグラフィーによるピークAの分画化である。ピークJは、図で指定された通りにブールされ、それに続く精製工程に用いられた。

【図4C】図4は、15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。C：陰イオン交換クロマトグラフィーによるピークJの分画化。ピークKおよびLは、それに続く解析および/またはさらなる精製工程に用いられた。

【図4D】図4は、15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。D：精製した15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の還元（Red）および非還元（Ox）サンプルのSDS - PAGE解析を示す。レーンMは、分子量マーカータンパク質を含み、分子量は左側に示した。

【図4E】図4は、15 k D aのウマ鱗屑タンパク質の精製を示す。E：逆相クロマトグラフィーによるピークKの精製の精密化。ピークMは、その後の免疫学的な解析に用いられた。

【図5】図5は、nE q u c 15 kの5 k D aおよび10 k D aのアミノ酸鎖の予想された配列を示す。N末端の配列解析によって同定されたアミノ酸を下線で示し、MS / MS解析によって同定されたアミノ酸を太字で示す。

【図6】図6は、免疫プロットングによって検出された、ウマアレルギー患者のうち2名（番号3および12）の血清中のnE q u c 15 kに対するI g Eの反応性を示す。最初の2つのストリップは全てのタンパク質の染色を示し、5および10 k D aサブユニットならびに15 k D aのタンパク質それぞれの位置を矢印で示した。右の4つのストリップは、E q u c 15 kの還元（Red）および非還元（Ox）サンプルへのI g E 結合を示す。

10

20

30

40

50

【図 7】図 7 は、天然および組換え E q u c 1 5 k の I g E 反応性の相関を示す。0 . 3 5 k U A / L および 0 . 1 k U A / L レベルを点線で示した。

【図 8】図 8 は、25 人のウマ鱗屑アレルギーの被験者の同齡集団における、ウマ鱗屑抽出物 (H D E)、E q u c 1、n E q u c 2、n E q u c 3、n E q u c 4 / 5 および r E q u c 1 5 k に対する I g E 抗体のレベルを示す。0 . 1 k U A / L 未満の観察の数は、各構成要素ごとに括弧内に示した。点線は 0 . 3 5 k U A / L レベルを示し、実線は 0 . 1 k U A / L レベルを示す。水平のバーは、I g E の中央値のレベルを示す。

【図 9】図 9 は、n E q u c 1 5 k および r F e l d 1 に対する I g E 抗体結合を比較した図である。0 . 3 5 k U A / L および 0 . 1 k U A / L レベルを点線で示した。

【図 10】図 10 は、固定された E q u c 1 および F e l d 1 への I g E 結合を自己阻害および交差阻害する可溶性 E q u c 1 5 k および F e l d 1 の能力を示す。ウマ鱗屑アレルギー患者からの血清 (表 3 に従って標識された) またはウマ鱗屑で感作された被験者からの血清 (A ~ E と標識された) を用いた。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

以下の実施例は、ウマからのセクレトグロビンの単離および使用によって本発明を説明するものである。これらの実施例は単なる説明であり、本発明を制限するものと解釈すべきではなく、本発明は添付の請求項の範囲によって定義される。

【0031】

実施例 1 : ウマ鱗屑および血清からの既知のアレルゲンの精製および特徴付け

E q u c 1、E q u c 2 および E q u c 4 / 5 を精製するための出発原料としてウマ鱗屑を用い、一方でウマ血清から E q u c 3 を精製した。

【0032】

20 m M の M O P S (p H 7 . 6)、0 . 5 M の N a C l (M B S = M O P S - 緩衝食塩水) 中でウマ鱗屑 (アレルゴン (Allergon)、スウェーデン国バリング (Valinge)) を抽出し、遠心分離で透明にし、0 . 4 5 μ m の混合型のセルロースエステルフィルター (ミリポア (Millipore)、米国マサチューセッツ州ビレリカ) を通過させてろ過した。3 種全てのウマ鱗屑アレルゲンにとって第一の精製工程として、透明化した抽出物を、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) のためにスーパーデックス (SuperdexTM) 7 5 カラム (X K 2 6 / 1 0 0、V_t = 5 0 5 m L、G E ヘルスケア・ライフサイエンス (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s)、スウェーデン国ウプサラ) に適用し、M B S を用いて流速 2 m L / 分で溶出した。

【0033】

E q u c 1

E q u c 1 を精製するために、図 1 A におけるピーク A を 2 M の N H₄ S O₄ に調整し、20 m M トリス (p H 8 . 0) 中の 2 M の N H₄ S O₄ で平衡化したフェニルセファロース (Phenyl SepharoseTM) H P カラム (H R 1 0 / 1 0、V_t = 9 . 0 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス) に適用した。2 M ~ 0 M の N H₄ S O₄ の直線的な N H₄ S O₄ 濃度勾配で溶出させた。勾配の中央で E q u c 1 を含む 2 つのピーク (図 1 B におけるピーク C および D) が溶出した。20 m M の M O P S (p H 7 . 6)、0 . 5 M の N a C l で平衡化したセファデックス (SephadexTM) G 2 5 ファインカラム (X K 1 6 / 2 0、V_t = 3 4 m L、G E ヘルスケアライフサイエンス) で各ピークを脱塩した後、それぞれの n E q u c 1 調製物をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) で、サンプルと 1 0 0 m M の β - メルカプトエタノールを含む N u P A G E E L D S サンプル緩衝液 (インビトロジェン) とを 1 : 3 で混合することによって製造された還元サンプルの N u P A G E M E S 緩衝液系 (1 0 % N u P A G E ゲル、インビトロジェン (Invitrogen)、米国カリフォルニア州カールスバッド) を用いて処理した。見かけの分子量の指標として、マーク 1 2 (Mark12TM) 標準 (インビトロジェン) を用いた。いずれの n E q u c 1 調製物も S D S - P A G E での判断から純粋であることがわか

10

20

30

40

50

った (図 1 E)。

【0034】

説明されている通りに、ブルカー・ダルトニクス・オートフレックス (Autoflex) 2 装置 (ブルカー・ダルトニクス (Bruker Daltonics), ドイツ国ブレーメン) でペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) を行うことによってタンパク質調製物を明確に E q u c 1 と同定した (Mattsson et al. 2009)。

【0035】

説明されている通りに、上記タンパク質の両方の形態をイムノCAP (ImmunoCAP™) 固相に固定した (Marknell DeWitt et al. 2002)。

E q u c 2

E q u c 2 を精製するために、SEC からの第二のピーク (図 1 A におけるピーク B) を 1 M の NH_4SO_4 に調整し、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) において 20 mM トリス (pH 8.0) 中の 1 M の NH_4SO_4 で平衡化したフェニルセファロースTM HP カラム (HR 10 / 10, $V_t = 9.0 \text{ mL}$, GE ヘルスケアライフサイエンス) で処理した。同じ緩衝液中の 1 M ~ 0 M の NH_4SO_4 の直線的な NH_4SO_4 濃度勾配で溶出させた。分画 (図 1 C におけるピーク E) を通過したフロー中に E q u c 2 が含まれており、これをプールして、20 mM のピストリスプロパン (pH 8.5) で平衡化したセファデックスTM G 25 ファインカラム (XK 26 / 20, $V_t = 90 \text{ mL}$, GE ヘルスケアライフサイエンス) で脱塩した。脱塩した E q u c 2 プールを最終的に 20 mM のピストリスプロパン (pH 8.5) で平衡化した陰イオン交換カラムソース (SourceTM) 15 Q (HR 16 / 10, $V_t = 9 \text{ mL}$, GE ヘルスケアライフサイエンス) に適用した。同じ緩衝液中の 0 ~ 0.40 M の直線的な NaCl 濃度勾配で溶出させたところ、タンパク質は 3 つのピークに分解し、これらはいずれも、SDS-PAGE 解析で純粋な 17 kDa のバンドを示した。最も大きい 2 つのピークを N 末端の配列解析 (プロサイス (ProCiseTM) LC 452、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems), 米国カリフォルニア州フォスターシティー) で解析し、これらはいずれも配列 D Q D P Q S E D T Y を有しており、これらは E q u c 2 . 0201 と同定された (図 1 D ピーク H および I)。説明されている通りに、IGE 結合反応性を評価するために、これらのピークをプールし、イムノCAPTM 固相に固定した (Marknell DeWitt et al. 2002)。

