

(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 14/435	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/435		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		A 6 1 K 39/395	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2000－40886(P2000－40886)	(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
(22)出願日	平成12年2月18日(2000.2.18)	(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
		(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（プロリン変異体）及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】本発明は、例えばアレルゲン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アレルゲンに変異を導入した変異アレルゲン、およびそれらをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】ヒョウヒダニ（Dermatophagoides属）のグループ2アレルゲンの、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の変異のいずれかによってアレルゲン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5または6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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の変異のいずれかを導入した配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項2】配列表の配列番号5または6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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基をアラニ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5のコナヒョウヒダニ (Dermatophagoidesfarinae) 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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の変異のいずれかを導入した配列を有し、アレルギー活性を低減している変異体。

【請求項4】配列表の配列番号5のコナヒョウヒダニ (Dermatophagoidesfarinae) 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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基をアラニ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5のコナヒョウヒダニ (Dermatophagoidesfarinae) 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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の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5のコナヒョウヒダニ (Dermatophagoidesfarinae) 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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基をアラニ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アミノ酸配列を有する変異体。

【請求項7】請求項1-6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】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請求項1-6のいずれか1項記載の変異体またはその誘導体の製造法。

【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記載の製造法。

【請求項10】請求項1-7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1-6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および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、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の変異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。時間をおい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を投与されており、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・アレルギー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、最も重要なアレルギーである。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アレルギー (Der f 1およびDer p 1) およびグループ2アレルギー (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ギー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(Der f 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リコンビナント・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: Hakkkaart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においてターゲットとなつて

いないエピトープを破壊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においてターゲットとなっていないエピトープを破壊した新規な変異体、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】一般にプロリン残基は相同性のあるタンパク質分子間でシステイン残基に次いでよく保存されていることが知られている。プロリン残基はその分子構造上、ペプチド結合主鎖の周りの自由な回転が制限されているので、タンパク質の安定化などに寄与している場合がある。しかし、この点に着目したグループ2アレルゲン変異体の作製は行われていない。

【0011】このような状況下において、本発明者らはプロリン残基を他のアミノ酸に置換した変異体では変異導入部位周辺のエピトープ構造が不安定化されIgE結合能が低下するのではないかと考え、この二つの戦略により本発明に着手した。

【0012】本発明者らは、Dermatophagoides farinaeのグループ2アレルゲンの、34位、95位、99位または66位のプロリン残基の変異のいずれか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5及び6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。34位、95位、99位または66位、のプロリン残基に変異を導入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アレルゲンの変異体とは、配列表の配列番号5及び6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アレルゲンの34位、95位、99位または66位のプロリン残基に変異を導入した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5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アレルゲンDer f2の、34位、95位、99位または66位のプロリン残基に変異を導入した変異体、あるいは配列表の配列番号1-4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・化学物質などの融合化、等の修飾を、遺伝子工学的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】本発明の治療薬用、予防薬用または検査薬用組成物は、上記の変異体含有し、アレルギーの治療薬、予防薬、検査薬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】本発明の変異体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用または予防薬用組成物は、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。本組成物をヒトまたは哺乳類に投与方法としては、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P34Aのアミノ酸配列。34番目のプロリン残基がアラニン残基に置換されている。

配列番号2: Der f 2 clone 11の変異体P95Aのアミノ酸配列。95番目のプロリン残基がアラニン残基に置換されている。

配列番号3: Der f 2 clone 11の変異体P99Aのアミノ酸配列。99番目のプロリン残基がアラニン残基に置換されている。

配列番号4: Der f 2 clone 11の変異体P66Aのアミノ酸配列。66番目のプロリン残基がアラニン残基に置換されている。

配列番号5: Der f 2 のアミノ酸配列のアミノ酸配列。40 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6: Der p 2のアミノ酸配列のアミノ酸配列。代表的なものとしてChuaらがクローニングしたクローン配列を示した。

【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 50

ルゲン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、などにより行うことができる。市販キットを利用した、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

