

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-280210

(P2006-280210A)

(43) 公開日 平成18年10月19日(2006.10.19)

(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 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
C O 7 K 7/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	4 H O 4 5
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 7/08	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-101234 (P2005-101234)	(71) 出願人 504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(22) 出願日 平成17年3月31日 (2005.3.31)	(74) 代理人 110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
特許法第30条第1項適用申請有り 2004年9月30日 日本アレルギー学会事務所発行の「アレルギー第53巻 第8・9号」に発表	(72) 発明者 重田 征子 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院先端物質科学研究科内
	(72) 発明者 大下 昌利 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院先端物質科学研究科内
	(72) 発明者 小笠 和久 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院先端物質科学研究科内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スギ花粉アレルギーの高次構造 I g E エピトープを含むペプチドおよびその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 スギ花粉アレルギーの高次構造 I g E エピトープを含むペプチド、そのペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそのペプチドと結合する抗体を提供すること、並びにそれらを用いてスギ花粉症の治療薬、診断キット等を提供する。

【解決手段】 ペプチド S 9 5 - 1 は、12 アミノ酸からなるペプチド ( T Y S P F H S F T S I P ) であり、抗 Cry j 1 モノクローナル抗体およびスギ花粉症患者血清 I g E 抗体と結合し、かつそのアミノ酸配列が Cry j 1 のアミノ酸配列上に存在しないものである。すなわち当該ペプチドは、スギ花粉アレルギー Cry j 1 の高次構造 I g E エピトープを含むものである。

【選択図】 図7

モノクローナル抗体	ファージ:アミノ酸配列
S95	S95-1: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-2: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-3: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-4: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-5: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-6: HQYQRDHGPGKS (1/10)
	S95-7: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-8: TYSPFHSFTSIP (8/10)
	S95-9: KMHTASLSHPLM (1/10)
	S95-10: TYSPFHSFTSIP (8/10)

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

スギ花粉アレルゲンの高次構造 I g E エピトープを含むペプチド。

## 【請求項 2】

上記スギ花粉アレルゲンが、Cry j 1であることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 3】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合することを特徴とするペプチド。

## 【請求項 4】

配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合することを特徴とするペプチド。

## 【請求項 5】

配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合することを特徴とするペプチド。

## 【請求項 6】

配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合することを特徴とするペプチド。

## 【請求項 7】

配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合することを特徴とするペプチド。

## 【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドと結合することを特徴とする抗体。

## 【請求項 9】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含有する薬学的組成物。

## 【請求項 11】

請求項 8 に記載の抗体を有効成分として含有する薬学的組成物。

## 【請求項 12】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含むことを特徴とするスギ花粉症の診断キット。

## 【請求項 13】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のペプチドと被験者の血清とを反応させる工程を含むことを特徴とするスギ花粉症の診断方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、スギ花粉アレルゲンの高次構造 I g E エピトープを含むペプチド、そのペプチドと結合する抗体、およびそのペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにそれらの代表的利用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

スギ花粉症は、第二次世界大戦後に植林された大量のスギ林から早春に飛散する花粉を吸入することによって起こる即時型アレルギーであり、近年の恒温で気密性に富む居住環境、環境汚染、ストレスの増加などの要因から患者が急増している。特に、働き盛りの成年層の患者が多く存在し、深刻な社会問題となっている。これまでその対策としては、一時的な対症療法からスギ花粉抗原を用いた減感作療法まで各種行なわれてきているが、ホ

10

20

30

40

50

ヤ喘息，ハチ毒アレルギーで得られたような著しい症状の改善例が少ないのが現状である。

【0003】

スギ花粉症は、1964年、堀口、斎藤らによって見いだされ、安枝ら（非特許文献1参照）によってCry j 1が、坂口ら（非特許文献2参照）によってCry j 2が、スギ花粉主要抗原（スギ花粉主要アレルゲン）として同定された。Cry j 1はペクテートリアーゼ活性を示す分子量45,000～50,000、等電点8.5～9の糖タンパク質で、花粉中の含量は採集された地域間変動が少なく、100g当たり27～35mgである。モノクローナル抗体を用いたエピトープ解析の結果から、Cry j 1の免疫グロブリンE（IgE）抗体に対するエピトープ（以下、適宜「IgEエピトープ」という）は、ペプチド部分に少なくとも5ヶ所存在するということが分かっている（非特許文献3参照）。

10

【0004】

かかるIgEエピトープとしては、二つのタイプが存在し、一つはタンパク質のある特定のアミノ酸配列（一次構造）上にあるもの（シーケンシャルエピトープ）であり、もう一つは高次構造上にある高次構造エピトープ（コンフォメーションナルエピトープ）である。アレルゲン分子の一次構造上にあるエピトープ構造（シーケンシャルエピトープ）は、比較的容易に同定することができる。しかしIgE抗体は、そのほとんど天然のアレルゲン分子の高次構造（立体配置）を認識するために、当該高次構造の特定の部位がそのままエピトープとなる場合が多い。すなわちIgEエピトープの大多数が、高次構造エピトープ（コンフォメーションナルエピトープ）であるといっても過言でない。

20

【0005】

高次構造IgEエピトープ（コンフォメーションナルIgEエピトープ）を解析する方法としては、主に二つの方法が知られている。一つはX線による結晶解析であり、もう一つはNMRを用いた解析である。前者のX線解析を用いる方法ではアレルゲンを結晶化する必要がある、高度な結晶化技術と大量のアレルゲン（10mg以上）が必要であるという問題点がある。一方、NMRを用いる方法では、溶液状態で解析可能であるが、アレルゲン中のアミノ酸を点変換して立体配置の変化と活性を測定し、コンフォメーションナルIgEエピトープを同定していく必要がある、そのためには、リコンビナントアレルゲンを天然のアレルゲンと同じ立体構造をもった状態で生産しなければならない。高等生物由来のアレルゲンは、さまざまな修飾を受けているので、天然のアレルゲンと同じ立体構造を備えるリコンビナントアレルゲンを生産することは至難の業である。したがって、現在でもアレルゲン分子の高次構造IgEエピトープ（コンフォメーションナルIgEエピトープ）の構造決定は、極めて困難であるといえる。

30

【0006】

スギ花粉主要アレルゲン（Cry j 1 および Cry j 2）についてIgEエピトープの解析が行われており、シーケンシャルIgEエピトープについてはいくつか報告されているが（Cry j 1 については非特許文献4参照、Cry j 2 については例えば特許文献1参照）、高次構造IgEエピトープ（コンフォメーションナルIgEエピトープ）については、いまだに同定されていないのが現状である。

【0007】

1価のIgEエピトープは、アレルギー反応の抑制に有効であることが知られており、アレルギー治療薬、改善薬としての利用が期待されている。1価のIgEエピトープによるアレルギー反応の抑制は、肥満細胞または好塩基球上のIgE分子と1価のIgEエピトープとが結合し、天然型アレルゲン分子の多価エピトープによるIgE分子架橋の形成を阻害することによるものであると考えられている。

40

【非特許文献1】H. Yasueda, Y. Yui, T. Shimizu et al. : J. Allergy Clin. Immunol., 71, 77(1983).

【非特許文献2】M. Sakaguchi, S. Inoue, M. Taniai, S. Ando et al.: Allergy, 45, 309(1990).

【非特許文献3】M. Sakaguti, M. Hashimoto, H. Nigi et al. : Immunology, 91, 161

50

(1997).

【非特許文献4】Taniai M, Kayano T, Takakura R, Yamamoto S, Usui m, Ando Kurimoto M, Panzani R, Matuhasi T. Mol Immunol. 1993; 30:183-9.

【特許文献1】特開平8 - 47392号公報(公開日:平成8年(1996)2月20日)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

スギ花粉主要アレルゲン(Cry j 1、Cry j 2)のIgEエピトープの大多数は、シーケンシャルエピトープではなく、高次構造エピトープ(コンフォーメーションエピトープ)であるということが知られている。上述の通り、高次構造エピトープの同定は困難であり、スギ花粉主要アレルゲン(Cry j 1、Cry j 2)のIgEエピトープの大多数は未知のままである。したがって、スギ花粉症のメカニズムの解明や、IgEエピトープを用いたスギ花粉症の改善薬、治療薬の開発を十分に行なうことができないという問題点がある。

10

【0009】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、スギ花粉アレルゲンのIgEエピトープのうち、特に高次構造エピトープ(以下「高次構造IgEエピトープ」という)を含むペプチド、そのペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそのペプチドと結合する抗体を提供すること、並びにそれらを用いてスギ花粉症の治療薬、診断キット等を提供することを目的としている。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、あらゆるアミノ酸の組み合わせのペプチドを発見することができるファージを用い、スギ花粉症患者由来IgE抗体と結合することができるペプチドの検索を行なった。その結果、高次構造IgEエピトープを含むペプチドを発見し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、スギ花粉アレルゲンの高次構造IgEエピトープを含むペプチドである。

30

【0012】

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、上記スギ花粉アレルゲンが、Cry j 1であってもよい。

【0013】

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することを特徴とするペプチドであってもよい。

【0014】

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することを特徴とするペプチドであってもよい。

40

【0015】

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することを特徴とするペプチドであってもよい。

【0016】

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することを特徴とするペプチドであってもよい。

【0017】

50

また本発明にかかるペプチドは、上記課題を解決すべく、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有し、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することを特徴とするペプチドであってもよい。

【0018】

一方、本発明にかかる抗体は、上記課題を解決すべく、上記本発明にかかるペプチドのいずれかと結合するものである。

【0019】

一方、本発明にかかるポリヌクレオチドは、上記課題を解決すべく、上記本発明にかかるペプチドのいずれかをコードすることを特徴とするものである。

【0020】

一方、本発明にかかる薬学的組成物は、上記課題を解決すべく、上記本発明にかかるペプチドのいずれかを有効成分として含有するものである。

【0021】

また、本発明にかかる薬学的組成物は、上記課題を解決すべく、上記いずれかに記載の本発明にかかるペプチドを有効成分として含有するものであってもよい。

【0022】

一方、本発明にかかるスギ花粉症の診断キットは、上記課題を解決すべく、上記本発明にかかるペプチドのいずれかを含有することを特徴とするものである。

【0023】

また、本発明にかかるスギ花粉症の診断方法は、上記課題を解決すべく、上記本発明にかかるペプチドのいずれかと被験者の血清とを反応させる工程を含むことを特徴としている。

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、これまで未知であったスギ花粉アレルゲンの高次構造IgEエピトープを含むペプチドを提供することができる。それゆえ、スギ花粉症の発症および抑制のメカニズムの解明、スギ花粉症の有効な治療薬および改善薬の提供、並びにスギ花粉症の診断手段の提供を行なうことが可能となり、スギ花粉症の根治に寄与することができるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

本発明の実施の形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0026】

< 1. 本発明にかかるペプチド >

本発明にかかるペプチドは、既述の通り、スギ花粉アレルゲン（例えば、Cry j 1、Cry j 2等）のIgEエピトープのうち、高次構造IgEエピトープを含有することを特徴とするものである。

【0027】

ここで「IgEエピトープ」は、「B細胞エピトープ」または単に「エピトープ（抗原決定基）」とも呼ばれ、IgE抗体が認識するアレルゲン（抗原）上の部位を意味する。特に本発明にかかるペプチドに含まれる「高次構造IgEエピトープ」は、「シーケンシャルIgEエピトープ」、すなわちスギ花粉アレルゲンのアミノ酸配列中にそのアミノ酸配列があり、かつスギ花粉アレルゲン特異IgE抗体と結合することが可能なものとは異なるタイプのエピトープである。

【0028】

図6(a)にシーケンシャルIgEエピトープを、図6(b)にコンフォーメーションIgEエピトープを示す模式図を示す。シーケンシャルIgEエピトープは、アレルゲンのアミノ酸配列（1次配列）を抗体が認識するものであり、当該エピトープのアミノ酸配列はアレルゲンのアミノ酸配列（1次構造）上の存在する。一方、高次構造IgEエ