【0036】

E q u c 4 / 5

SEC からの第二のピーク (図 1 A のピーク B) を用いて E q u c 4 / 5 の精製を行った。このプールを 1 M の NH_4SO_4 に調整し、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) において 20 mM トリス (pH 8.0) 中の 1 M の NH_4SO_4 で平衡化したフェニルセファロースTM HP カラム (HR 10 / 10, $V_t = 9.0 \text{ mL}$, GE ヘルスケアライフサイエンス) で処理した。同じ緩衝液中の 1 M ~ 0 M の NH_4SO_4 の直線的な NH_4SO_4 濃度勾配で溶出させた。E q u c 4 / 5 タンパク質は、勾配の中央で 2 つの別個のピーク (図 1 C におけるピーク F および G) に溶出した。第一のピークの SDS-PAGE 解析から 14 kDa のバンドとして移動するタンパク質が明らかになり、第二のピークは 19 kDa のバンドを含むことが明らかになった。その後、20 mM のピストリスプロパン (pH 8.5) で平衡化したセファデックスTM G 25 ファインカラム (XK 26 / 20, $V_t = 90 \text{ mL}$, GE ヘルスケアライフサイエンス) で脱塩した。いずれのタンパク質も SDS-PAGE により純粋であることがわかった (図 1 E)。これら 2 種の調製物はいずれも N 末端配列 V G P L L G P S D A を示し、これは、ウマラセリンまたは E q u c 4 / 5 と同定された。

【0037】

説明されている通りに、n E q u c 4 / 5 の 2 つの形態を別々にイムノCAPTM 固相に固定した (Marknell DeWitt et al. 2002)。

E q u c 3

天然 E q u c 3 を、実質的に説明されている通りに、ブルー・セファロース (Blue Sep

10

20

30

40

50

harose) F F、(G E ヘルスケアライフサイエンス) を用いたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー (A I E C) および S E C によって、ウマ血清から精製した (van Eijk et al. 1999)。

【 0 0 3 8 】

実施例 2 : ウマに感作された個体からの血清のパネルにおける個々のウマ鱗屑アレルゲン構成要素への I g E 結合レベルの評価

A 型および B 型と名付けられた E q u c 1 の 2 つの形態の I g E 結合活性を、(社内の血清コレクションから得られた) ウマ鱗屑に感作された血清 1 セットを用いて評価した。図 2 A で示されるように、E q u c 1 の 2 つの形態は、同等の I g E 結合活性を示した。従って以下の分析には n E q u c 1 A で得られた値のみを用いた。ウマ鱗屑反応性血清の類似のセットを用いて、E q u c 4 / 5 の 2 つの形態への I g E 抗体結合を比較したところ、図 2 B で示されるように、それらは極めて類似していることがわかった。

10

【 0 0 3 9 】

通常の実験用イムノ C A P ^{T M} 試験 (ファディア (Phadia) , スウェーデン国ウブサラ) を用いてウマ鱗屑抽出物および精製したウマアレルゲンへの I g E 抗体結合を試験した。実験用イムノ C A P ^{T M} 試験を上述のようにして調製した。ウマ鱗屑で感作された個体からの 2 9 種の血清のパネルを用いた。ウマ鱗屑抽出物、n E q u c 1、n E q u c 2、n E q u c 4 / 5 に対する I g E 反応の決定を行った。結果は表 1 に示したが、ここで患者 A 1 ~ A 2 9 の血清中の H D E および構成要素および 3 種の構成要素の合計に対する I g E 抗体濃度は k U A / L で表示した。構成要素の割合は、構成要素の合計とウマ鱗屑抽出物との比率であり、パーセンテージで示した。

20

【 0 0 4 0 】

ウマ鱗屑抽出物に対する I g E 結合のレベルが、個々の構成要素、例えば血清番号 A 1、A 2 1 および A 2 2 それぞれが占める可能性があるレベルよりも有意に高いレベルを有する多数の血清を同定した。この段階で評価されていない E q u c 3 反応性の可能性を別にしても、同定した血清は、新規のウマ鱗屑由来 I g E 結合タンパク質の検索に役立つ可能性がある。

【 0 0 4 1 】

実施例 3 : 新規の I g E 結合反応性を有するウマ鱗屑からの分画の同定

前もって特徴付けられているウマ鱗屑アレルゲンを精製するプロセスの間に、これまでに知られていたウマアレルゲン以外のタンパク質を含む数種の分画が同定された。上記の実施例 2 で同定された血清を用いて I g E 結合活性を解析するために特に興味深い 3 種の分画を選択した。分画 A には、矢印で示された (図 3 A) E q u c 2 の陰イオン交換による精製工程から得られた 1 0 k D a のバンド (還元 S D S - P A G E) が含まれていた。それぞれ 1 3 k D a および 1 0 k D a のバンド (還元 S D S - P A G E) を含む分画 B および C を E q u c 1 の H I C 精製工程から得て、これは図 3 B において矢印で示した。説明されている通りに、実験用イムノ C A P ^{T M} (ファディア) 試験を調製し (Markneill D eWitt et al. 2002)、これを血清解析に用いた。

30

【 0 0 4 2 】

表 2 に結果をまとめたが、表 2 はさらに、以前のウマ鱗屑抽出物の決定と n E q u c 1、n E q u c 2 および n E q u c 4 / 5 の合計も含み、いずれも k U A / L として表示した。分画 C において最大 I g E 結合レベルが確認された。特筆すべきことに、血清 A 1 において、分画 C への I g E 結合レベルが、n E q u c 1、n E q u c 2 および n E q u c 4 / 5 への I g E 結合の合計よりもかなり高かった。この血清において、アルブミン I g E の反応性は 1 . 5 k U A / L しか示さなかった (示さず) ことから、分画 C には新規のウマ鱗屑アレルゲンが含まれることが示唆される。

40

【 0 0 4 3 】

実施例 4 : 分画 C において優勢なタンパク質成分の精製および同定

分画 C からのウマ鱗屑タンパク質の精製

分画 C に存在する 1 0 k D a のタンパク質をより高度に標的化した方法で精製するため

50

に、ウマ鱗屑抽出物を実施例 1 で説明されているようにして S E C で処理した。図で指定された通りに (図 4 A におけるピーク A)、S D S - P A G E 解析に従って E q u c 1 を含むピークをプールした。ピーク A の右側部分だけに 1 0 k D a バンドが含まれており、これをプールした。実施例 1 において E q u c 1 に関して説明されている通りに、このプールを 2 M の NH_4SO_4 に調整し、H I C で処理した (図 4 B)。図 4 B におけるピーク J を 2 0 m M のトリス (p H 8 . 0) で 1 : 3 に希釈し、同じ緩衝液で平衡化したソース $^{\text{T M}}$ 1 5 Q カラム (P E 4 . 6 / 1 0 0 , $V_t = 1 . 7 \text{ mL}$; G E ヘルスケアライフサイエンス) に適用した。0 ~ 0 . 4 M の NaCl の直線的な濃度勾配で溶出させたところ、濃度勾配の中央において優勢なピーク、それに続いてより小さいピークが得られた (図 4 C におけるピーク K および L)。実施例 1 で説明されているように N u P A G E M E S 緩衝液系を用いて S D S - P A G E 解析を行ったが、ここでサンプルは、それぞれ還元および非還元条件に応じた 4 % β - メルカプトエタノール含有または非含有の N u P A G E L D S 緩衝液で 1 : 3 に希釈することによってサンプルを調製した。両方のピークの S D S - P A G E 解析 (図 4 D) から、非還元条件下でおよそ 1 5 k D a のバンドが出現した。サンプルを還元した際に、1 5 k D a のバンドが消失したが、同時におよそ 5 および 1 0 k D a の 2 つのバンドが現れたことから、非還元の 1 5 k D a のバンドは、1 個またはそれより多くのジスルフィド架橋で互いに連結した 5 k D a および 1 0 k D a のバンドを形成するポリペプチドで構成されていることが示唆される。両方のピークは同じタンパク質を含むように見えるが、大きいピーク (K) のみをさらなる生化学的解析で処理した。I g E 結合を研究ために、R P C 精製工程でサンプルを 0 . 0 6 5 % T F A の水溶液で平衡化したソース $^{\text{T M}}$ 5 R P C カラム (S T 2 . 1 / 1 5 0 , $V_t = 0 . 5 2 \text{ mL}$; G E ヘルスケアライフサイエンス) に適用することにより精製を行った。0 . 0 5 % T F A を含む 9 0 % アセトニトリルからなる緩衝液 B の 0 ~ 7 0 % の直線的な濃度勾配で溶出させた。濃度勾配の終わり付近でタンパク質が単一のピークで溶出した (図 4 E におけるピーク M)。