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。

【0022】また、変異体はそれぞれの宿主細胞に適当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、クリーム剤、あるいは担体粒子などのいずれかが選ばれる。

【0025】

【実施例】以下、実施例で本発明を説明する。実施例にはDer f 2 のクローン clone 11 (配列番号5) を用いた変異体の製造例を記載したが、Der f 2 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5に代表されるクローンを用いて変異体を製造でき、同様の効果が期待できる。

【0026】実施例1 Der f 2の変異体の発現プラスミドの構築

Pro残基をAla残基に置換した変異体の発現ベクターはQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社) を用いて、FLT11 (Nishiyamaら、1994年、Int. Arch. Allergy Immunol., 105 巻、62-69頁) を鋳型として作製した。34,66, 95, 99番目のPro残基に変異を導入した変異Der f 2 (それぞれ P34A, P66A, P95A, P99A) (図1) の発現ベクターを作製した。これらを pFLT11-P34A, pFLT11-P66A, pFLT11-P95A, pFLT11-P99A と命名した。

【0027】実施例2 Der f 2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。50 µg/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°C一晩培養した。生じた新鮮なコロニーを50 µg/ml のアンピシリンを含むLB培地に植菌し、30°C一晩振とう培養した。この培養液を50-100倍の容積の50 µg/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°C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°C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 f 2 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。

【0028】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)。

【0029】実施例3 ウエスタンブロッティングによるDer f 2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キング、洗浄、化学発光反応にBM Chemiluminescence B lotting 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。

【0030】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)。Pro変異体についてはP34A, P95A, P99Aで全ての患者血清で低反応性を示した。P34A, P95A, P99Aに及ばないものの、P66Aでも低反応性が確認された。

【0031】実施例4 RAST-EIA法によるDer f 2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50 µl, Cys変異体のIgE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500 µl) で1回洗浄し、1Mアミノメタノール(pH9.0) (濾紙1枚当たり250 µl) 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50 µl) と37°C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50 µl) 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200 µl) と遮光下、37°C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250 µl) した後、400 µl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イ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。

【0032】7名の患者血清を用いてPro変異体のRAST-EIAを行った (図4)。全ての患者についてP34A, P95A, P99Aの活性が野生型Der f 2と比較して低下していた。2名の患者ではこれらに加えてP66Aも活性低下がみとめ

られた。

【0033】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 KH_2PO_4 , 5g/L glucose, 0.03% HSA, 1mM CaCl_2 , 0.6mM MgCl_2 ）を加えおだやかに混和し、4°C1200rpm5-10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°C温浴で5分間インキュベイトした。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ずつ添加、混合した。37°C温浴で40分間インキュベイトし、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°Cで*

*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°Cで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。

【0034】プロリン変異体ではP95A, P99Aは野生型Der f 2の1/10程度にヒスタミン遊離活性が低下していた（図5, 6）。抗原濃度0.01μg/mlでのヒスタミン遊離率を比較するとP34Aも野生型Der f 2と比較して遊離率が低下していた。

【0035】

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

【0036】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Breweries, LTD

<120> Engineered house dust mite allergens (proline mutants) and methods

for their preparation

<130>

<160> 6

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Der f 2 mutant, substitution of 34th proline to alanine

<400> 1

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 Ala 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

115 120 125
 Asp
 129

 <210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Der f 2 mutant, substitut
 ion of 95th proline to alanine
 <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 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 Ala 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> 3
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Der f 2 mutant, substitut
 ion of 99th proline to alanine
 <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

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> Artificial sequence
 <220>
 <223> Der f 2 mutant, substitut
 ion of 66th proline to alanine
 <400> 4
 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 Ala 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> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> House dust mite (Dermatop
hagoides farinae)
 <300>
 <301> Yuuki, T., Okumura, Y., An
 do, T., Yamakawa, H., Suko, M., Haida,
 M
 ., and Okudaira, H.

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> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> House dust mite (Dermatop
hagoides pteronyssinus)

<300>

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

. A., and Thomas, W. R.