10

20

30

40

50

トープは、アレルゲンが立体構造（高次構造）をとることによってはじめて出現するエピトープである。したがって、「高次構造 I g E エピトープ」とは、アレルゲンのエピトープのうち、そのアミノ酸配列がアレルゲンタンパク質のアミノ酸配列上に存在する I g E エピトープを除くもの（すなわち「シーケンシャル I g E エピトープ」）ということもできる。

#### 【0029】

上述の通り、かかる高次構造 I g E エピトープは、アレルゲンが立体構造をとることによって始めて出現するエピトープであるため、アレルゲンのアミノ酸配列（1次構造）の情報から解析および同定することは非常に困難である。本発明者らは、あらゆる組み合わせのペプチドを提示するファージを用いて、かかる高次構造 I g E エピトープの解析を行なうこととした。上記あらゆる組み合わせのペプチドを提示するファージおよびそのファージライブラリーとしては、特に限定されるものではなく、公知のファージディスプレイ法の原理を用いて M 1 3 ファージの先端表面にファージの g 3 p (gene 3 protein) との融合タンパク質としてペプチドを提示させるようにしたものを使用すればよい。このようなあらゆる組み合わせのペプチドを提示するファージライブラリーキットが既に市販されており、たとえば Ph.D.12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs Inc. 製) が利用可能である。当該 Ph.D.12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs Inc. 製) は、任意の 1 2 アミノ酸からなるペプチドをファージ表面に提示するものである。

10

#### 【0030】

本発明者らは、スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合可能なファージの選抜をまず行なった。かかるファージが提示するペプチド中には、少なくともエピトープの存在が予想される。次に本発明者らは、スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合可能なファージが提示するペプチドのアミノ酸配列が、スギ花粉アレルゲンのアミノ酸配列中に存在するか否かを検討した。スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体と結合可能なペプチドのアミノ酸配列が、スギ花粉アレルゲンのアミノ酸配列中に存在しないものであれば、当該ペプチドは高次構造 I g E エピトープを含むペプチド、すなわち本発明にかかるペプチドである判断できる。本発明にかかるペプチドは上記手法により、発見したものである。

20

#### 【0031】

なお本発明にかかるかかるペプチドは、上記手法により発見されたものに限られず、その他任意のペプチドを化学合成等で調製したものと、スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体との結合性、および当該ペプチドのアミノ酸配列を指標に見出したものであってもよい。

30

#### 【0032】

本発明の説明において「スギ花粉アレルゲン」とは、スギ花粉症の原因となるアレルゲン（抗原）であれば特に限定されるものではなく、例えば、主要抗原として公知の Cry j 1、Cry j 2、およびその他の抗原として Cry j 3、CJP-6、CJP-4等が挙げられる。なお、Cry j 3 については [Futamura N, Mukai Y, Sakaguchi M, Yasueda H, Inouye S, et al. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66:2495-2500.]、CJP-6 については [Kawamoto S, Fujimura T, Nishida M, Tanaka T, Aki T et al; Clin Exp Allergy 2002;32:1064-1070.]、CJP-4については [Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T et al. Clin Exp Allergy 2005 inpress.]に記載されている。上記スギ花粉アレルゲンのアミノ酸配列は、既に公開されているアミノ酸配列情報を利用すればよい。例えば、Cry j 1のアミノ酸配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に、アクセッション番号 D34639、Cry j 2のアミノ酸配列はアクセッション番号 D37765として公開されている。なお、上記Cry j 1のアミノ酸配列を配列番号1に示した。またその他、Cry j 1のアミノ酸配列はいくつか報告されており、例えばSwiss-Prot(<http://kr.expasy.org/cgi-bin/get-sprot-entry?P18632>)に公開されている。またNCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein>)上に、アクセッション番号 JC2124、JC2123、およびP18632として公開されている。

40

#### 【0033】

50

また「スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体」とは、スギ花粉症患者血清 I g E 抗体、スギ花粉症患者由来 B 細胞 ( B cell ) 上の I g E 抗体、およびスギ花粉症患者由来肥満細胞上の I g E 抗体を意味する。なお「スギ花粉症患者」とは、スギ花粉アレルゲンに感作され、スギ花粉アレルゲン特異 I g E 抗体を体内で産生するヒトのことを意味し、スギ花粉症を発症したか否かは特に問わない。またスギ花粉症を発症している場合であっては、その症状の程度については問わない。

**【 0 0 3 4 】**

本発明にかかるペプチドとしては、例えば、スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 から見出したペプチド ( 「ペプチド 2 6 - 2」、「ペプチド 2 6 - 3」、「ペプチド S 9 5 - 1」、「ペプチド B 0 7 - 8」および「ペプチド B 0 7 - 9」) が挙げられる。当該ペプチド 2 6 - 2、ペプチド 2 6 - 3、ペプチド S 9 5 - 1、ペプチド B 0 7 - 8、およびペプチド B 0 7 - 9 は既述の Ph.D.12<sup>T</sup>M Phage Display Peptide Library Kit ( BioLabs Inc. 製 ) を利用して見出したものであり、簡単には、以下のようにした。

10

**【 0 0 3 5 】**

まず、あらゆる 1 2 アミノ酸からなるペプチドを提示する M 1 3 ファージからなるファージライブラリーに対して、抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 ( 商品名 : Ab-Cry j 1, Monoclonal Antibody ( clone 026 ), 発売元 : 生化学工業株式会社, 以下「Cry j 1 モノクローナル抗体 0 2 6」と称する) を用いて合計 6 回 Panning を行なった。6 回目の Panning で得られたファージから任意に選択したファージの中から Cry j 1 モノクローナル抗体 0 2 6 との結合性が高いファージを E L I S A ( Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay ) を用いて検討を行ない、確かな結合性を示した「ペプチド 2 6 - 2」および「ペプチド 2 6 - 3」を提示するファージを選抜した ( 当該ファージをそれぞれ「ファージ 2 6 - 2」および「ファージ 2 6 - 3」という)。ファージ 2 6 - 2、およびファージ 2 6 - 3 について E L I S A inhibition を用いてさらに検討したところ、ファージ 2 6 - 2 の方がファージ 2 6 - 3 よりも Cry j 1 モノクローナル抗体 0 2 6 に対する結合性 ( 反応性 ) が高いということが分かった。ファージ 2 6 - 2 が提示するペプチド 2 6 - 2 のアミノ酸配列を検討した結果、H L P P S Y Y L S R N N ( 配列番号 2 ) であった。またペプチド 2 6 - 3 のアミノ酸配列は H P D F D L N R S L M D ( 配列番号 3 ) であった。

20

**【 0 0 3 6 】**

また本発明者らが作製した Cry j 1 モノクローナル抗体 S 9 5 ( Sakaguchi M, Hashimoto M, Nigi H, Yasueda H, Takahashi Y, Watanabe M, Nagoya T, Taniguchi Y, Kurimoto M, Inouye S., Immunology. 1997 Jun;91(2):161-6. “ Epitope specificity of IgE antibodies to a major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen in sera of humans and monkeys with pollinosis.” 参照 ) を Panning に用い、上記と同様の操作を行なってペプチド S 9 5 - 1 を発見した。ペプチド S 9 5 - 1 のアミノ酸配列は、T Y S P F H S F T S I P ( 配列番号 8 ) であった。

30

**【 0 0 3 7 】**

さらに本発明者らが作製した Cry j 1 モノクローナル抗体 B 0 7 ( Sakaguchi M, Hashimoto M, Nigi H, Yasueda H, Takahashi Y, Watanabe M, Nagoya T, Taniguchi Y, Kurimoto M, Inouye S., Immunology. 1997 Jun;91(2):161-6. “ Epitope specificity of IgE antibodies to a major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen in sera of humans and monkeys with pollinosis.” 参照 ) を Panning に用い、上記と同様の操作を行なってペプチド B 0 7 - 8、ペプチド B 0 7 - 9 を発見した。ペプチド B 0 7 - 8 のアミノ酸配列は N E Y Q A P P H W T K K ( 配列番号 9 ) であり、ペプチド B 0 7 - 9 のアミノ酸配列は L P R Y S F P V Q A P V ( 配列番号 1 0 ) であった。

40

**【 0 0 3 8 】**

上記ペプチド 2 6 - 2、ペプチド 2 6 - 3、ペプチド S 9 5 - 1、ペプチド B 0 7 - 8、およびペプチド B 0 7 - 9 を公知のペプチド合成装置を用いて化学合成した。化学合成により入手したペプチド 2 6 - 2 と Cry j 1 モノクローナル抗体 0 2 6 との結合性を E L I S A inhibition を用いて確認した上で、スギ花粉症患者血清 I g E 抗体との結合性を

50

同方法にて確認した。その結果、ペプチド26-2は、スギ花粉症患者血清IgE抗体と結合するということが分かった。配列番号2に示されるペプチド26-2のアミノ酸配列は、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在せず、当該ペプチド26-2は高次構造IgEエピトープを含むペプチドであるということが分かった。配列番号2に示されるペプチド26-2のアミノ酸配列が、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在するかどうかの検討は、公知のソフトウェアを用いることによって容易に検討することができる。上記ペプチド26-2の選抜、Cry j 1モノクローナル抗体026との結合性の検討、およびスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性については、後述する実施例においてより具体的に説示する。

**【0039】**

また化学合成により入手したペプチドS95-1と抗Cry j 1モノクローナル抗体S95との結合性をELISA inhibitionを用いて確認した上で、スギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性をELISA法にて確認した。その結果、ペプチドS95-1は、スギ花粉症患者血清IgE抗体と強く結合するということが分かった。配列番号8に示されるペプチドS95-1のアミノ酸配列は、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在せず、当該ペプチドS95-1は高次構造IgEエピトープを含むペプチドであるということが分かった。配列番号8に示されるペプチドS95-1のアミノ酸配列が、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在するかどうかの検討は、公知のソフトウェアを用いることによって容易に検討することができる。上記ペプチドS95-1の選抜、Cry j 1モノクローナル抗体S-95との結合性の検討、およびスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性については、後述する実施例においてより具体的に説示する。

10

20

**【0040】**

また化学合成により入手したペプチドB07-9と抗Cry j 1モノクローナル抗体B07との結合性をELISA inhibitionを用いて確認した上で、スギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性をELISA法にて確認した。その結果、ペプチドB07-9は、スギ花粉症患者血清IgE抗体と結合するということが分かった。配列番号10に示されるペプチドB07-9のアミノ酸配列は、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在せず、当該ペプチドB07-9は高次構造IgEエピトープを含むペプチドであるということが分かった。配列番号10に示されるペプチドB07-9のアミノ酸配列が、Cry j 1のアミノ酸配列上(配列番号1)には存在するかどうかの検討は、公知のソフトウェアを用いることによって容易に検討することができる。上記ペプチドB07-9の選抜、Cry j 1モノクローナル抗体B07との結合性の検討、およびスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性については、後述する実施例においてより具体的に説示する。

30

**【0041】**

また、ペプチド26-3、ペプチドB07-8についても同様に検討を行えば、スギ花粉症患者血清IgE抗体と結合するということが確認できる。さらにそのアミノ酸配列情報(ペプチド26-3:配列番号3、ペプチドB07-8:配列番号9)から、ペプチド26-3およびペプチドB07-8も高次構造IgEエピトープを含むペプチドであるということが確認できる。

**【0042】**

なお本発明にかかるペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるペプチド26-2、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチド26-3、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるペプチドS95-1、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるペプチドB07-8、および配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるペプチドB07-9のみに限定されるものではなく、配列番号2、3、8、9または10に示されるそれぞれのアミノ酸の一部がスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性(結合性)を有する限りにおいて、置換、欠失したペプチドであっても、また任意のアミノ酸が付加されたペプチドであってもよい。