【 0 0 4 4 】

セクレトグロビンとしての 1 5 k D a のウマ鱗屑タンパク質の同定

S D S - P A G E ゲルから切り出し抽出した還元型 5 k D a および 1 0 k D a のタンパク質バンドを N 末端の配列解析によって解析した。5 k D a のバンドの解析から、アミノ酸配列 A T x P A V A T D I A S F F L L P D S L (x : 未解析の残基) が明らかになり、これは、「 L p p A B に類似」と表示されたエクウス・カバルス (Equus caballus) の予測配列 (G e n b a n k 登録番号 X P _ 0 0 1 5 0 2 5 4 4) (配列番号 1) の残基 2 2 ~ 4 1 とマッチした。1 0 k D a のバンドの解析から、配列 G S G x Q L L E D V V E K T I T A E L S (x : 未解析の残基) が明らかになり、これは、「リボフィリン C L 2 に類似」と表示されたエクウス・カバルス由来の予測配列 (G e n B a n k 登録番号 X P _ 0 0 1 4 9 4 5 6 4) (配列番号 2) の残基 1 9 ~ 3 8 とマッチした。

【 0 0 4 5 】

溶液中でトリプシン消化した 1 5 k D a の精製タンパク質の M A L D I - T O F 質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング (P M F) 解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な ($p < 0 . 0 5$) マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、ペプチドの M S - M S 解析 $m/z = 2 2 8 1$ および $m/z = 1 2 6 2 . 5$ によって、「 L p p A B に類似」の予想された配列 (エクウス・カバルス) (G e n B a n k 登録番号 X P _ 0 0 1 5 0 2 5 4 4) から配列 Q C I N E I S A G D R Y I I T E T L G K (配列番号 3) が同定された。

【 0 0 4 6 】

ゲル中でトリプシン消化した 5 k D a フラグメントの M A L D I - T O F 質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング (P M F) 解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な ($p < 0 . 0 5$) マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、検出された 5 種の優勢なペプチドはいずれも、配列番号 4 の予想されたトリプシンフラグメントに相当するものであり、ここで $m/z = 9 0 3 . 4 7$ (残基 2 8 ~

35に相当)、 $m/z = 1037.6$ (残基43~53に相当)、 $m/z = 1262.6$ (残基43~53に相当)、 $m/z = 2281.1$ (残基43~62に相当)および $m/z = 2384.2$ (残基1~22に相当)であり、これらは合計で、配列番号4の予測のアミノ酸残基のうち50残基(72%)にあたる。

【0047】

ゲル中でトリプシン消化した10kDaのバンドのMALDI-TOF質量分析法によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)解析を行ったところ、既知のデータベースエントリーとの有意な($p < 0.05$)マッチングはまったく得られなかった。しかしながら、検出された2種の優勢なペプチドは、 $m/z = 1433.6$ および $m/z = 2880.4$ を示し、これは、それぞれ配列番号5の残基1~13および14~39に相当するペプチドGSGCQLLEDVVEKおよびTITAE LSPA EYVEAVQEFIPDEATEKの質量と一致した。

10

【0048】

同定されたデータベースエントリー、XP_001502544(配列番号6)およびXP_001494564(配列番号7)両方のアミノ酸配列は、セクレトグロビンタンパク質ファミリーに特有の特徴を示した。従って、総合すると、これらの結果から、15kDaのウマ鱗屑タンパク質はセクレトグロビンであると同定された。以降、このタンパク質はEuc15kと称する。図5に、Euc15kの2種の鎖の前駆体配列の予測される全長配列を示し(5kDaフラグメント-配列番号6; 10kDaフラグメント-配列番号7)、ここでN末端の配列解析によって同定されたアミノ酸を下線で示し、MS-MS解析によって同定されたアミノ酸を太字で示す。5kDaフラグメントの前駆体配列は、21個のアミノ酸のN末端シグナルペプチドを含み、10kDaフラグメントの前駆体配列は、18個のアミノ酸のN末端シグナルペプチドを含む。特筆すべきことに、シグナルP(signalP)(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)を用いた前駆体配列のシグナルペプチド予想から、5kDaおよび10kDa鎖の両方について実験的に得られた配列と同じ成熟配列が得られた。

20

【0049】

図4Dに記載のSDS-PAGE解析は、非還元条件下において、5および10kDaのアミノ酸鎖は1個またはそれより多くのジスルフィド架橋と一緒に保持されており、それによりヘテロ二量体タンパク質が形成されることを示す証拠となる。従って、この解析は、配列番号4をコードする遺伝子を、これまで知られていなかったヘテロ二量体のセクレトグロビンタンパク質と共に構成する配列番号5をコードする異なる遺伝子と結びつけるものである。

30

【0050】

実施例5：免疫ブロット解析を用いたEuc15kへのIgE結合の評価

IgEのタンパク質への反応性がEuc15kのどのサブユニットに対するものなのかを決定するために、還元および非還元条件の両方を用いた免疫ブロット解析を行った。

【0051】

4~20%NuPAGEゲル(インビトロジェン)を用いたSDS-PAGEによって分離した精製Euc15kの還元および非還元サンプルで免疫ブロット解析を行い、ハイボンド(Hybond)ECLニトロセルロースメンブレン(GEヘルスケアライフサイエンス)にエレクトロブロッティングした。ブロッキング緩衝液(50mMリン酸塩(pH7.4)、0.1%(体積/体積)トゥイーン(Tween™)20、0.9%(質量/体積)NaCl、0.3%(質量/体積)デキストランT10)を用いてタンパク質ブロットを室温で1時間ブロッキングし、それぞれブロッキング緩衝液で1:4.8および1:13.5に希釈した患者3および12の血清と共に一晚インキュベートした。0.5%(体積/体積)トゥイーン-20を含む0.15MのNaCl溶液で洗浄した後に、メンブレンをブロッキング緩衝液中でHRPで標識した抗ヒトIgE抗体と共に3時間インキュベートし、洗浄した後、結合したIgEを、ECLアドバンス(ECL Advance)ウェスタンブロットティング検出キット(GEヘルスケアライフサイエンス)およびLAS400

40

50

0 ミニ CCD カメラ (フジフィルム (Fujifilm) , 日本国東京) を用いて蛍光分析によって検出した。

【0052】

イムノCAPTM 解析によれば、解析 (患者番号3および12) で用いられた2種の血清はいずれも E q u c 1 5 k に対して優勢な反応性を示した (以下の実施例7を参照)。いずれの血清も、還元型 5 k D a および 1 0 k D a サブユニットに相当する弱いバンドとして観察された、還元条件下で解離した E q u c 1 5 k のサブユニットとは、弱い反応しか示さなかった (図6)。E q u c 1 5 k の非還元型 1 5 k D a バンドに相当するバンドとは、非還元条件下でそれよりかなり強い反応性が観察された。この解析において、他のバンドに対して有意な反応性は観察されなかった。この免疫プロット解析から、I g E 結合反応性は、実際には、E q u c 1 5 k 標品の主要なタンパク質バンドに向けられることが実証された。