<302> Isolation of cDNA coding f
 or the major mite allergenDer p II by I
 g

E plaque immunoassay

<303> International archives of
 allergy and applied immunology

<304> 91

<306> 118-123

<307> 1990

<400> 6

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

1

5

10

15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro
 Cys Ile His Arg Gly

12

【図面の簡単な説明】

20

25

【図2】実施例2において、精製された野生型及び変異

【図1】実施例1において、精製された野生型及び変異
 変異型Der f 2タンパク質の概念図である。

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。

35

40

45

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

【図3】実施例3において、野生型Der f 2及びプロリン変異体のヒトIgE結合能をウェスタン・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。

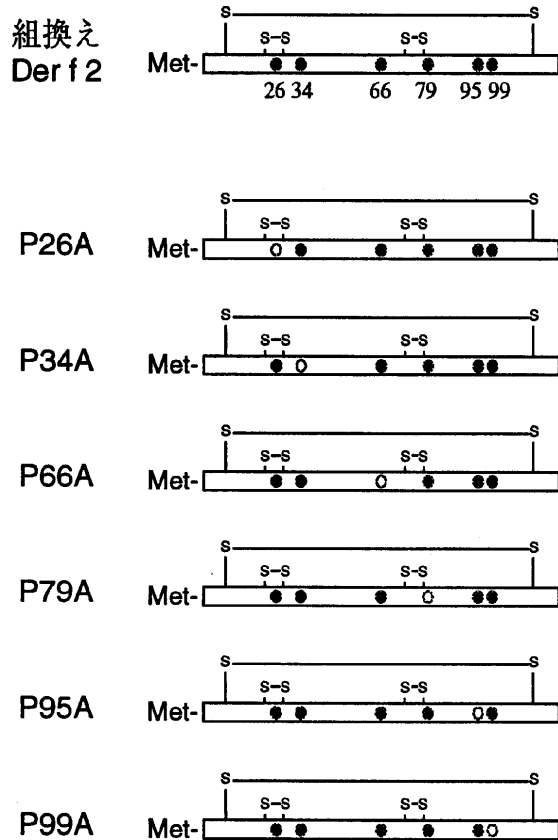
【図4】実施例4において、野生型Der f 2及びプロリン変異体のヒトIgE結合能をRAST-EIA法により比較した結果を示す説明図である。

*

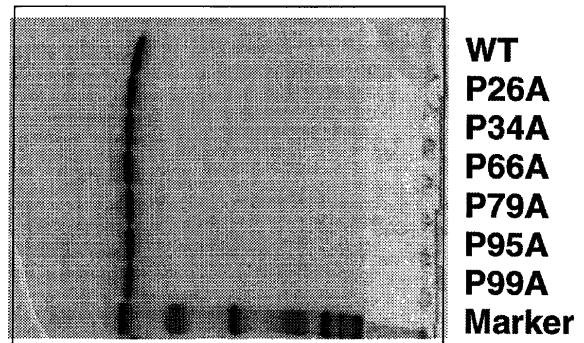
*【図5】実施例5において、野生型Der f 2及びプロリン変異体のヒト末梢血中好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性を比較した結果を示す説明図である。

【図6】同様に実施例5において、野生型Der f 2及びプロリ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。