40

**【0043】**

また本発明にかかるペプチドは、上記ペプチド26-2、ペプチド26-3、ペプチド

50



S 9 5 - 1、ペプチド B 0 7 - 8、およびペプチド B 0 7 - 9に限られるものではなく、上記同様の方法を用いて見出したCry j 1の高次構造 I g E エピトープを含有する他のペプチドをも含む。また上記Panningの際にCry j 2に対する抗体（モノクローナル抗体）、Cry j 3に対する抗体（モノクローナル抗体）、CJP-6に対する抗体（モノクローナル抗体）、およびCJP-4に対する抗体（モノクローナル抗体）を用いることによって、それぞれCry j 2、Cry j 3、CJP-6 および CJP-4の高次構造 I g E エピトープを含むペプチドを取得することができる。よって、上記Cry j 2、Cry j 3、CJP-6、およびCJP-4の高次構造 I g E エピトープを含むペプチドも本発明にかかるペプチドである。

#### 【0044】

なお上記Ph.D.12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit（BioLabs Inc.製）を用いて見出した本発明にかかるペプチドは、12アミノ酸からなるものであるが、本発明のペプチドはこれに限定されるものではない。本発明のペプチドは、少なくとも高次構造 I g E エピトープを含有するものであればよい。したがって、高次構造 I g E エピトープのみからなるペプチドであっても、高次構造 I g E エピトープにエピトープ構造に影響を及ぼさないアミノ酸（例えば、グリシン、リジン等）がN末端側、C末端側に付加されたペプチドでも、本発明のペプチドに包含される。

#### 【0045】

高次構造 I g E エピトープのアミノ酸配列を特定する方法としては、例えば本発明にかかるペプチド（例えばペプチド26-2、ペプチド26-3、ペプチドS95-1、ペプチドB07-8、およびペプチドB07-9等）から任意のペプチド断片を調製し、スギ花粉アレルギー特異 I g E 抗体と結合する必須のアミノ酸領域を絞り込むという方法が挙げられる。

#### 【0046】

なお、本発明にかかるペプチドには1価の I g E エピトープを含有していることが好ましい。ここで「1価の I g E エピトープ」とは、 I g E 抗体と結合する I g E エピトープが1つ含まれるということの意味する。これに対して多価の I g E エピトープとは、 I g E 抗体と結合する I g E エピトープが複数含まれるということの意味する。1価の I g E エピトープを含有する本発明にかかるペプチドを、スギ花粉症治療薬、スギ花粉症改善薬等に利用することによって、肥満細胞または好塩基球上の I g E 分子と1価の I g E エピトープとが結合し、天然型アレルギー分子の多価エピトープによる I g E 分子架橋の形成を阻害することができ、ヒスタミン等の化学メディエーターの放出を抑制することができる。

#### 【0047】

< 2.本発明にかかるペプチドの調製方法、および本発明にかかるポリヌクレオチド >  
ところで、本発明にかかるペプチドは、「固相法」または「液相法」として知られる斯界において慣用のペプチド合成法により調製することができる。例えば、社団法人日本生化学会編「新化学実験講座」、第1巻、「タンパク質VI」、第3~44頁、1992年、東京化学同人発行などにはペプチド合成の詳細が記載されている。また、該ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザー（シンフォニー、プロテインテクノロジー社製）を用い、Fmoc (9-fluorenyl methyloxycarbonyl)固相合成法にて同装置のプロトコールに従って合成することができる。すなわち、合成する各ペプチドのC末端に相当するアミノ酸が導入されているFmoc-L-アミノ酸Wang樹脂（またはCl-Trt樹脂）を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液を用いてFmocを除く。さらにC末端から2番目のアミノ酸に相当するアミノ酸溶液とアクチベーター溶液を反応せしめ、反応後再びFmoc基のデプロテクションを行ない、同様の操作を繰り返すことにより、目的とするペプチドを合成することができる。

#### 【0048】

本発明にかかるペプチドは化学合成により調製されたものに限定されず、組換えDNA技術により調製したものであってもよく、例えば、上記ペプチド26-2、ペプチド26-3、ペプチドS95-1、ペプチドB07-8、またはペプチドB07-9をコードす

るポリヌクレオチド (DNA) を調製し、これを自立増殖可能なベクターに挿入したものを大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等の宿主に導入して形質転換体とし、その培養物から本発明にかかるペプチドを取得してもよい。

【0049】

上記ポリヌクレオチドの塩基配列は、本発明にかかるペプチド (例えば、上記ペプチド 26-2、ペプチド 26-3、ペプチド S95-1、ペプチド B07-8、またはペプチド B07-9) をコードするポリヌクレオチドであれば特に限定されるものではない。本発明にかかるペプチドのアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するポリヌクレオチドは全て上記ポリヌクレオチドに含まれる。アミノ酸配列に対応する塩基配列は、公知のコドン表により容易に理解できる。なお、本発明にかかるペプチドをコードするポリヌクレオチドを「本発明にかかるポリヌクレオチド」と称する。本発明にかかるポリヌクレオチドは、本発明にかかるペプチドの大量調製に利用可能である。

10

【0050】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド (A、G、C および T と省略される) の配列として示される。

【0051】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、RNA (例えば、mRNA) の形態、または DNA の形態 (例えば、cDNA またはゲノム DNA) で存在し得る。DNA は、二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖 DNA または RNA は、コード鎖 (センス鎖としても知られる) であり得るか、またはそれは、非コード鎖 (アンチセンス鎖としても知られる) であり得る。

20

【0052】

所望の塩基配列を有するポリヌクレオチド (DNA) を調製する方法としては、例えば、該所望の DNA の部分配列ヌクレオチドであって、両端がオーバーラップするようなセンスおよびアンチセンスヌクレオチドを化学合成し、次いでポリメラーゼ連鎖反応 [Saiki, R. K. et al (1988) Science 239, 487-491 参照] 等の DNA ポリメラーゼ反応やリガーゼ反応を利用することにより、それら部分配列が連結したものを得る方法等が挙げられる。また公知の DNA シンセサイザーを用いる方法により、化学合成したものであってもよい。

30

【0053】

上記のごとくして得られる本発明のペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド (DNA) を好適なベクターに組み込むことにより、原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質転換にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において該 DNA を発現させることができる。

【0054】

原核細胞の宿主としては、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を持つものが望ましい。

40

【0055】

例えば大腸菌としては *E. coli* K12 株、JM109 株等がよく用いられ、ベクターとしては一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドがよく用いられるが、これらに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターがいずれも利用できる。

【0056】

プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン (trp) プロモーター、ラ

50

クトース (l a c) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (t a c) プロモーター、リボプロテイン (l p p) プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ ( ) P L プロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子 T u ( t u f B) プロモーター、l a c U V 5 プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のペプチドの産生に使用することができる。

【 0 0 5 7 】

枯草菌としては、例えば 2 0 7 - 2 5 株が好ましく、ベクターとしては p T U B 2 2 8 [ Ohmura, K., et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93 参照 ] 等が用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌用プロモーターとしては、枯草菌の - アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられ、さらに必要により - アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードする D N A 配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

10

【 0 0 5 8 】

宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、p B R 3 2 2 複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターはカルシウム - クロライド法 [ Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154参照 ]、Hanahanの方法 [ Hanahan, D. and Meselson, M. (1980) Gene 10, 63 参照 ] および電気パルス穿孔法 [ Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照 ] 等により大腸菌に取り込ませることができる。かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

20

【 0 0 5 9 】

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である C O S 細胞 [ Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照 ] やチャイニーズハムスター卵巣細胞 ( C H O ) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [ Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220参照 ]、ヒトナマルバ細胞、ハムスター B H K 細胞等がよく用いられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現させようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、R N A のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、S V 4 0 の初期プロモーターを有する p S V 2 d h f r [ Subramani, S., et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864参照 ] 等を例示できるが、これに限定されない。

30

【 0 0 6 1 】

また真核微生物としては酵母が一般によく用いられており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばサッカロミセス・セレビスエ ( Saccharomyces cerevisiae ) が好ましい。該酵母等の真核生物の発現ベクターとしては、例えばアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [ Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照 ] や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター [ Miyanojara, A., et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5参照 ] 等を好ましく利用できる。

40

【 0 0 6 2 】

宿主細胞として、C O S 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、S V 4 0 複製起点を有し、C O S 細胞において自立増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写集結シグナルおよび R N A スプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは D E A E - デキストラ法 [ Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308 参照 ]、リン酸カルシウム - D N A 共沈澱法 [ Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology 52, 456-457 参照 ] および電気パルス穿孔法 [ Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照 ] 等により C O S 細胞に取り込ませることができる。かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿

50

主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共にG418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo [Sambrook, J., et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY参照] や pSV2neo [Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341 参照] 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

#### 【0063】

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞外に本発明にかかるペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、大腸菌であればトリプトン-イースト培地(バクトトリプトン1.6%、イーストエキストラクト1.0%、塩化ナトリウム0.5%(pH7.0))やペプトン培地(ディフコ社製)等を使用できる。また、上記COS細胞であればRPMI1640培地やダルベッコ修正イーグル培地(DMEM)等の培地に必要に応じウシ胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。

10

#### 【0064】

上記により、形質転換体の細胞内または細胞外に生産される本発明にかかるペプチドは、該ペプチドの物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常のタンパク質沈澱剤による処理、限外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲルろ過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

20

#### 【0065】

外来遺伝子を大腸菌等に導入して大量発現させた場合、産生されたペプチドが、封入体と呼ばれる水に不溶の集塊を形成することがある。そのような場合、グアニジンイソチオシアネート等の強力な変性剤を用いて該ペプチドを変性させることにより該ペプチドを可溶化することができる。

#### 【0066】

さらに、本発明にかかるペプチドは、かくして得られるペプチドに糖質やポリエチレングリコールを付加して得られる複合体としての形態、さらには、ペプチドをアセチル化、アミド化および/または多官能試薬により架橋重合させて得られる誘導体またはホモ若しくはヘテロ重合体としての形態であってもよい。そのような本発明にかかるペプチドの複合体、誘導体または重合体の製造にあたっては、糖質等の付加、アセチル化、アミド化および/または架橋重合は、本発明にかかるペプチド中のスギ花粉アレルギー由来の高次構造IgEエピトープの機能を損なわないよう、前記した本発明にかかるペプチドのN末端および/またはC末端の付加的ペプチドにおいて行われることが好ましいが、これに限定されない。

30

#### 【0067】

本発明にかかるペプチドの複合体としては、例えばN末端のアミノ基にポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、さらには、プルラン、エルシナンなどのマルトトリアースを反復単位とする多糖類を付加したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知の方法で合成できるものを挙げることができ、これらは例えば社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質IV」第236~252頁(1991年、東京化学同人発行)等の記載に従って製造することができる。

40

#### 【0068】

また、本発明にかかるペプチドの誘導体としては、例えばN末端をアセチル化したもの、C末端をアミド化したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知の方法で合成できるものを挙げる事ができる。かかる誘導体は、例えば上記「新生化学実験講座」第1

50

巻「タンパク質Ⅴ」第18～20頁および同第9巻「ホルモンⅠ」第290～298頁（いずれも1991年、東京化学同人発行）等の記載に従って製造することができる。

【0069】

さらに、本発明にかかるペプチドの重合体としては、本発明にかかる1種または2種以上のペプチドの重合体が挙げられ、例えばジスクシンイミジルスベレート等の二価性架橋試薬により本発明のペプチド2分子を重合したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知の方法で合成できるものを挙げるることができる。かかる重合体の調製は、例えば上記「新化学実験講座」第1巻「タンパク質Ⅴ」第207～226頁の記載に従って行なうことができる。

【0070】

例えば、プロテアーゼで特異的に切断可能なアミノ酸配列を含むリンカーペプチドを介して、本発明にかかるペプチド（ペプチド26-2、ペプチド26-3、ペプチドS95-1、ペプチドB07-8、またはペプチドB07-9等）より選ばれる単一または異なるペプチドが複数個連結しているような重合体を、大腸菌等の宿主に組換え体として生産させてから、該プロテアーゼで該重合体を消化することにより、本発明にかかるペプチドを得ることもできる。その際、該重合体は本発明にかかるペプチドの一つが重合したホモ重合体または複数種の本発明にかかるペプチドが重合したヘテロ重合体のいずれでもよいが、単一のペプチドを大量に生産させることを目的とする場合には、ホモ重合体を選択される。またプロテアーゼは、特定のアミノ酸配列を認識して切断するものであれば、公知のものをいずれも使用することができるが、好適にはトリプシン、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンE等である