10

【0053】

実施例6：組換え E q u c 1 5 k の生産および免疫学的な特徴付け

組換え E q u c 1 5 k のクローニングおよび精製

5 k D a および 1 0 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と、(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) を3回含むリンカーペプチドをコードする配列とを組み合わせることによって E q u c 1 5 k 一本鎖の合成遺伝子を設計した。この合成遺伝子全長を、固定した金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (I M A C) によるタンパク質精製ができるように C 末端にヘキサヒスチジンタグを添加したペクター p E T 2 3 a (+) (ノバジェン (N o v a g e n) , 米国ウィスコンシン州マディソン) の N d e I および X h o I 部位にクローニングした。

20

【0054】

配列番号8に、組換えタンパク質全体のアミノ酸配列を示す。大腸菌 (E . c o l i) (D N A 2 . 0 , 米国カリフォルニア州メンローパーク) において最適なコドンを使用するために、ヌクレオチド配列を設計した。配列番号9に、組換えタンパク質全体をコードする核酸配列を示す。

【0055】

大腸菌株 B L 2 1 - A I (インピトロジェン) にプラスミド D N A コンストラクトを形質転換し、3リットルのバイオリアクター (ベラーチ・バイオテクニク (Belach Biotechnology) , スウェーデン国ソルナ) を用いて組換え E q u c 1 5 k 一本鎖タンパク質を生産した。

30

【0056】

組換え E q u c 1 5 k を精製するために、回収した細胞を 2 0 m M のトリス - H C l (p H 8 . 0) 中に再懸濁し、懸濁液をエマルシフレックス (Emulsiflex) C 5 ホモジナイザー (アベスチン (Avestin) , カナダ国オンタリオ州オタワ) に 1 0 0 0 0 ~ 1 5 0 0 0 k P a で通過させて溶解させた。懸濁液を遠心分離した後、ペレット化した封入体を 6 M 塩酸グアニジン、2 0 m M トリス (p H 8 . 0) 、0 . 5 M の N a C l 、5 m M のイミダゾールに溶解させ、0 . 4 5 μ m の混合型のセルロースフィルター (ミリポア) を通過させてろ過した。ろ過した上清を N i S O ₄ を充填したキレート化セファロース F F カラム (G E ヘルスケアライフサイエンス) に入れた。6 M 尿素を含む 2 0 m M のトリス - H C l (p H 8 . 0) 、0 . 1 5 M の N a C l 、2 0 m M のイミダゾールを用いてカラムを洗浄し、続いて同じ緩衝液中の 6 M ~ 2 M 尿素の直線的な濃度勾配でその場で復元した。復元させた後、同じ緩衝液中の 2 0 ~ 5 0 0 m M のイミダゾールの直線的な濃度勾配によって組換えタンパク質を溶出させた。QセファロースTM F F カラム (G E ヘルスケアライフサイエンス) を用いた 2 0 m M のトリス - H C l (p H 8 . 0) での A I E C によってさらなる組換えタンパク質の精製を行った。0 ~ 0 . 5 M の N a C l の直線的な濃度勾配を用いてタンパク質を溶出させ、S D S - P A G E の結果に従って分画をプールした。2 8 0 n m における吸光度から 1 m g / m L あたり 0 . 4 4 の吸光係数により計算して最終的な調製物のタンパク質濃度を決定した。

40

50

【 0 0 5 7 】

組換え E q u c 1 5 k への I g E 結合の評価

組換え E q u c 1 5 k を実験用イムノCAPTMに固定し、説明されている通りに、36人のウマ鱗屑に感作された被験者の血清に対する I g E の反応性を決定した (Marknell DeWitt et al. 2002)。

【 0 0 5 8 】

精製した天然 E q u c 1 5 k への I g E 結合と組換え E q u c 1 5 k への I g E 結合との間に優れた一致がみられたことから ($r = 0.98$) (図7)、組換えタンパク質は免疫学的に活性であり、天然型タンパク質に構造的に類似していることが実証される。これらのデータから、同定されたゲノム配列情報から予測された E q u c 1 5 k の 5 k D a (配列番号4) および 10 k D a (配列番号5) フラグメントのアミノ酸配列は正しく、精製したウマ鱗屑アレルゲン E q u c 1 5 k のアミノ酸配列を示すという強い証拠が示される。

10

【 0 0 5 9 】

実施例7：ウマアレルギー患者の同齡集団における n E q u c 1、n E q u c 2、n E q u c 3、n E q u c 4 / 5 および E q u c 1 5 k への I g E 結合活性の評価

この研究には、スペイン ($n = 20$) およびスウェーデン ($n = 5$) からの25人のウマアレルギーの被験者の血清が用いられた。全ての患者は、喘息、鼻結膜炎およびじんましんなどの症状、ならびにウマ鱗屑抽出物に対する皮膚プリックテスト陽性を有するウマアレルギーという医者の診断を受けていた。サンプルおよびデータが寄託されているバイオバンクに寄与する各センターにおける地域倫理委員会の承認の元に、全てのサンプルおよび臨床データを回収した。

20

【 0 0 6 0 】

イムノCAPTMを用いて、25人のウマアレルギーの被験者における、ウマ鱗屑抽出物、n E q u c 1、n E q u c 2、n E q u c 3 および n E q u c 4 / 5 および r E q u c 1 5 k に特異的な I g E 抗体のレベルを決定した (図8, 表3)。表3に、全てのイムノCAPTMレベルを k U A / L で示し、各患者の出身国は E S (スペイン) または S E (スウェーデン) のように表示した。ウマに曝露された際に記録されたアレルギー症状は、鼻炎 (r h i n)、喘息 (a s t m)、じんましん (u r t) またはアナフィラキシー (a n a p h) である。

30

【 0 0 6 1 】

試験した25人の血清のなかでも、12人 (48%) が r E q u c 1 5 k に対して、16人 (64%) が n E q u c 2 に対して、19人 (76%) が n E q u c 1 に対して 0.35 k U A / L 以上の I g E 反応を示した。n E q u c 3 および n E q u c 4 / 5 はいずれも、調査した被験者のなかでも、調査された血清のそれぞれわずか5人 (20%) および7人 (28%) しか I g E 抗体との結合を示さなかったことから、主要ではないアレルゲンである。25人の血清 (16%) のうち4種が、もっぱら E q u c 1 5 k のみと反応した。全ての E q u c 1 5 k 反応性を示す血清を平均すると、E q u c 1 5 k に対する I g E 抗体の濃度は、ウマ鱗屑に対する I g E 抗体の濃度の 37% になった。それに相当する n E q u c 1 に対する I g E 抗体の相対濃度は、これらのアレルゲンに特異的な反応性を示す血清において 52% であり、それに対して n E q u c 2、n E q u c 3 および n E q u c 4 / 5 については、相対濃度はそれぞれ 35%、69% および 9% であった。25人の血清中 24 種がウマ鱗屑抽出物に対する I g E 抗体結合を示した。これら血清はいずれも、試験された5種それぞれのウマアレルゲンのうち少なくとも1種への結合を示した。個々の構成要素に対する I g E 結合レベルの合計は、ウマ鱗屑抽出物に対する I g E 結合レベルと一致するか、または、それよりも高かった。

40

【 0 0 6 2 】

実施例8：E q u c 1 5 k、および、ネコ由来のセクレトグロビン、主要なネコアレルゲン F e l d 1 への個別の感作

E q u c 1 5 k はセクレトグロビンタンパク質ファミリーに属することから、同じタン

50

パク質ファミリーに属する主要なネコアレルゲンである F e l d 1 との免疫学的な関係を調査した。36 人のウマ鱗屑に感作された被験者（実施例 7 で説明した 25 人のウマアレルギー患者を含む）の血清における F e l d 1 に対する I g E 結合のレベルを評価した。組換え E q u c 1 5 に対する I g E レベルと r F e l d 1 に対する I g E レベルとの間に有意な相関（ $r = 0.36$ ）は観察されず（図 9）、これは、E q u c 1 5 k に対する I g E 抗体反応は、主として E q u c 1 5 k および F e l d 1 間の交差反応性の結果によるものではない（逆もまた同様）ことを示唆している。