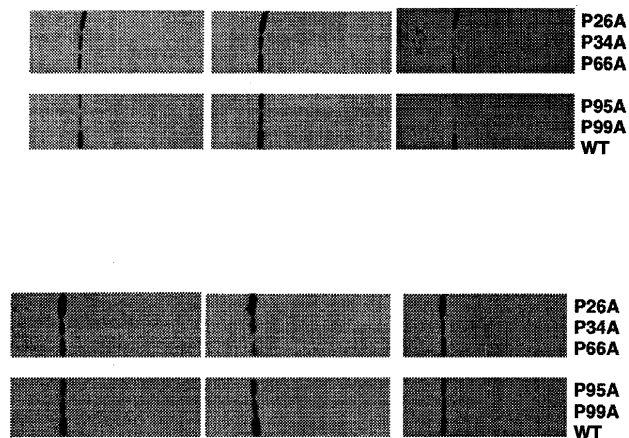
【図1】



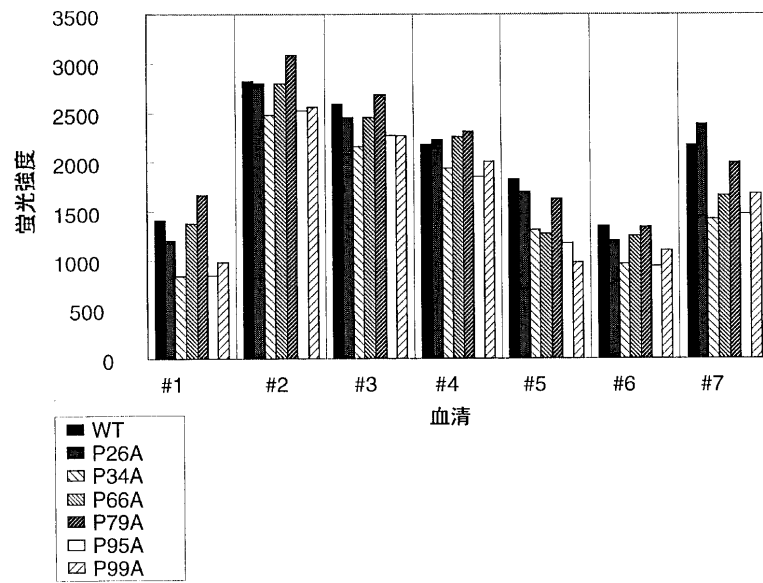
【図2】



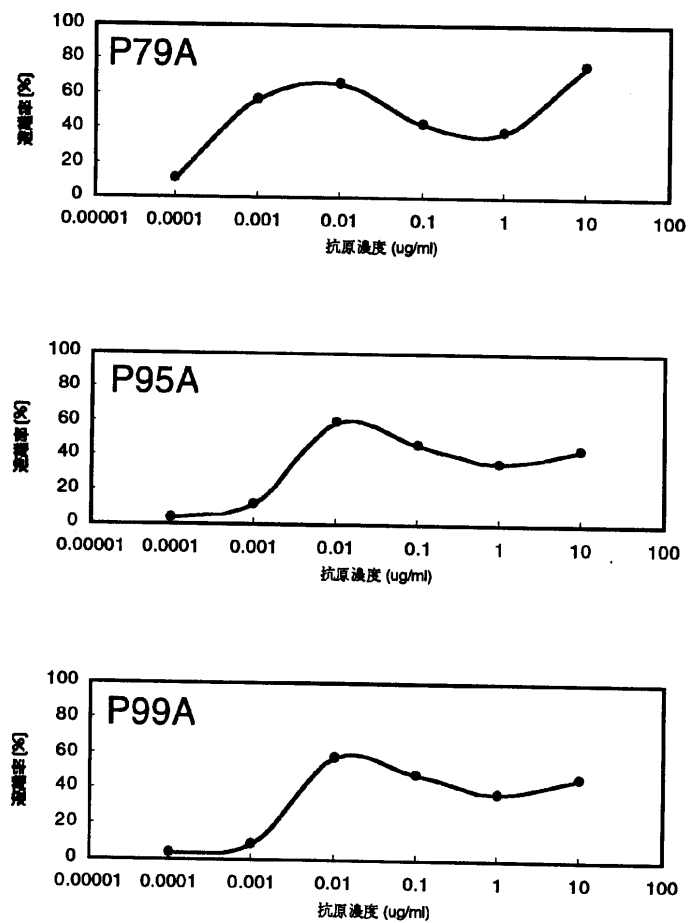
【図3】



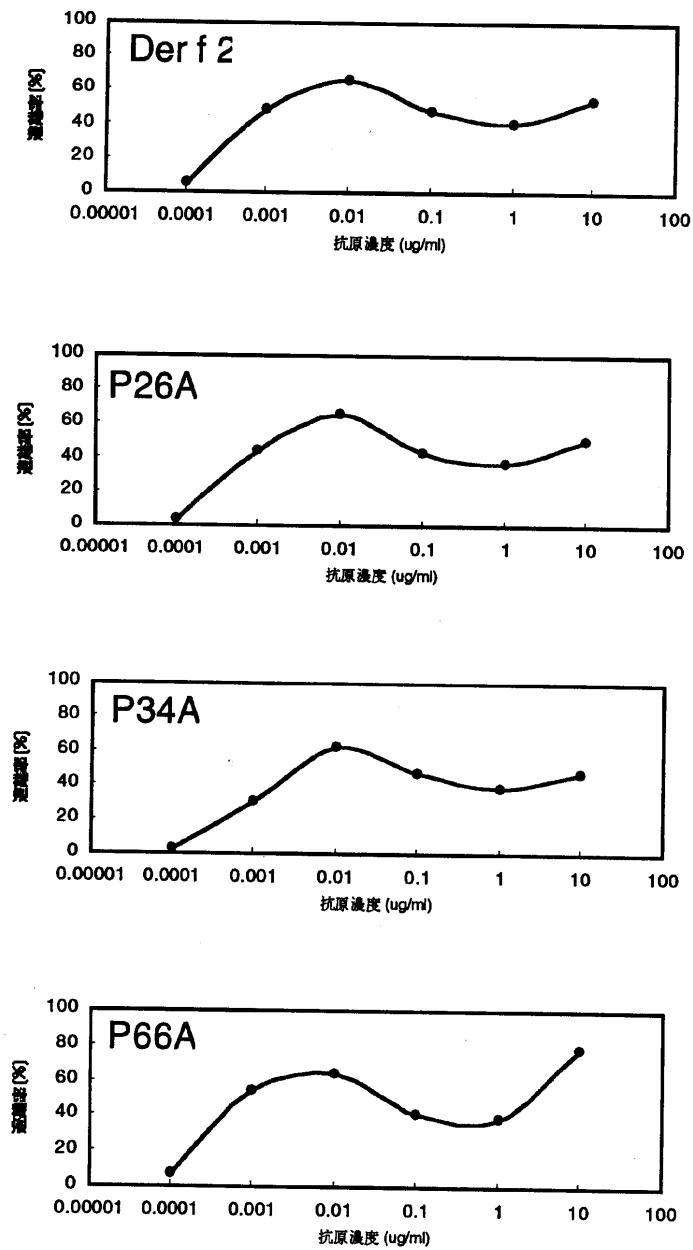
【図4】



【図6】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

// A 6 1 K 39/395

(C 0 7 K 14/435

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

識別記号

F I

A 6 1 K 39/395

(C 0 7 K 14/435

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 N 15/00

テーマコード^{*} (参考)

N

C

Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA06
DA06 EA04 GA11 HA01 HA15
4B064 AG31 CA02 CA19 CC24
4C085 AA02 BB03 CC02 DD62 DD63
EE01
4H045 AA11 BA10 CA51 DA86 EA50
FA74

专利名称(译)	改良螨过敏原（脯氨酸突变体）及其制备方法		
公开(公告)号	JP2001231562A	公开(公告)日	2001-08-28
申请号	JP2000040886	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		
发明人	高井 敏朗		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/35 A61K39/395 C07K14/435 C12P21/02 C12R1/19 G01N33/53		
FI分类号	A61K39/35 C07K14/435 C12P21/02.C G01N33/53.Q A61K39/395.D A61K39/395.N C12R1/19 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/CA06 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4C085/AA02 4C085/BB03 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA51 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供通过修饰属于具有降低的IgE结合活性的粉尘螨属的第2组过敏原而获得的经修饰的过敏原，其预期例如用于过敏原特异性免疫疗法。解决方案：提供了通过修饰属于粉尘螨属的螨的第2组过敏原的第34,95,99或66位脯氨酸残基而具有降低的过敏原活性的变体，产生该变体的方法，以及编码所述变体的基因。