<3. 本発明にかかる抗体>

本発明にかかる抗体は、上記本発明にかかるペプチドと結合するものである。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、特に限定しない限り、免疫グロブリン（IgA、IgD、IgE、IgG、IgMおよびこれらのFabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fcフラグメント）を意味し、例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、抗イデオタイプ抗体およびヒト化抗体が挙げられるがこれらに限定されない。本発明にかかる抗体は、本発明にかかるペプチドを発現する生物材料（ファージ含む）、本発明にかかるペプチドを精製、調製する際に利用可能である。例えば、本発明にかかる抗体を固定化し、公知のアフィニティークロマトグラフィーを行なうこと

【0071】

「抗体」は、種々の公知の方法（例えば、HarLowら、「Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)」、岩崎ら、「単クローン抗体ハイブリドーマとELISA、講談社(1991)」）に従えば作製することができる。

【0072】

ペプチド抗体は、当該分野に周知の方法によって作製される。例えば、Chow, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914; および Bittle, F. J.ら、J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985)（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。一般には、動物は遊離ペプチドで免疫化され得る；しかし、抗ペプチド抗体力価はペプチドを高分子キャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイド）にカップリングすることにより追加免疫され得る。例えば、システインを含むペプチドは、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のようなリンカーを使用してキャリアにカップリングされ得、一方、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなより一般的な連結剤を使用してキャリアにカップリングされ得る。ウサギ、ラット

10

20

30

40

50

、およびマウスのような動物は、遊離またはキャリア - カップリングペプチドのいずれかで、例えば、約 100  $\mu$ g のペプチドまたはキャリアタンパク質および Freund のアジュバントを含むエマルジョンの腹腔内および / または皮内注射により免疫化される。いくつかの追加免疫注射が、例えば、固体表面に吸着された遊離ペプチドを使用して ELISA 法により検出され得る有用な力価の抗ペプチド抗体を提供するために、例えば、約 2 週間の間隔で必要とされ得る。免疫化動物からの血清における抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択により、例えば、当該分野で周知の方法による固体支持体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶出により増加され得る。

#### 【0073】

本明細書中で使用される場合、用語「ペプチドと特異的に結合する抗体」は、本発明にかかるペプチドに特異的に結合し得る完全な抗体分子および抗体フラグメント（例えば、Fab および  $F(ab')_2$  フラグメント）を含むことを意味する。Fab および  $F(ab')_2$  フラグメントは完全な抗体の Fc 部分を欠いており、循環によってさらに迅速に除去され、そして完全な抗体の非特異的組織結合をほとんど有し得ない（Wahlら、J. Nucl. Med. 24: 316 - 325 (1983)（本明細書中に参考として援用される））。従って、これらのフラグメントが好ましい。

10

#### 【0074】

さらに、本発明にかかるのペプチドに結合し得るさらなる抗体が、抗イディオタイプ抗体の使用を通じて 2 工程手順で産生され得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であるという事実を使用し、従って、二次抗体に結合する抗体を得ることが可能である。この方法に従って、本発明にかかるペプチドと特異的に結合する抗体は、動物（好ましくは、マウス）を免疫するために使用される。次いで、このような動物の脾細胞はハイブリドーマ細胞を産生するために使用され、そしてハイブリドーマ細胞は、本発明にかかるペプチドと特異的に結合する抗体に結合する能力が、本発明にかかるペプチドによってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、本発明にかかるペプチドと特異的に結合する抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そしてさらなる本発明にかかるペプチドと特異的に結合する抗体の形成を誘導するために動物を免疫するために使用され得る。

20

#### 【0075】

Fab および  $F(ab')_2$  ならびに本発明にかかる抗体の他のフラグメントは、本明細書中で開示される方法に従って使用され得ることが、明らかである。このようなフラグメントは、代表的には、パイン（Fab フラグメントを生じる）またはペプシン（ $F(ab')_2$  フラグメントを生じる）のような酵素を使用するタンパク質分解による切断によって産生される。あるいは、本発明にかかるペプチドに結合するフラグメントは、組換え DNA 技術の適用または合成化学によって産生され得る。

30

#### 【0076】

このように、本発明にかかる抗体は、少なくとも、本発明にかかるペプチドを認識する抗体フラグメント（例えば、Fab および  $F(ab')_2$  フラグメント）を備えていればよいといえる。すなわち、本発明にかかるペプチドを認識する抗体フラグメントと、異なる抗体分子の Fc フラグメントとからなる免疫グロブリンも本発明に含まれることに留意すべきである。

40

#### 【0077】

つまり、本発明の目的は、本発明にかかるペプチドを認識する抗体を提供することにあるのであって、本明細書中に具体的に記載した個々の免疫グロブリンの種類（IgA、IgD、IgE、IgG または IgM）、キメラ抗体作製方法、ペプチド抗原作製方法等に存するのではない。したがって、上記各方法以外によって取得される抗体も本発明の技術的範囲に属することに留意しなければならない。

#### 【0078】

< 4 . 本発明にかかる薬学的組成物 >

本発明にかかるペプチド（その複合体、その誘導体を含む）を有効成分として含む本発

50

明にかかる薬学的組成物（スギ花粉症治療薬またはスギ花粉改善薬）は、スギ花粉症に罹患した患者に投与すると、スギ花粉症を治療または改善することができる。I g E エピトープ、特に1価のI g E エピトープは、アレルギー反応の抑制に有効であることが知られており、アレルギー治療薬、改善薬としての利用が期待されている。1価のI g E エピトープによるアレルギー反応の抑制は、肥満細胞または好塩基球上のI g E 分子と1価のI g E エピトープとが結合し、天然型アレルギー分子の多価エピトープによるI g E 分子架橋の形成を阻害することによるものであると考えられている。一方、本発明の薬学的組成物（スギ花粉症治療薬、スギ花粉症改善薬）をスギ花粉が飛散しはじめる前に健常な個体や潜在的なスギ花粉症の個体に投与するときには、スギ花粉症に対して顕著な予防効果を発揮するとともに、発症時のアレルギー症状の寛解に著効を発揮する。

10

**【0079】**

また本発明にかかる薬学的組成物は、上記本発明にかかる抗体を含有するものであってもよい。本発明にかかる抗体は、スギ花粉アレルギーのI g E エピトープを含むペプチドに対する抗体であり、スギ花粉アレルギーのI g E エピトープと特異的に結合する。したがって、本発明にかかる抗体を含有する薬学的組成物を、スギ花粉症患者に投与すれば、本発明にかかる抗体が、体内に侵入したスギ花粉アレルギーの高次構造I g E エピトープをトラップし、肥満細胞または好塩基球上のI g E 分子架橋形成を阻害することができ、スギ花粉症の症状を改善することができる。

**【0080】**

本発明にかかる薬学的組成物についてさらに詳しく説明すると、本発明にかかる薬学的組成物は通常、本発明にかかるペプチドまたは抗体を0.01% (w/w) ~ 100% (w/w)、好ましくは0.05% (w/w) ~ 50% (w/w)、さらに好ましくは0.5% (w/w) ~ 5.0% (w/w) 含んでなる。本発明にかかる薬学的組成物は、当該ペプチドまたは抗体単独の形態はもとより、それ以外に生理的に許容される、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、マンニトール、プルランなどの担体、賦形剤、免疫助成剤、安定剤、さらには必要に応じてステロイドホルモンやクロモグリク酸ナトリウムなどの抗炎症剤や抗ヒスタミン剤、抗ロイコトリエン剤、抗タキキニン剤を含む1種または2種以上の他の薬剤と組み合わせた組成物としての形態を包含する。さらに、本発明の薬学的組成物は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、本発明にかかるペプチドまたは抗体を、例えば、1日当たりの用量またはその整数倍（4倍まで）またはその約数（1/40まで）に相当する量を含み、投与に適する物理的に分離した一体の剤形にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、散剤、細粒剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、口腔剤、シロップ剤、乳剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、坐剤、点眼剤、点鼻剤、噴霧剤、注射剤などが挙げられる。

20

30

**【0081】**

本発明の薬学的組成物は、スギ花粉症の治療、改善または予防を目的に、経口、経皮、点鼻、点眼または注射投与される。ヒトにおける投薬量は、投与の目的や方法、症状によっても異なるが、通常、対象者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人1日当たり0.01mg ~ 1000mg、好ましくは1mg ~ 10mgを目安に、毎日1回 ~ 毎月1回の頻度で、約1 ~ 6ヶ月間、通常、用量を増やしながら反復投与される。

40

**【0082】**

<本発明にかかるスギ花粉症の診断キット>

本発明にかかるスギ花粉症の診断キットには、本発明にかかるペプチドを含むことを特徴としている。本発明にかかるペプチドと被験者の血清との結合性（反応性）をELISA法等で検討することによって、被験者血清中にスギ花粉アレルギーに対するI g E 抗体を有しているか否かを判断することができ、被験者がスギ花粉症である（スギ花粉症を発症しているかは問わない）か否かを診断することができる。

**【0083】**

50

なお本発明にかかるスギ花粉症の診断キットに含まれる本発明にかかるペプチドは、一種類に限定されるものではなく、複数種類のペプチドを包含することが好ましい。換言すれば、スギ花粉アレルゲンのIgEエピトープを含む複数のペプチドが、本発明にかかる診断キットに含まれていることが好ましい。また、単一のアレルゲンのIgEエピトープを含むペプチドに限定されるものでなく、種々のアレルゲンに対するIgEエピトープを含むペプチドがそれぞれ含まれていることが好ましい。

【0084】

本発明にかかるスギ花粉症の診断キットに、複数の本発明にかかるペプチドが含まれていることによって、被験者（スギ花粉症患者）のアレルギー反応の原因となるスギ花粉アレルゲンをさらに詳細に特定することが可能となる。

10

【0085】

なお、本発明にかかるスギ花粉症の診断キットには、本発明にかかるペプチドの他、公知のIgEエピトープを含むペプチド、公知のアレルゲンタンパク質が含まれていてもよい。被験者のアレルギー反応の原因となるアレルゲンの特定を、さらに詳細に行なうことができる。

【0086】

また、本発明にかかるスギ花粉症の診断キットには、ELISA法を行なうために必要な試薬（2次抗体、発色試薬等）、プレート（96ウェルプレート等）等が含まれていてもよい。またウエスタンブロット法を行なうために必要なメンブレン、電気泳動用ゲル、電気泳動装置、プロットング装置、プロットング用試薬等が含まれていてもよい。上記構成が含まれることによって、スギ花粉症の診断をさらに簡便に行なうことができる。

20

【0087】

また本発明にかかるスギ花粉症診断キットは、本発明にかかるペプチドが基板上に固定化されている検出器具が含まれている態様であってもよい。当該実施態様にかかる検出器具は、いわゆるプロテインチップである。

【0088】

本明細書中で使用される場合、用語「基板」は、目的物（例えば、ペプチドまたはタンパク質等）を担持することのできる物質が意図され、用語「支持体」と交換可能に使用される。好ましい基板（支持体）としては、ビーズ（例えば、ポリスチレンビーズ）、固相（例えば、ガラスチューブ、試薬ストリップ、ポリスチレン製のマイクロタイタープレートまたはアミノ基結合型のマイクロタイタープレート）などが挙げられるが、これらに限定されない。目的物をこれらの基板に固定化する方法は、当業者に周知であり、例えば、Nature 357: 519-520 (1992)（本明細書中に参考として援用される）に記載される。

30

【0089】

本実施態様にかかる検出器具に用いる基板の材質としては、ペプチドを安定して固定化することができるものであればよい。上記した基板以外には、例えば、ポリカーボネートやプラスチックなどの合成樹脂、ガラス等を挙げることができるが、これらに限定されない。基板の形態も特に限定されないが、例えば、板状、フィルム状等の基板を好適に用いることができる。