【0063】

E q u c 1 5 k と F e l d 1 との交差反応性の可能性をさらに調査するために、F e l d 1 と E q u c 1 5 k の両方に対して有意な I g E 抗体結合反応性を示す 8 人の血清を、固相上の r E q u c 1 5 k および r F e l d 1 の両方、阻害剤として最終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の加えて n E q u c 1 5 k および r F e l d 1 を用いて交差阻害に関して試験した（図 10）。阻害コントロールとして、I g E 希釈剤（ファディア）を用いた。二連での各阻害の測定値の平均を計算し、阻害の比率を、各阻害剤で抑制することができる希釈阻害剤を用いた結合の比率として計算した。これらの選択した血清において、F e l d 1 による阻害は、固相上の F e l d 1 に結合したときだけ達成が可能であった。同様に、E q u c 1 5 k を用いた阻害は固相上の E q u c 1 5 k においてのみ可能であったが、これは、これらの被験者において、これらの分子に対する感作は互いに独立して起こっており、交差反応性の結果ではないことを示す。しかしながら、これら 2 種のタンパク質間に弱い交差反応性の存在を完全に除外することはできない。

【0064】

10

20

【 表 1 】

番号	ウマ鱗屑	nEqu c 1 A	nEqu c 4/5	nEqu c 2	構成要素全部	構成要素の比率 (%)
A1	44,25	4,39	0,18	0,63	5,21	12%
A2	17,08	7,96	0,83	1,40	10,20	60%
A3	136,97	58,75	14,99	30,51	104,24	76%
A4	11,57	1,82	0,14	0,13	2,09	18%
A5	10,43	6,47	0,20	0,54	7,21	69%
A6	12,86	2,34	0,12	4,96	7,42	58%
A7	9,19	5,60	1,15	1,12	7,87	86%
A8	7,26	3,37	0,17	2,07	5,60	77%
A9	11,34	4,69	1,11	1,90	7,70	68%
A10	33,75	3,65	0,26	20,01	23,92	71%
A11	7,39	1,09	5,34	0,85	7,28	99%
A12	42,79	26,87	1,06	6,34	34,27	80%
A13	0,45	0,06	0,07	0,26	0,39	87%
A14	36,70	13,32	4,25	9,41	26,98	74%
A15	16,94	3,73	0,11	2,78	6,63	39%
A16	1,01	3,05	0,07	0,10	3,22	319%
A17	4,97	1,36	0,42	2,03	3,81	77%
A18	13,40	6,10	0,15	0,91	7,16	53%
A19	7,14	2,36	0,08	0,10	2,54	36%
A20	5,20	0,24	0,50	0,20	0,94	18%
A21	32,75	16,16	0,24	0,87	17,27	53%
A22	13,46	3,49	0,15	0,74	4,38	33%
A23	15,28	5,09	0,16	4,30	9,55	62%
A24	198,77	130,15	94,19	87,00	311,33	157%
A25	42,70	11,66	7,05	13,30	32,01	75%
A26	6,55	3,23	0,36	1,77	5,36	82%
A27	27,61	8,55	0,24	5,86	14,65	53%
A28	8,43	4,85	0,14	0,13	5,11	61%
A29	27,12	12,81	0,67	3,29	16,77	62%

【 0 0 6 5 】

10

20

30

【表 2】

番号	分画A	分画B	分画C	ウマ鱗屑	構成要素全部
A1	0,16	3,54	17,82	44,25	5,21
A4	0,10	1,28	1,09	11,57	2,09
A6	0,00	4,94	6,80	12,86	7,42
A15	0,25	2,64	3,73	16,94	6,63
A18	0,06	4,01	6,06	13,40	7,16
A19	0,05	1,08	1,97	7,14	2,54
A20	0,00	1,93	1,67	5,20	0,94
A21	0,09	21,23	25,99	32,75	17,27
A22	0,05	8,45	11,75	13,46	4,38
A27	0,50	14,11	15,39	27,61	14,65

10

【 0 0 6 6 】

【表 3】

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

20

30

【 0 0 6 7 】

40

配列表

【 0 0 6 8 】

【表 4】

SEQUENCE LISTING

<u>SEQ ID NO: 1</u>	
5	ATCPAVATDIASFFLLPDSL
<u>SEQ ID NO: 2</u>	
	GSGCQLLEDVVEKTITAEIS
10	<u>SEQ ID NO: 3</u>
	QCINEISAGDRYIITETLGK
<u>SEQ ID NO: 4</u>	
15	ATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKLQLIKQAPPEAKDATMQVKQCINEIS
	AGDRYIITETLGKIVLQCGA
<u>SEQ ID NO: 5</u>	
20	GSGCQLLEDVVEKTITAEISPAEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQLKQCYLKQSNETLNDFRMT
	MNSMYNSAYCALF
<u>SEQ ID NO: 6</u>	
	MRLFLPVLLVTLALCCETNAATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKLQLIKQAPPEAKDATMQV
	KQCINEISAGDRYIITETLGKIVLQCGA
25	<u>SEQ ID NO: 7</u>
	MKLVTVLMMLVAFPLYCYAGSGCQLLEDVVEKTITAEISPAEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQL
	KQCYLKQSNETLNDFRMTMMNSMYNSAYCALF
<u>SEQ ID NO: 8</u>	
30	MATCPAVATD IASFFLLPDS LFKLQLIKQ APPEAKDATM QVKQCINEIS 50
	AGDRYIITET LGKIVLQCGA GGGGSGGGGS GGGGSGSGCQ LLEDVVEKTI 100
	TAEISPAEYV EAVQEFIPDE ATEKAAIQLK QCYLKQSNET LNDFRMTMNS 150
	MYNSAYCALF LEHHHHHH 168
35	<u>SEQ ID NO: 9</u>
	ATGGCCACGTGCCCTGCAGTCGCTACGGACATCGCATCGTTCTTCTTGCTGCC
	GGACAGCCTGTTTAAGCTGCAACTGATCAAATATCAGGCTCCGCCGGAGGCCAAAGACGC

【 0 0 6 9 】

【表 5】

GACCATGCAGGTTAAGCAGTGCATCAACGAGATTAGCGCGGGTGATCGCTATATCATTAC
 CGAAACCCTGGGCAAGATTGTGTTGCAGTGCGGTGCCGGTGGCGGTGGTTCCGGCGGTGG
 CGGCAGCGGTGGTGGTGGCAGCGGTAGCGGCTGTCAACTGCTGGAAGATGTTGTGGAGAA
 AACGATTACCGCGGAGCTGAGCCCGGCTGAATATGTCGAGGCGGTTTCAGGAGTTTATTC
 5 GGACGAGGCAACTGAAAAAGCAGCGATCCAAGCAGTGTTACCTGAAACAAAGCAA
 CGAAACCTTGAACGATTTTCGTACCATGATGAATAGCATGTACAATTCTGCGTACTGTGC
 GCTGTTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC

10

10

【 0 0 7 0 】

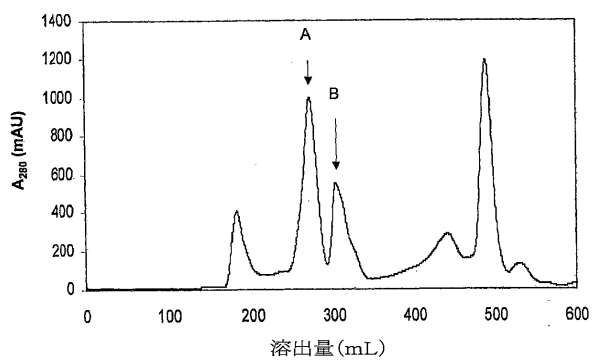
参考文献

- 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.
- 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. 20
- Cabanas, R., M. C. Lopez-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.
- Cromwell, O., H. Fiebig, et al. (2006). "Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies." Immunol Allergy Clin North Am26(2): 261-281, vii.
- Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.C1, the Horse Major Allergen." Journal of Chromatography-Biomedical Applications 621(1): 23-31. 30
- Demoly, P., B. Lebel, et al. (2003). "Allergen-induced mediator release tests." Allergy58(7): 553-558.
- Ebo, D. G., M. M. Hagendorens, et al. (2004). "In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? [Review]." Clinical & Experimental Allergy 34(3): 332-339.
- 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. 40
- 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. Saarne, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." Int Arch Allergy Immunol 151(4): 265-274. 50