40

【0090】

上記の方法以外のペプチドを基板上に固定化する方法としては、例えば、ニトロセルロース膜やPDVF膜にポリペプチドや抗体をドットプロットの要領でスポットする物理吸着法、または、ポリペプチドや抗体の変性を軽減するために、スライドガラス上にポリアクリルアミドのパッドを接合して、これにペプチドをスポットする方法が挙げられる。さらに、ペプチドを基板表面に吸着させるだけでなく、強固に結合させるため、アルデヒド修飾ガラスを利用した方法（G. MacBeath, S. L. Schreiber, Science, 289, 1760 (2000)）を用いることもできる。また、基板上でのペプチドの配向を揃えて固定化する方法としては、オリゴヒスチジンタグを介して、ニッ

50



ケル錯体で表面修飾した基板へ固定化する方法 (H. Zhu, M. Bilgin, R. Bingham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, Science, 293, 2101 (2001)) を用いることができる。

【0091】

このように、本発明にかかるとスギ花粉診断キットには、少なくとも、本発明にかかるとペプチドが含まれていればよいといえる。そのほかにスギ花粉症の診断に必要な構成を備える場合も、本発明の技術的範囲に含まれる点に留意すべきである。

【0092】

<本発明にかかるとスギ花粉症の診断方法>

本発明にかかるとスギ花粉症の診断方法は、本発明にかかるとペプチドと被験者の血清と反応させる工程（反応工程）を含むことを特徴としている。本発明にかかるとペプチドと被験者の血清との結合性（反応性）をELISA法等で検討することによって、被験者血清中にスギ花粉アレルゲンに対するIgE抗体を有しているか否かを判断することができ、被験者がスギ花粉症である（スギ花粉症を発症しているかは問わない）か否かを診断することができる。

【0093】

当該反応工程を行なう方法は特に限定されるものではなく、例えばELISA法、RIA法、ウエスタンブロット法、ドットブロット法等公知の方法を適宜選択の上、適用可能である。例えば、ELISA法を採用する場合場合は、マイクロタイタープレート上に本発明にかかるとペプチドを固定し、被験者の血清をアプライして反応させればよい。なお被験者の血清は、適当な濃度になるように緩衝液（リン酸緩衝液等）で希釈して使用することが好ましい。血清の濃度が高すぎると本発明にかかるとペプチドと非特異的に結合するからである。ペプチドの固定量、血清の反応温度、反応時間等の反応条件については、適宜検討の上、設定すればよい。なお、被験者の血清と反応させるのは、本発明にかかるとペプチドに限定されるものではなく、その他のIgEエピトープを含むペプチドや、その他公知のアレルゲンタンパク質等と反応させてもよい。したがって、上記マイクロタイタープレート上に固定する物質は、本発明にかかるとペプチドのみならず、その他のIgEエピトープを含むペプチドや、その他公知のアレルゲンタンパク質等であってもよい。

【0094】

また本発明にかかるとスギ花粉症の診断方法には、本発明にかかるとペプチドと患者血清中に含まれるIgE抗体との結合を検出する検出工程が含まれていることが好ましい。本発明にかかるとペプチドに結合した患者血清中に含まれるIgE抗体に、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ等で標識した2次抗体（抗ヒト抗体）を結合させ、さらに標識した酵素によって発色する基質を加え発色させることによって、本発明にかかるとペプチドと患者血清中に含まれるIgE抗体との結合を容易かつ定量的に検出することができ、被験者がスギ花粉症か否かを判断することができる。なお検出工程は、放射性同位体標識した2次抗体を用いても良く、また検出感度を向上させるべく2次抗体に対する抗体（3次抗体）を用いてもよい。なお検出には、適宜市販の抗体、および検出用試薬を適宜選択の上、利用すればよい。

【0095】

上記反応工程、検出工程には、当該工程に必要な操作（例えば、未反応の血清抗体等を反応系から除去する洗浄操作、マイクロタイタープレートと抗体との非特異的な結合を防止するブロッキング操作等）が含まれていてもよい。また本発明にかかるとスギ花粉症の診断方法には、患者から採血する工程、採血した血液から遠心分離により血清を調製する血清調製工程等が含まれていてもよい。なお、ELISA法の具体的な方法については、実施例の記載を適宜援用することが可能である。

【0096】

以下添付した図面に沿って実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説

10

20

30

40

50

明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 【実施例】

##### 【0097】

〔実施例1：Cry j 1 の I g E エピトープを提示するファージの検索〕

(方法)

あらゆる12アミノ酸からなるペプチドを提示するM13ファージからなるファージライブラリー(Ph.D.12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs Inc.製))に対して、抗Cry j 1モノクローナル抗体であるCry j 1モノクローナル抗体026(発売元: 生化学工業株式会社)、Cry j 1モノクローナル抗体S95(Sakaguchi M, Hashimoto M, Nigi H, Yasueda H, Takahashi Y, Watanabe M, Nagoya T, Taniguchi Y, Kurimoto M, Inouye S., Immunology. 1997 Jun;91(2):161-6. "Epitope specificity of IgE antibodies to a major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen in sera of humans and monkeys with pollinosis." 参照)、Cry j 1モノクローナル抗体B07(Sakaguchi M, Hashimoto M, Nigi H, Yasueda H, Takahashi Y, Watanabe M, Nagoya T, Taniguchi Y, Kurimoto M, Inouye S., Immunology. 1997 Jun;91(2):161-6. "Epitope specificity of IgE antibodies to a major allergen (Cry j 1) of Japanese cedar pollen in sera of humans and monkeys with pollinosis." 参照)をそれぞれ用いて合計6回Panningを行なった。なお上記Cry j 1モノクローナル抗体S95およびCry j 1モノクローナル抗体B07は、独立行政法人 理化学研究所 坂口雅彦氏から享受した。

##### 【0098】

具体的には、0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.6)でCry j 1モノクローナル抗体を10 μg/mlになるように希釈し、96ウェルマイクロタイタープレート(以下「96ウェルプレート」という)の各ウェルに150 μlずつ加え4 で一晩放置した。

##### 【0099】

E.coli ER2738を10mlのLB培地に植菌し、37 で振盪培養を行なった。E.coli ER2738が増殖している間に、プレートにコートしたCry j 1モノクローナル抗体026をウェルから取り除き、blocking buffer (BSA 5mg/ml, 0.02% NaN<sub>3</sub> / 0.1M NaHCO<sub>3</sub>-pH 8.6)でウェルを満たし、4 で1時間インキュベートを行なった。

##### 【0100】

その後ウェル内のblocking bufferを取り除き、TBST(50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl + 0.1% [v/v] Tween-20)で6回洗浄した。次にTBSTで希釈した4 × 10<sup>10</sup>のファージライブラリーを、ウェルに加え、室温で1時間振盪した。このウェルをTBSTで10回洗浄し、0.2M Glycine-HCl (pH2.2), 1mg/ml BSA を100 μl加え、10分間振盪した。溶出したファージを、1M Tris-HCl (pH 9.1) 15 μlで中和した。このファージ溶出液を、General M13 Methods (Stain Maintenance)でtiterした。残りのファージ溶出液を、20mlのER2738-LB培地に加え、37 で4.5時間振盪した。培地を遠心分離(10000rpm, 10min, 4 )を行ない、遠心上清の1/6 volumeのPEG/NaCl (20% (w/v) polyethylenglycolo-8000, 2.5M NaCl)を加え、4 で一晩放置した。

##### 【0101】

その後、遠心分離(10000rpm, 10min, 4 )を行ない、遠心上清を取り除き、1mlのTBS(50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl)にペレットを懸濁し、遠心(10000rpm, 5min, 4 )を行なった。このとき得られた遠心上清に対し、1/6 volumeのPEG/NaClを加え1時間インキュベートを行なった。次に、遠心分離(10000rpm, 10min, 4 )を行なった後、遠心上清を取り除き、ペレットをTBS, 0.02% NaN<sub>3</sub>で懸濁し、さらに遠心分離(10000rpm, 1min, 4 )を行なった。この遠心上清をファージ増幅液とし、上記工程を6回繰り返した。なお、特記しない限り、Ph.D.12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs Inc.製)

のマニュアルに準じた。

【0102】

6回目のPanningで得られたファージ群から任意に10個のファージを選択し、そのファージの塩基配列を決定し、その塩基配列情報から当該ファージが提示するペプチドのアミノ酸配列を決定した。

【0103】

(結果)

Cry j 1モノクローナル抗体026を用いたPanningにより選択されたファージが提示するペプチドのアミノ酸配列を図1に示した。また右端の分数は(例えば「(6/10)」、10個のファージのうち、同一のアミノ酸配列からなるペプチドを提示するファージがいくつあったかを示すものである。例えば「6/10」と表示していれば、10個のファージのうち6個が同一のアミノ酸配列からなるペプチドを提示したということを示す。換言すれば、10個のファージのうち6個が同一のファージであったことを意味する。

【0104】

図1によれば、異なるアミノ酸配列からなるペプチドを提示する5種類のファージを取得したということが分かった。ファージ26-1は、ATKKATSTYATK(配列番号4)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチド26-1)を提示するファージであった。またファージ26-2;ファージ26-6;ファージ26-7;ファージ26-8;ファージ26-9およびファージ26-10は、HLPPSYYLSRNN(配列番号2)のアミノ酸配列からなるペプチド(以下、同じアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチド26-2」という)を提示するファージであった。またファージ26-3は、HPDFDLNRS LMD(配列番号3)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチド26-3)を提示するファージであった。またファージ26-4は、APTFDMNPLRTR(配列番号5)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチド26-4)を提示するファージであった。またファージ26-5は、YARTPNRDFTPG(配列番号6)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチド26-5)を提示するファージであった。

【0105】

Cry j 1モノクローナル抗体S95を用いたPanningにより選択されたファージが提示するペプチドのアミノ酸配列を図7に示した。図の見方は、図1と同様である。図7によれば、異なるアミノ酸配列からなるペプチドを提示する3種類のファージを取得したということが分かった。ファージS95-1;ファージS95-2;ファージS95-3;ファージS95-4;ファージS95-5;ファージS95-7;ファージS95-8およびファージS95-10は、TYS PFHSFTSIP(配列番号8)のアミノ酸配列からなるペプチド(以下、同じアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチドS95-1」という)を提示するファージであった。またファージS95-6は、H Q Y Q R D H G P Q K S(配列番号11)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチドS95-6)を提示するファージであった。またファージS95-9は、K M H T A S L S H P L M(配列番号12)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチドS95-9)を提示するファージであった。

【0106】

Cry j 1モノクローナル抗体B07を用いたPanningにより選択されたファージが提示するペプチドのアミノ酸配列を図8に示した。図の見方は、図1および7と同様である。図8によれば、異なるアミノ酸配列からなるペプチドを提示する5種類のファージを取得したということが分かった。ファージB07-1;ファージB07-2;ファージB07-5;ファージB07-6;ファージB07-7およびファージB07-10は、Q G P H W W R L E G D P(配列番号13)のアミノ酸配列からなるペプチド(以下、同じアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチドB07-1」という)を提示するファージであった。またファージB07-3は、I S P P Q H P P H W F R(配列番号14)のアミノ酸配列からなるペプチド(ペプチドB07-3)を提示するファージであった。またファージB07-4は、Q A P H W W Y T A P M L(配列番号15)のアミノ酸配列からなるペ

10

20

30

40

50

チド (ペプチド S 9 5 - 9) を提示するファージであった。またファージ B 0 7 - 8 は、N E Y Q A P P H W T K K (配列番号 1 6) のアミノ酸配列からなるペプチド (ペプチド B 0 7 - 8) を提示するファージであった。またファージ B 0 7 - 9 は、L P R Y S F P V Q A P V (配列番号 1 7) のアミノ酸配列からなるペプチド (ペプチド B 0 7 - 9) を提示するファージであった。

#### 【 0 1 0 7 】

〔実施例 2 : 各ファージと抗 Cry j 1モノクローナル抗体との結合性〕

(方法)

各ファージ (ファージ 2 6 - 1 ~ 2 6 - 5 ; ファージ S 9 5 - 1 ; ファージ S 9 5 - 6 ; ファージ S 9 5 - 9 ; ファージ B 0 7 - 1 ; ファージ B 0 7 - 3 ; ファージ B 0 7 - 4 ; ファージ B 0 7 - 8 ; ファージ B 0 7 - 9 およびランダムファージ) を、 $1 \times 10^9$  個/well となるように 9 6 ウェルプレートにコートした。抗 Cry j 1モノクローナル抗体である Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 (発売元 : 生化学工業株式会社) を用いた E L I S A 法により、ファージ 2 6 - 1 ~ 2 6 - 5 と Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 との結合性を検討した。抗 Cry j 1モノクローナル抗体である Cry j 1モノクローナル抗体 S 9 5 を用いた E L I S A 法により、ファージ S 9 5 - 1 ; ファージ S 9 5 - 6 ; ファージ S 9 5 - 9 と Cry j 1モノクローナル抗体 S 9 5 との結合性を検討した。抗 Cry j 1モノクローナル抗体である Cry j 1モノクローナル抗体 B 0 7 を用いた E L I S A 法により、ファージ B 0 7 - 1 ; ファージ B 0 7 - 3 ; ファージ B 0 7 - 4 ; ファージ B 0 7 - 8 ; ファージ B 0 7 - 9 と Cry j 1モノクローナル抗体 B 0 7 との結合性を検討した。なお、ランダムファージとは、上記実施例 1 において選抜されなかったファージであり、陰性対照として用いたものである。

#### 【 0 1 0 8 】

9 6 ウェルプレートに、Bicarbonate buffer (100mM NaHCO<sub>3</sub> pH9.2~9.5) で希釈した各ファージ (ファージ 2 6 - 1 ~ 2 6 - 5 ; ファージ S 9 5 - 1 ; ファージ S 9 5 - 6 ; ファージ S 9 5 - 9 ; ファージ B 0 7 - 1 ; ファージ B 0 7 - 3 ; ファージ B 0 7 - 4 ; ファージ B 0 7 - 8 ; ファージ B 0 7 - 9 ; およびランダムファージ) 溶液を、ファージが  $1 \times 10^9$  個/well となるようにウェルにアプライし 2 時間静置した。次に Washing buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 43g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6g, NaCl 263g, Tween20 15ml / 3L 蒸留水) でプレートを 3 回洗浄後、Blocking buffer 300  $\mu$ l をアプライし、4 時間で一晩静置した。

#### 【 0 1 0 9 】

次にプレートを 3 回洗浄後、Blocking buffer (3% スキムミルク, 1% BSA / PBST) で 500 倍希釈した Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 (発売元 : 生化学工業株式会社) 50  $\mu$ l をそれぞれウェルにアプライし、3 時間静置した。次にプレートを 3 回洗浄後、PBST (3% スキムミルク + 1% BSA 入り) で 1000 倍希釈した Biotin-labeled anti-mouse IgG1 (入手先 : A B c t o n D i c k i n s o n c o . ) 50  $\mu$ l をウェルにアプライし、2 時間静置した。

#### 【 0 1 1 0 】

次にプレートを 6 回洗浄後、PBST (3% スキムミルク + 1% BSA 入り) で 1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識 streptavidin (入手先 : Roche, Mannheim, Germany) を 50  $\mu$ l アプライし、室温で 1 時間静置した。その後プレートを 6 回洗浄し、Attaphos<sup>TM</sup> substrate buffer (プロメガ株式会社製) 50  $\mu$ l をウェルにアプライし、遮光の状態が発色するまで放置した。蛍光強度を Cyto<sup>TM</sup> Fluor II (日本パーセプティブ株式会社製) で測定した。

#### 【 0 1 1 1 】

(結果)

ファージ 2 6 - 1 ~ 2 6 - 5 についての結果を図 2 に示した。横軸は各ファージを示し、縦軸は E L I S A 法における蛍光強度を示す。図 2 の結果より、実施例 1 において選抜したファージのうち、ファージ 2 6 - 2 および 2 6 - 3 のみが、Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 と結合するということが分かった。

#### 【 0 1 1 2 】

またファージ S 9 5 - 1、ファージ S 9 5 - 6 およびファージ S 9 5 - 9 についての結

果を図9に示した。横軸は各ファージを示し、縦軸はELISA法における蛍光強度を示す。図9の結果より、実施例1において選抜したファージのうち、ファージS95-1のみが、Cry j 1モノクローナル抗体S95と結合するということが分かった。

【0113】

またファージB07-1、ファージB07-3、ファージB07-4、ファージB07-8およびファージB07-9についての結果を図10に示した。横軸は各ファージを示し、縦軸はELISA法における蛍光強度を示す。図10の結果より、実施例1において選抜したファージのうち、ファージB07-8およびB07-9のみが、Cry j 1モノクローナル抗体B07と結合するということが分かった。

【0114】

なお図2、9、10において「\*」を付した結果は、陰性対照であるランダムファージの結果に対して危険率5%未満( $P < 0.05$ )において有意差があったことを示すものである。

【0115】

〔実施例3：ファージ26-2、26-3の抗Cry j 1モノクローナル抗体との結合性〕  
(方法)

1.0  $\mu\text{g/ml}$ となるようにCry j 1 (発売元：生化学工業株式会社)を96ウェルプレートにコートし、Cry j 1に対するCry j 1モノクローナル抗体026 (発売元：生化学工業株式会社)の結合を、ファージ26-2または26-3を用いて阻害した(ELISA inhibition)。陰性対照として、ランダムファージを用いた。具体的には、以下のよう

【0116】

ファージ26-2、26-3およびランダムファージを、それぞれ $9.5 \times 10^{11}$ 個/ $50 \mu\text{l}$ となるようにBlocking buffer (3%スキムミルク, 1%BSA / PBST)で、5倍ずつ段階希釈を行なった。希釈したそれぞれのファージ溶液 $50 \mu\text{l}$ と、500倍希釈したCry j 1モノクローナル抗体026 (発売元：生化学工業株式会社)  $50 \mu\text{l}$ とを混合し、4で一晚プレインキュベーションを行なった。

【0117】

96ウェルプレートに、Bicarbonate buffer (100mM  $\text{NaHCO}_3$  pH9.2~9.5)で $1 \mu\text{g/ml}$ となるように、希釈したスギ花粉主要抗原Cry j 1 (発売元：生化学工業株式会社)  $50 \mu\text{l}$ をウェルにアプライし、2時間静置した。次にWashing buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  43g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3.6g,  $\text{NaCl}$  263g, Tween20 15ml / 3L 蒸留水)で96ウェルプレートを3回洗浄後、Blocking buffer  $300 \mu\text{l}$ をアプライし、4で一晚静置した。

【0118】

次にプレートを3回洗浄後、プレインキュベーションしていたサンプル $50 \mu\text{l}$ をそれぞれウェルにアプライし、3時間静置した。次に96ウェルプレートを3回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り)で1000倍希釈したBiotin-labeled anti-mouse IgG1 (入手先：A Becton Dickinson co.)  $50 \mu\text{l}$ をウェルにアプライし、2時間静置した。PBSTの組成は、「 $\text{NaCl}$  4g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{KCl}$  1.45g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g, Tween20 15ml / 500ml 蒸留水」である(以下同じ)。

【0119】

次に96ウェルプレートを6回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り)で1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識streptavidin (入手先：Roche, Mannheim, Germany)を $50 \mu\text{l}$ アプライし、室温で1時間静置した。その後96ウェルプレートを6回洗浄し、Attophos<sup>TM</sup> substrate buffer (プロメガ株式会社製)  $50 \mu\text{l}$ をウェルにアプライし、遮光の状態で発色するまで放置した。蛍光強度をCyto<sup>TM</sup> Fluor II (日本パーセプティブ株式会社製)で測定した。

【0120】

(結果)

結果を図3に示した。丸のシンボルはファージ26-2の結果を示し、三角のシンボル

10

20

30

40

50

はファージ 26 - 3 の結果を示し、ひし形のシンボルはランダムファージの結果を示した。図 3 の結果によれば、ファージ 26 - 3 よりもファージ 26 - 2 の方が強い阻害を示すということがわかった。よって、Cry j 1モノクローナル抗体 026 に対する特異性は、ファージ 26 - 2 の方が高いということが分かった。

【0121】

〔実施例 4：ペプチド 26 - 2 と抗 Cry j 1モノクローナル抗体との結合性〕

(方法)

ファージ 26 - 2 が提示するペプチド (ペプチド 26 - 2 : H L P P S Y Y L S R N N ; 配列番号 2)、およびコントロールペプチド (T T T R F S Q D M A W W ; 配列番号 7) を化学合成により調製し、以下の試験に用いた。

10

【0122】

1.0 μg/ml となるように Cry j 1 (発売元：生化学工業株式会社) を 96 ウェルプレートにコートし、Cry j 1 に対する Cry j 1モノクローナル抗体 026 の結合を、ペプチド 26 - 2 を用いて阻害した (E L I S A inhibition)。陰性対照として、上記コントロールペプチドを用いた。具体的には、以下のようにした。

【0123】

ペプチド 26 - 2 およびコントロールペプチドを、それぞれ 1.0mg/ml となるように Blocking buffer (3%スキムミルク, 1%BSA入りPBST) で 5 倍希釈を行なった。希釈したそれぞれのペプチド溶液 50 μl と、1000倍希釈した Cry j 1モノクローナル抗体 026 (発売元：生化学工業株式会社) 50 μl とを混合し、4 で一晩プレインキュベートした。

20

【0124】

96 ウェルプレートに、Bicarbonate buffer (100mM NaHCO<sub>3</sub> pH9.2~9.5) で 1 μg/ml となるように、希釈したスギ花粉主要抗原 Cry j 1 (発売元：生化学工業株式会社) 50 μl をウェルにアプライし、2 時間静置した。次に Washing buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 43g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6g, NaCl 263g, Tween20 15ml / 3L 蒸留水) でプレートを 3 回洗浄後、Blocking buffer 300 μl をアプライし、4 で一晩静置した。

【0125】

次に 96 ウェルプレートを 3 回洗浄後、プレインキュベートしていたサンプル 50 μl をそれぞれウェルにアプライし、3 時間静置した。次に 96 ウェルプレートを 3 回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り) で 1000倍希釈した Biotin-labeled anti-mouse IgG1 (入手先：A Becton Dickinson co.) 50 μl をウェルにアプライし、2 時間静置した。次に 96 ウェルプレートを 6 回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り) で 1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識 streptavidin (入手先：Roche, Mannheim, Germany) を 50 μl アプライし、室温で 1 時間静置した。その後 96 ウェルプレートを 6 回洗浄し、Attophos<sup>TM</sup> substrate buffer (プロメガ株式会社製) 50 μl をウェルにアプライし、遮光の状態を発色するまで放置した。蛍光強度を Cyto<sup>TM</sup> Fluor II (日本パーセプティブ株式会社製) で測定した。

30

【0126】

(結果)

結果を図 4 に示した。丸のシンボルはペプチド 26 - 2 の結果を示し、四角のシンボルはコントロールペプチドの結果を示した。図 4 の結果より、ペプチド 26 - 2 の濃度を増加するに連れて阻害率が増加し、最終的には 100% の阻害を示すということが分かった。したがって、ペプチド 26 - 2 はエピトープ構造を有しているということが分かった。

40

【0127】

〔実施例 5：ペプチド 26 - 2、ペプチド S 95 - 1、ペプチド B 07 - 1、ペプチド B 07 - 9 と抗 Cry j 1モノクローナル抗体との結合性〕

ペプチド 26 - 2 (1mg/ml) および Cry j 1 (100 μg/ml) を、Blocking buffer (3%スキムミルク, 1%BSA / PBST) で 5 倍ずつ段階希釈した溶液 50 μl と、5000倍希釈した Cry j 1モノクローナル抗体 026 (発売元：生化学工業株式会社) 50 μl とをそれぞれ混合し、4 で一晩プレインキュベートした。