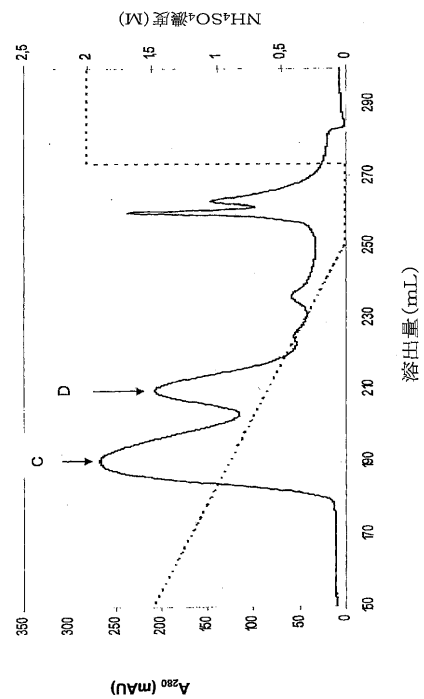
- Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." FASEB Journal 16(3): 414-416.
- Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." J Allergy Clin Immunol 116(3): 608-613.
- 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.
- Klug, J., H. M. Beier, et al. (2000). "Uteroglobulin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report." Ann N Y Acad Sci 923: 348-354.
- 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, A., 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.
- Mattsson, L., T. Lundgren, et al. (2009). "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen." J Allergy Clin Immunol 123(2): 362-368.
- McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." PLoS One 4(5): e5726.
- 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.
- Saarne, 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. Westritschnig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria 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.
- 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.
- Valenta, R., T. Twaroch, et al. (2007). "Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area." J Investig Allergol Clin Immunol 17 Suppl 1: 36-40.
- van Eijk, H. M., D. R. Rooyakkers, et al. (1999). "Automated isolation of high-

purity plasma albumin for isotope ratio measurements." Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications 731(2): 199-205.