50

## 【0128】

またペプチド S 9 5 - 1 (1mg/ml) および Cry j 1 (100 µg/ml) を、Blocking buffer (3%スキムミルク, 1%BSA / PBST) で 5 倍ずつ段階希釈した溶液 50 µl と、2500倍希釈した Cry j 1モノクローナル抗体 S 9 5 50 µl とをそれぞれ混合し、4 で一晩プレインキュベートした。

## 【0129】

またペプチド B 0 7 - 1、ペプチド B 0 7 - 9 (1mg/ml) および Cry j 1 (100 µg/ml) を、Blocking buffer (3%スキムミルク, 1%BSA / PBST) で 5 倍ずつ段階希釈した溶液 50 µl と、5000倍希釈した Cry j 1モノクローナル抗体 B 0 7 50 µl とをそれぞれ混合し、4 で一晩プレインキュベートした。

10

## 【0130】

96 ウェルプレートに Bicarbonate buffer (100mM NaHCO<sub>3</sub> pH9.2~9.5) で 1 µg/ml となるように、希釈したスギ花粉主要抗原 Cry j 1 (発売元: 生化学工業株式会社) 50 µl をウェルにアプライし、2 時間静置した。次に Washing buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 43g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6g, NaCl 263g, Tween20 15ml / 3L 蒸留水) で 96 ウェルプレートを 3 回洗浄後、Blocking buffer 300 µl をアプライし、4 で一晩静置した。

## 【0131】

次に 96 ウェルプレートを 3 回洗浄後、プレインキュベートしていたサンプル 50 µl をそれぞれウェルにアプライし、3 時間静置した。次に 96 ウェルプレートを 3 回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り) で 1000倍希釈した Biotin-labeled anti-mouse IgG1 (入手先: A Becton Dickinson co.) 50 µl をウェルにアプライし、2 時間静置した。次に 96 ウェルプレートを 6 回洗浄後、PBST (3%スキムミルク + 1%BSA入り) で 1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識 streptavidin (入手先: Roche, Mannheim, Germany) を 50 µl アプライし、室温で 1 時間静置した。その後 96 ウェルプレートを 6 回洗浄し、Attophos<sup>TM</sup> substrate buffer (プロメガ株式会社製) 50 µl をウェルにアプライし、遮光の状態が発色するまで放置した。蛍光強度を Cyto<sup>TM</sup> FluorII (日本パーセプティブ株式会社製) で測定した。

20

## 【0132】

なお陰性対照として、9 アミノ酸からなる Bradykinin (R P P G F S P F R: 配列番号 18) を用いた。

30

## 【0133】

(結果)

図 1 1 にペプチド 2 6 - 2 の結果を示した。同図中、四角のシンボルは Cry j 1 に対するモノクローナル抗体の結合をペプチド 2 6 - 2 で阻害をかけた場合の結果を示し、ひし形のシンボルはポジティブコントロールとして Cry j 1 で阻害をかけた場合の結果を示し、三角のシンボルは Bradykinin で阻害をかけた場合の結果を示す。図 1 2 の結果より、ペプチド 2 6 - 2 は Cry j 1 に対する抗体の結合を完全に阻害することができるということが分かった。またペプチド 2 6 - 2 のアミノ酸配列と、Cry j 1 のアミノ酸配列とを比較したところ、相同性のある部分がなかったことから、このペプチドは Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 に対するコンフォームーションなエピトープであることが示唆された。

40

## 【0134】

また図 1 2 にペプチド S 9 5 - 1 の結果を示した。同図中、四角のシンボルは Cry j 1 に対するモノクローナル抗体の結合をペプチド S 9 5 - 1 で阻害をかけた場合の結果を示し、ひし形のシンボルはポジティブコントロールとして Cry j 1 で阻害をかけた場合の結果を示し、三角のシンボルは Bradykinin で阻害をかけた場合の結果を示す。図 1 2 の結果より、ペプチド S 9 5 - 1 は Cry j 1 に対する抗体の結合を完全に阻害することができるということが分かった。またペプチド S 9 5 - 1 のアミノ酸配列と、Cry j 1 のアミノ酸配列とを比較したところ、相同性のある部分がないことから、このペプチドは Cry j 1モノクローナル抗体 S 9 5 に対するコンフォームーションなエピトープであることが示唆された。

50

## 【0135】

また図13にペプチドB07-1およびB07-9の結果を示した。同図中、四角のシンボルはCry j 1に対するモノクローナル抗体の結合をペプチドB07-9で阻害をかけた場合の結果を示し、丸のシンボルはCry j 1に対するモノクローナル抗体の結合をペプチドB07-1で阻害をかけた場合の結果を示し、ひし形のシンボルはポジティブコントロールとしてCry j 1で阻害をかけた場合の結果を示し、三角のシンボルはBradykininで阻害をかけた場合の結果を示す。図13の結果より、ペプチドB07-9はCry j 1に対する抗体の結合を完全に阻害することができるということが分かった。またペプチドB07-9のアミノ酸配列とCry j 1のアミノ酸配列とを比較したところ、相同性のある部分がないことから、このペプチドはCry j 1モノクローナル抗体B07に対するコンフォメーションなエピトープであることが示唆された。

10

## 【0136】

〔実施例6：ペプチド26-2とスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性〕

（材料）

スギ花粉症患者（患者A～P）血清は、たかのはし中央病院耳鼻咽喉科（広島市）より入手し、以下の試験に用いた。なお上記スギ花粉症患者（患者A～P）は、15歳から70歳（男女問わず）で、スギ花粉アレルギーに対するラスト値4以上を示す患者である。

## 【0137】

（方法）

1.0 $\mu$ g/mlとなるようにCry j 1（生化学工業株式会社）を96ウェルプレートにコートし、Cry j 1に対するスギ花粉症患者血清IgE抗体の結合を、ペプチド26-2（3.125 $\mu$ g）、Cry j 1（0.250 $\mu$ g）を用いて阻害した（ELISA inhibition）。

20

## 【0138】

ペプチド26-2（3.125 $\mu$ g）およびCry j 1（0.250 $\mu$ g）を、Blocking buffer（3%スキムミルク、1%BSA / PBST）に溶解させた溶液50 $\mu$ lと、20倍希釈した患者血清50 $\mu$ lとを混合し、4℃で一晩ブレインキュベートした。

## 【0139】

96ウェルマイクロタイタープレートに、Bicarbonate buffer（100mM NaHCO<sub>3</sub> pH9.2～9.5）で1 $\mu$ g/mlとなるように、希釈したスギ花粉主要抗原Cry j 1（発売元：生化学工業株式会社）50 $\mu$ lをウェルにアプライし、2時間静置した。次にWashing buffer（Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 43g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6g, NaCl 263g, Tween20 15ml / 3L 蒸留水）で96ウェルプレートを3回洗浄後、Blocking buffer 300 $\mu$ lをアプライし、4℃で一晩静置した。

30

## 【0140】

次に96ウェルプレートを3回洗浄後、ブレインキュベートしていたサンプル50 $\mu$ lをそれぞれウェルにアプライし、4時間静置した。次に96ウェルプレートを3回洗浄後、PBST（3%スキムミルク+1%BSA入り）で1000倍希釈したBiotin-labeled anti-human IgE（入手先：chain-specific, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）50 $\mu$ lをウェルにアプライし、2時間静置した。次に96ウェルプレートを6回洗浄後、PBST（3%スキムミルク+1%BSA入り）で1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識streptavidin（入手先：Roche, Mannheim, Germany）を50 $\mu$ lアプライし、室温で1時間静置した。その後96ウェルプレートを6回洗浄し、Attophos<sup>TM</sup> substrate buffer（プロメガ株式会社製）50 $\mu$ lをウェルにアプライし、遮光の状態で発色するまで放置した。蛍光強度をCyto<sup>TM</sup> Fluor II（日本パーセプティブ株式会社製）で測定した。

40

## 【0141】

（結果）

結果を図5に示した。横軸に各スギ花粉症患者を示し、縦軸に蛍光強度をユニット（U）で示した。なお1U = 100蛍光強度である。同図中白抜きの棒グラフはCry j 1をコートしなかった場合の結果を示し、黒塗りの棒グラフはCry j 1に対するスギ花粉症患者血清IgEの結合をCry j 1で阻害した場合の結果を示し、斜線の棒グラフはCry j 1に対するスギ花粉症患者血清IgEの結合をペプチド26-2で阻害した場合の結果を示した

50



。

【0142】

図5の結果より、ペプチド26-2(3.125 $\mu$ g)は、Cry j 1(0.250 $\mu$ g)を用いた場合と同様に、Cry j 1に対するスギ花粉症患者血清IgE抗体の結合を阻害するということが分かった。したがって、ペプチド26-2には、Cry j 1のIgEエピトープが含まれているということが分かった。

【0143】

さらに、ペプチド26-2のアミノ酸配列(配列番号2)は、Cry j 1のアミノ酸配列(配列番号1)上に存在しないものであった。したがって、ペプチド26-2にはCry j 1の高次構造IgEエピトープが含まれているということが分かった。

10

【0144】

〔実施例7：ペプチド26-2、ペプチドS95-1、B07-9とスギ花粉症患者血清IgE抗体との結合性〕

(牛血清アルブミンと各種ペプチドとのカップリング)

各種ペプチドを96ウェルプレート上に固定化すべく、牛血清アルブミン(BSA)とカップリングさせることとした。

【0145】

(A法)まず45mg/mlのBSA溶液30 $\mu$ lと0.1Mリン酸水素二水素ナトリウム(pH6.2)200 $\mu$ lとを混合した。50mg/mlのSulfo-NHS(PIERCE社製)溶液20 $\mu$ l添加して混合した。さらに50mg/mlのEDC(PIERCE社製)を20 $\mu$ l添加して混合し、室温で20分間インキュベートした。続いて10mg/mlの各ペプチド溶液50 $\mu$ lと50mM MES(pH 6.0)1000 $\mu$ lとを混合した溶液を添加して、室温で2時間インキュベートした。反応物にPBS-TN(PBS, 0.02% Tween20, 0.05% sodium azide, pH7.4)を加えながら、Microcon YM-3(MILLIPORE社製)を用いて限外ろ過を行なった。

20

【0146】

(B法)まず10mg/mlのペプチド溶液100 $\mu$ lと0.1Mリン酸水素二水素ナトリウム(pH6.2)600 $\mu$ lとを混合した。100mg/mlのSulfo-NHS(PIERCE社製)溶液70 $\mu$ lを添加して混合した。さらに50mg/mlのEDC(PIERCE社製)を70 $\mu$ l混合して混合し、室温で20分間インキュベートした。続いて45mg/mlのBSA溶液200 $\mu$ lと50mM MES(pH 6.0)3000 $\mu$ lとを混合した溶液を追加して室温で2時間インキュベートした。反応物にPBS-TN(PBS, 0.02% Tween20, 0.05% sodium azide, pH7.4)を加えながら、Microcon YM-3(MILLIPORE社製)を用いて限外ろ過を行なった。

30

【0147】

(BSAとカップリングした各種ペプチドと患者血清IgEとの結合性)

BSAとカップリングさせたペプチド(ペプチド26-2、ペプチドS95-1、ペプチドB07-9)と2倍濃度のBicarbonate buffer(100mM NaHCO<sub>3</sub> pH9.2~9.5)とを1:1で混合し、96ウェルプレートのウェルにアプライし、室温で2時間静置した。

【0148】

Washing buffer(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 43g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6g, NaCl 263g, Tween20 15ml / 3L蒸留水)で96ウェルプレートを3回洗浄後、Blocking buffer(3%スキムミルク, 1%BSA / PBS)を300 $\mu$ lアプライし、4で一晩静置した。

40

【0149】

96ウェルプレートを3回洗浄後、(3%スキムミルク+1%BSA)/PBST(NaCl 4g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.1g, KCl 1.45g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, Tween20 15ml / 500ml蒸留水)でスギ花粉症患者血清(患者A~T)を10倍希釈し、1時間インキュベートしたものを、ウェルに50 $\mu$ lにアプライし、4時間静置した。