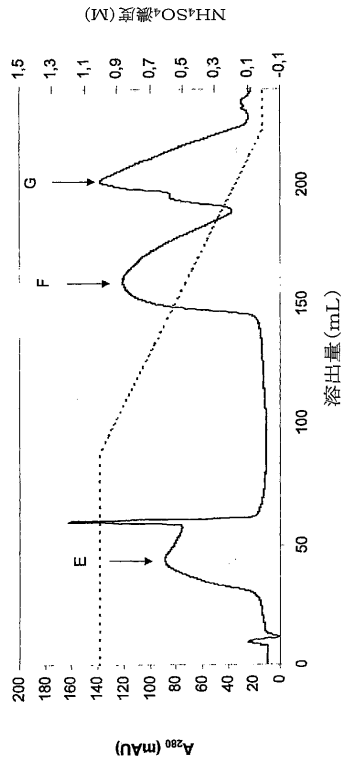
【図 1 A】



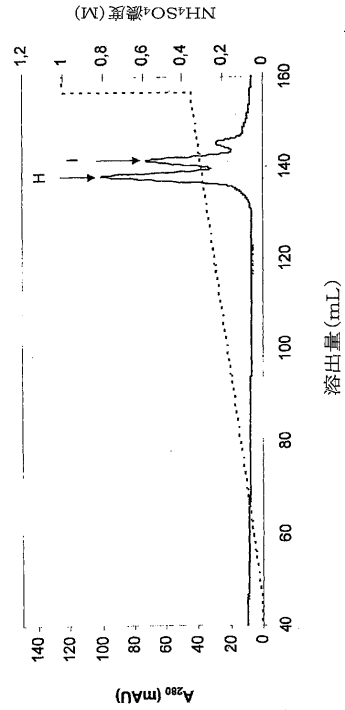
【図 1 B】



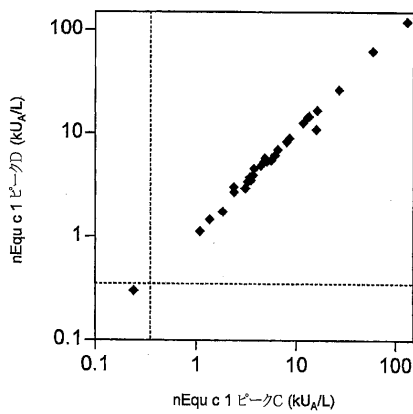
【図 1 C】



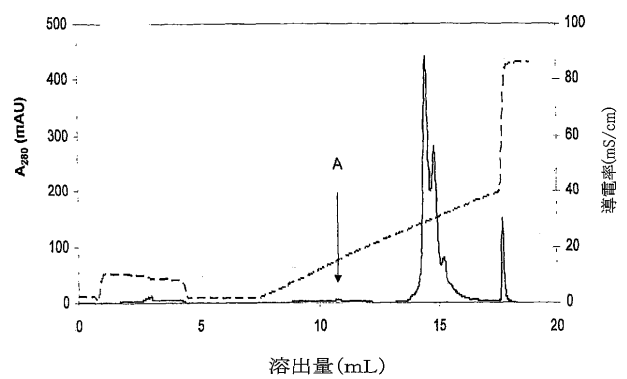
【図 1 D】



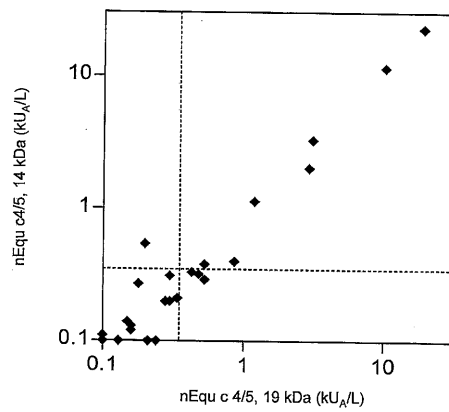
【図 2 A】



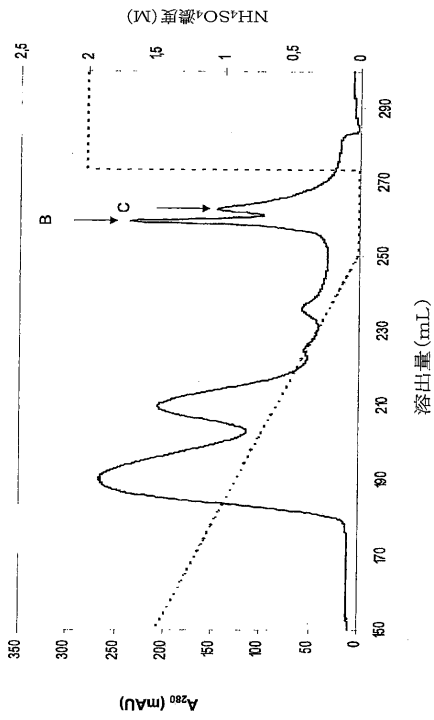
【図 3 A】



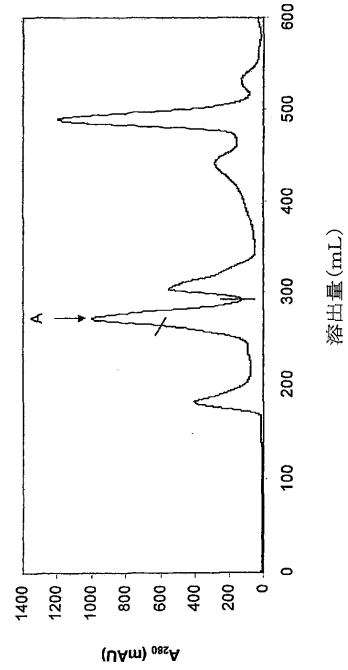
【図 2 B】



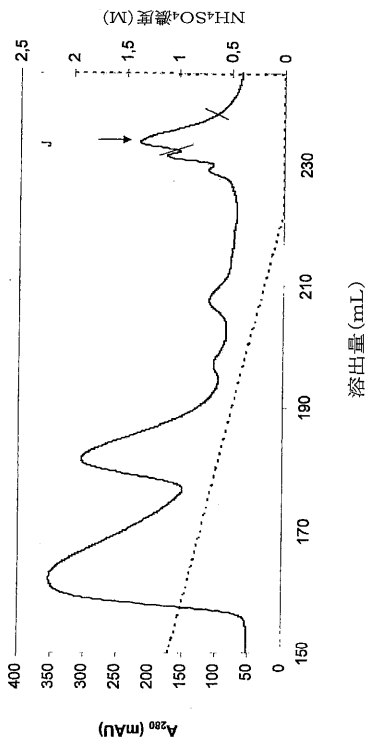
【図 3 B】



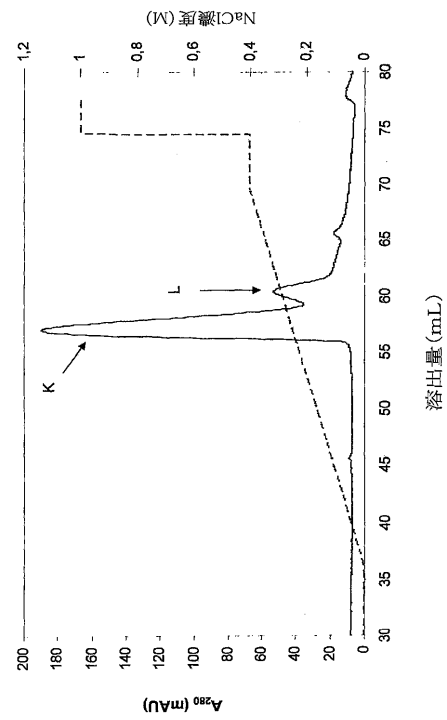
【図 4 A】



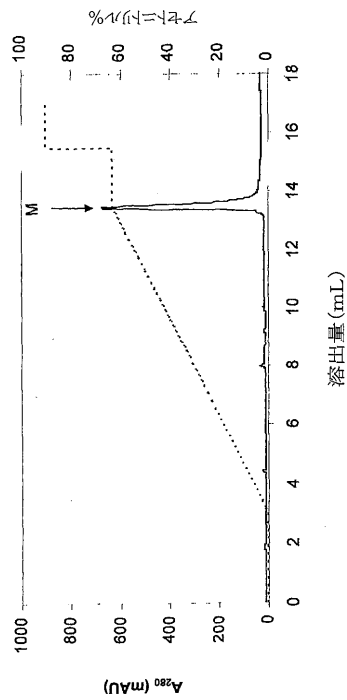
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 E】



【図 5】

Equ c 15k - 5 kDa フラグメント

予測の全長前駆配列:

MRLFLPVLVLTALCCCEETNAATCPAVATDIASTFLLPDSL FKLQLIKYQAPPEAKDA

TMQVKQCINEISAGDRYITETLGGKIVLQCGA

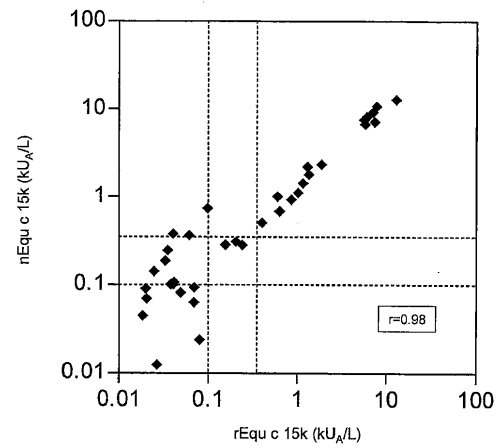
Equ c 15k - 10 kDa フラグメント

予測の全長前駆配列:

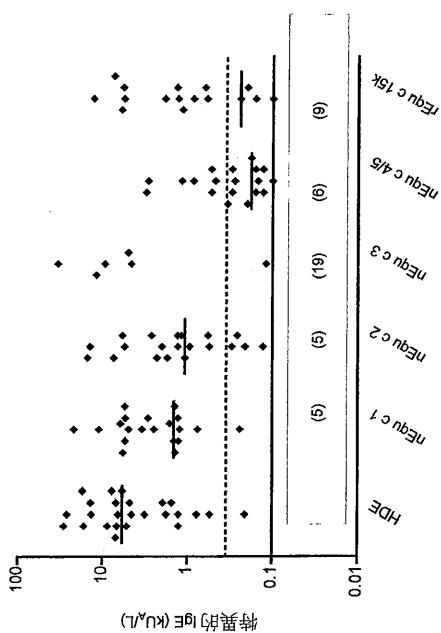
MKLVTIVMLVAFFPLYCYAGSGCQLLEDVVEKTITAELESPA EYVEAVQEFIPDEATEK

AAIQLKQCYLKQSNETLNDFRMTMNSMYNSAYCALF

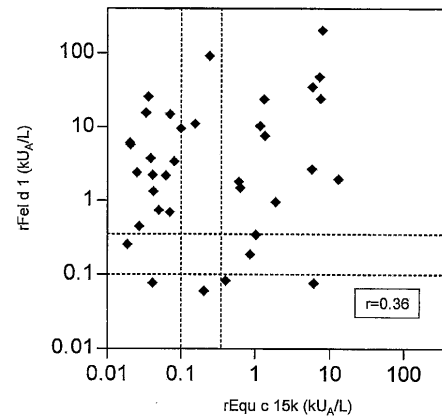
【図 7】



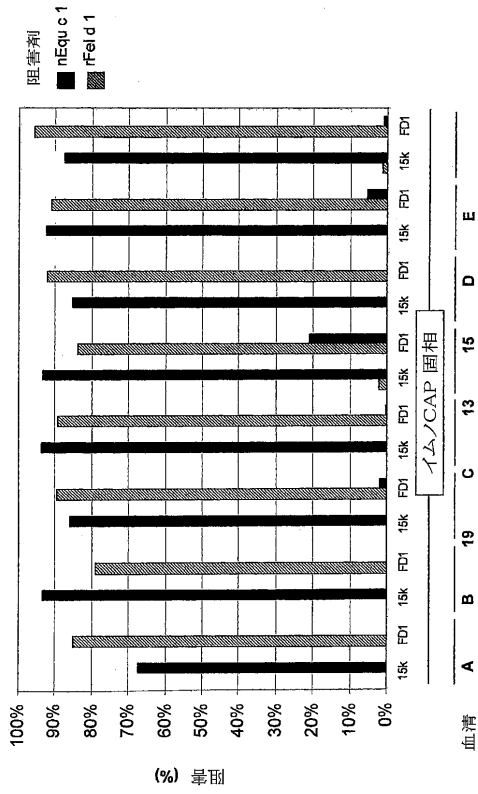
【図 8】



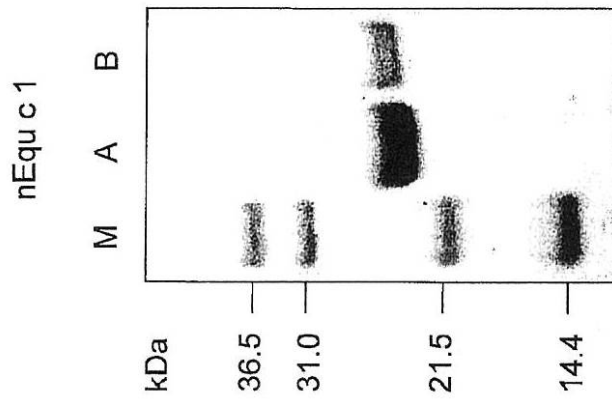
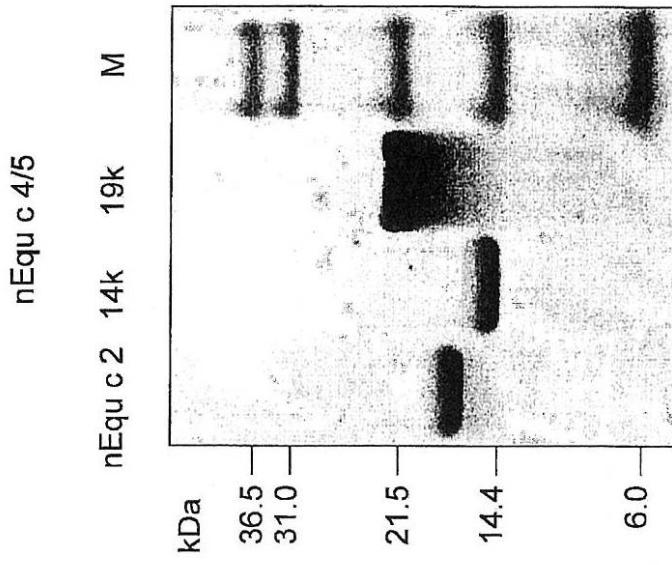
【図 9】



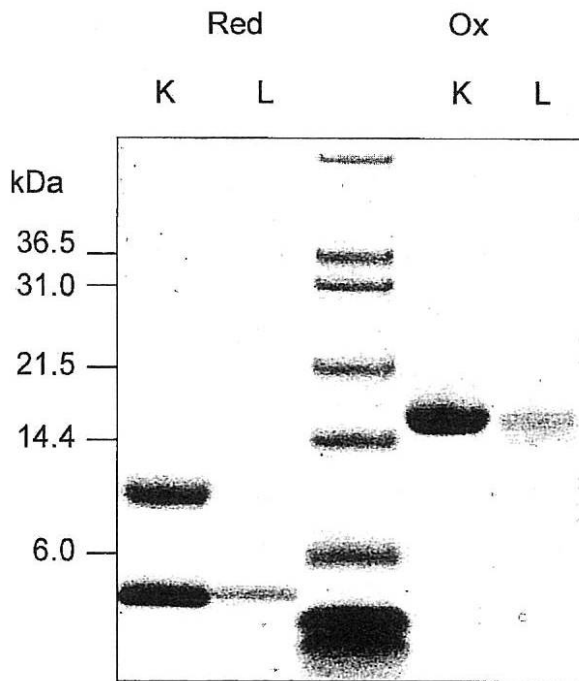
【図 10】



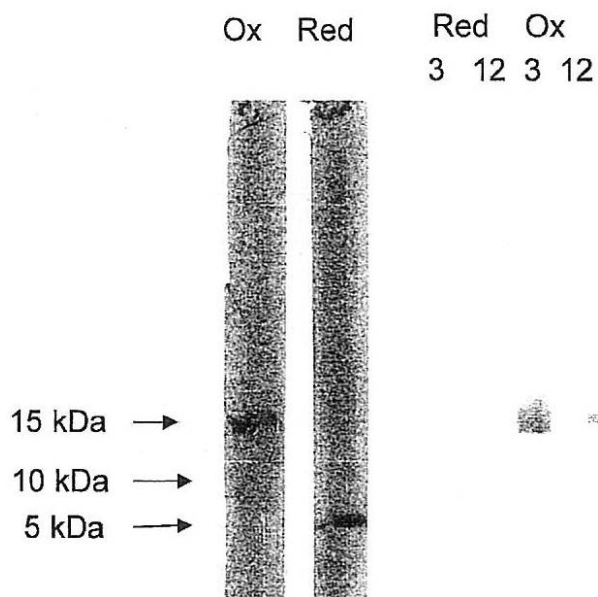
【図 1 E】



【 図 4 D 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2013528364000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/050503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
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)		
IPC: A61K, A61P, C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EBI (sekvenssök)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kumar, F. 'Allergens of horse dander: Comparison among breeds and individual animals by immunoblotting' In: J Allergy Clin Immunol, 1996, Vol. 98, pp. 169-71; abstract; see page 169, left column, third paragraph; page 169, right column, last paragraph; page 170, right column, second paragraph	1-20
Y	--	15, 17-20
X	Fjeldsgaard B.E. 'Comparison of IgE-binding antigens in horse dander and a mixture of horse hair and skin scrapings' In: Allergy, 1993, Vol. 48, pp. 535-541; abstract; see page 537, right column, paragraphs 2-3; table 2 and the abstract	1-20
Y	--	15, 17-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 02-07-2011		Date of mailing of the international search report 19-07-2011
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 668 02 86		Authorized officer Carolina Palmcrantz Telephone No. + 46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/050503

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 19 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy, see PCT rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been made for this claim. The search has been directed to the technical content of the claim.
2. ☒ Claims Nos.: 1-20 (partly)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Present claims 1-20 relate, in respect of the wording "variants thereof sharing .../...
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050503
--

Continuation of: Box No. II

epitopes for antibodies therewith", to variants defined by reference to a desirable characteristic or property. The claims cover all variants having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any such variants. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the variants by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed. These are the characteristics of the allergen which has been isolated in the application, i.e. the molecular weight, that it is a secretoglobulin and the sequences given in claims 3-7. The search has also been directed to the isolation/identification of horse allergens in general, but no specific allergens, except for the one which has been isolated in the application, have been searched.

Thence it follows that a reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability only can be established for those parts which have been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/050503

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Valenta R. 'The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)' In: Clinical and Experimental Allergy, 1999, Vol. 29, pp. 896-904; abstract; see page 897, left column, first paragraph and the abstract --	15, 17-20
X	Bulone V. 'Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis Molecular characterisation and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins' In: Eur J Biochem, 1998, Vol. 253, pp. 202-211; abstract; see page 208 "Discussion-page 209, first paragraph --	1-20
X	Bulone V. et al., "Characterisation of horse dander allergen glycoproteins using amino acid and glycan structure analyses", Int Arch Allergy Immunol., 2000, Vol. 123, pp. 220-227; see page 221, left column, last paragraph and page 226, left column, second paragraph --	1-20
A	Gregoire C. 'cDNA Cloning and Sequencing Reveal the Major Horse Allergen Equ c1 to Be a Glycoprotein Member of the Lipocalin Superfamily' In: The Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No. 51, pp. 32951-32959; abstract; see the abstract --	1-20
A	Lidholm J. 'The importance of molecular allergens for in vitro testing: a critical evaluation of component-resolved diagnostics', 2009 (Abstract), Retrieved from: NLM database, PMID 20799456, In: Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frank A M., 2009, Vol. 96, pp. 157-161, discussion 161-163.; abstract --	1-20
A	Virtanen T. et al., "Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic?", Int Arch Allergy Immunol, 1999, Vol. 120, pp. 247-258; see the whole document -- -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/050503

Continuation of: second sheet

International Patent Classification (IPC)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/35 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マットソン, ラルス
 スウェーデン国 7 5 7 5 4 ウプサラ, ゴットランドスレサン 1 4 6

(72) 発明者 リドホルム, ヨナス
 スウェーデン国 7 4 1 4 2 クニヴスタ, ビヨルクナースヴェーイェン 9

(72) 発明者 ルンドグレン, トーマス
 スウェーデン国 7 5 2 6 0 ウプサラ, ステンハグスヴェーイェン 1 0 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA06 EA04 GA11 HA01
 4B064 AG01 AG31 BJ12 CA02 CA19 CC24 CE02 DA01 DA13
 4C085 AA03 BB03 CC04 DD31 DD62 EE01
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA42 DA86 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	新的过敏原		
公开(公告)号	JP2013528364A	公开(公告)日	2013-07-11
申请号	JP2013506115	申请日	2011-04-26
申请(专利权)人(译)	Phadia - Akuchiboragu		
[标]发明人	マツソンラルス リドホルムヨナス ルンドグレントーマス		
发明人	マツソン,ラルス リドホルム,ヨナス ルンドグレン,トーマス		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/00 C07K14/435 G01N33/53 G01N33/531 A61K39/35 A61P37/08		
CPC分类号	A61K39/35 A61K2039/577 C07K14/47 G01N33/6854 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.A C12P21/00.ZNA.C C07K14/435 G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N33/531.A G01N33/53.D A61K39/35 A61P37/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/BB03 4C085/CC04 4C085/DD31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 星野 修 中滨 明子		
优先权	1050406 2010-04-23 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种分离的马过敏原，其是在非还原条件下具有15kDa分子量的分泌蛋白，并且包含分子量为约5kDa的第一肽链和分子量为约10kDa的第二肽链。一起，以及其变体和片段共享抗体的表位。还公开了过敏原在诊断和治疗中的用途以及诊断试剂盒和含有过敏原的药物组合物。

【 0 0 6 6 】
【 表 3 】

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

【 0 0 6 7 】
配列表
【 0 0 6 8 】