【0150】

96ウェルプレートを3回洗浄後、(3%スキムミルク+1%BSA / PBSTで1000倍希釈したBiotin-labeled anti-human IgE(入手先: chain-specific, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)をウェルに50 $\mu$ lアプライし、2.5時間静置した。

50

## 【0151】

96 ウェルプレートに4回洗浄後、(3%スキムミルク+1%BSA) / PBSTで1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識streptavidin(入手先:Roche, Mannheim, Germany)を50 $\mu$ lアプライし、室温で1.5時間静置した。

## 【0152】

96 ウェルプレートに5回洗浄後、Attophos<sup>TM</sup> substrate buffer(プロメガ株式会社製)をwellに50 $\mu$ lアプライし、遮光の状態が発色するまで放置した。蛍光強度をCyto Fluor II(日本パーセプティブ株式会社製)で測定した。なお陰性対照として、前出のBradykininを用いた。

## 【0153】

なおスギ花粉症患者(患者A~T)血清は、たかのはし中央病院耳鼻咽喉科(広島市)より入手し、以下の試験に用いた。なお上記スギ花粉症患者(患者A~T)は、15歳から70歳(男女問わず)で、スギ花粉アレルゲンに対するラスト値4以上を示す患者である。

## 【0154】

(結果)

結果を図14に示した。横軸に各スギ花粉症患者を示し、縦軸に蛍光強度をユニット(U)で示した。なお1U=100蛍光強度である。また同図中、白抜きの棒グラフはペプチド26-2に対する各スギ花粉症患者血清IgEの結合度を示す結果であり、黒塗りの棒グラフはペプチドS95-1に対する各スギ花粉症患者血清IgEの結合度を示す結果であり、斜線の棒グラフはペプチドB07-9に対する各スギ花粉症患者血清のIgE結合を示す結果であり、縦しまの棒グラフは陰性対照であるBradykininに対する各スギ花粉症患者血清IgEの結合度を示す結果である。なお同図において「\*」を付した結果は、陰性対照であるBradykininの結果に対して危険率5%未満( $P < 0.05$ )において有意差があったことを示すものである。

## 【0155】

図14の結果より、ペプチドS95-1は、スギ花粉症患者の20人中4人の血清IgEと確かな結合活性を有するということが分かった。よってペプチドS95-1はIgEエピトープであることが明らかとなった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0156】

以上のように本発明によれば、スギ花粉アレルゲンのIgEエピトープのうち、特に高次構造エピトープ(以下「高次構造IgEエピトープ」という)を含むペプチド、そのペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそのペプチドと結合する抗体を提供すること、並びにそれらを用いてスギ花粉症の治療薬、診断キット等を提供することができ、スギ花粉症のメカニズムの解明、スギ花粉症の治療および改善、スギ花粉症の容易かつ詳細な診断等を行なうことが可能となる。

## 【0157】

したがって、本発明はスギ花粉症の診断薬および治療薬等の開発を行なう医薬品産業等において特に有効利用が可能である。また本発明は、スギ花粉症根絶に大いに寄与するものである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0158】

【図1】抗Cry j 1モノクローナル抗体(Cry j 1モノクローナル抗体026)を用いたPanningにおいて最終的に選抜されたファージが提示するアミノ酸配列を示す図である。

【図2】実施例1において選抜されたファージ(ファージ26-1、ファージ26-2、ファージ26-3、ファージ26-4、ファージ26-5)と抗Cry j 1モノクローナル抗体(Cry j 1モノクローナル抗体026)との結合性を、ELISA法により検討した結果を示すヒストグラムである。

【図3】実施例2において選抜されたファージ(ファージ26-2、ファージ26-3)

10

20

30

40

50

と抗Cry j 1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6) との結合性を、E L I S A inhibitionにより検討した結果を示す折れ線図である。

【図 4】化学合成により調製したペプチド 2 6 - 2 と抗Cry j 1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル抗体 0 2 6) との結合性を、E L I S A inhibitionにより検討した結果を示す折れ線図である。

【図 5】化学合成により調製したペプチド 2 6 - 2 とスギ花粉症患者血清 I g E 抗体との結合性を、E L I S A inhibitionにより検討した結果を示すヒストグラムである。

【図 6】( a ) はシーケンシャル I g E エピトープを説明する模式図であり、( b ) はコンフォーメーション I g E エピトープを説明する模式図である。

【図 7】抗Cry j 1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル抗体 S 9 5) を用いたPa 10  
nningにおいて最終的に選抜されたファージが提示するアミノ酸配列を示す図である。

【図 8】抗Cry j 1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル抗体 B 0 7) を用いたPa  
nningにおいて最終的に選抜されたファージが提示するアミノ酸配列を示す図である。

【図 9】実施例 1 において選抜されたファージ (ファージ S 9 5 - 1、ファージ S 9 5 -  
6 およびファージ S 9 5 - 9) と抗Cry j 1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル  
抗体 S 9 5) との結合性を、E L I S A 法により検討した結果を示すヒストグラムである  
。

【図 1 0】実施例 1 において選抜されたファージ (ファージ B 0 7 - 1、ファージ B 0 7  
- 3、ファージ B 0 7 - 4、ファージ B 0 7 - 8 およびファージ B 0 7 - 9) と抗Cry j  
1モノクローナル抗体 (Cry j 1モノクローナル抗体 B 0 7) との結合性を、E L I S A 法 20  
により検討した結果を示すヒストグラムである。

【図 1 1】実施例 5 においてペプチド 2 6 - 2 とCry j 1モノクローナル抗体 0 2 6 との  
結合性を調べた結果を示す折れ線図である。

【図 1 2】実施例 5 においてペプチド S 9 5 - 1 とCry j 1モノクローナル抗体 S 9 5 と  
の結合性を調べた結果を示す折れ線図である。

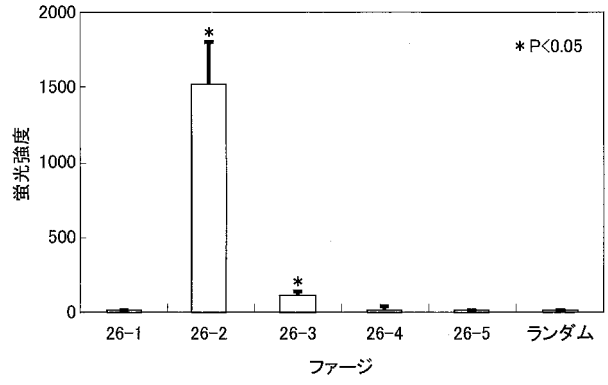
【図 1 3】実施例 5 においてペプチド B 0 7 - 1 およびペプチド B 0 7 - 9 とCry j 1モ  
ノクローナル抗体 B 0 7 との結合性を調べた結果を示す折れ線図である。

【図 1 4】実施例 7 において、ペプチド 2 6 - 2、ペプチド S 9 5 - 1、B 0 7 - 9 とス  
ギ花粉症患者血清 I g E 抗体との結合性を調べた結果を示すヒストグラムである。

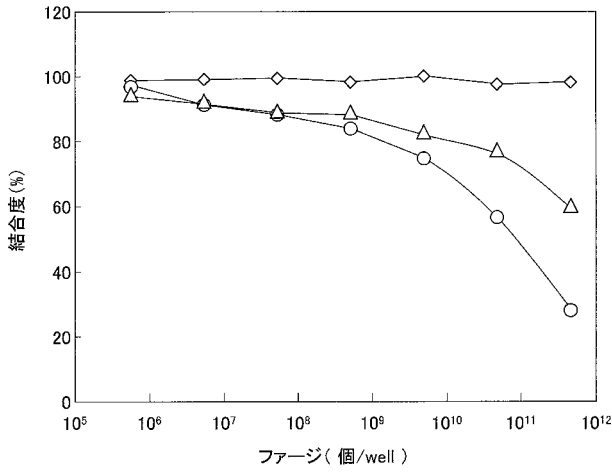
【 図 1 】

モノクローナル抗体	ファージ:アミノ酸配列
026	26-1: ATKKATSTYATK (1 / 10)
	26-2: HLPPSYYSRNN (6 / 10)
	26-3: HPDFDLNRS LMD (1 / 10)
	26-4: APTFDMNPLRTR (1 / 10)
	26-5: YARTPNRDFTPG (1 / 10)
	26-6: HLPPSYYSRNN (6 / 10)
	26-7: HLPPSYYSRNN (6 / 10)
	26-8: HLPPSYYSRNN (6 / 10)
	26-9: HLPPSYYSRNN (6 / 10)
	26-10: HLPPSYYSRNN (6 / 10)

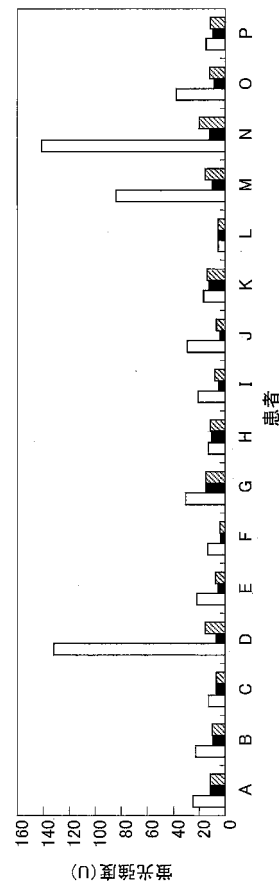
【 図 2 】



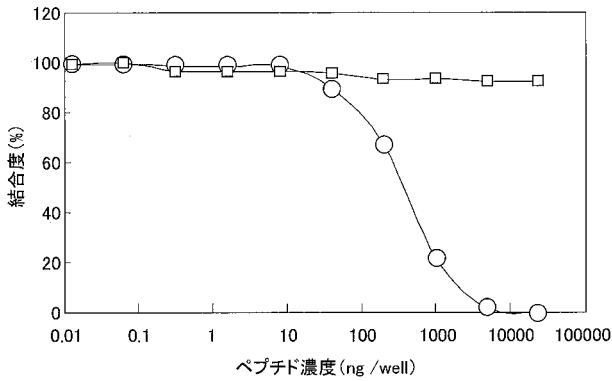
【 図 3 】



【 図 5 】

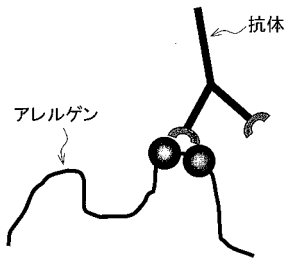


【 図 4 】

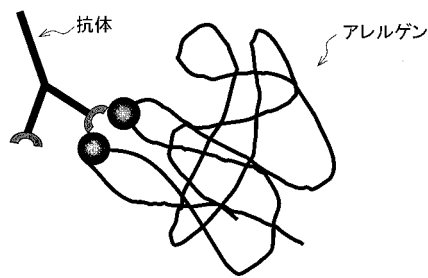


【 図 6 】

(a)



(b)



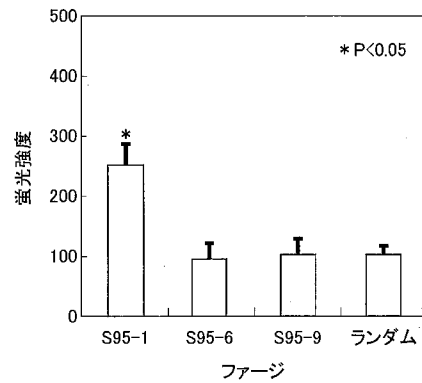
【 図 8 】

モノクローナル抗体	ファージ:アミノ酸配列
B07	B07-1: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)
	B07-2: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)
	B07-3: ISPPQHPPHWFR (1 / 10)
	B07-4: QAPHWWYTAPML (1 / 10)
	B07-5: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)
	B07-6: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)
	B07-7: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)
	B07-8: NEYQAPPHWTKK (1 / 10)
	B07-9: LPRYSFPVQAPV (1 / 10)
	B07-10: QGPHWWRLEGDP (6 / 10)

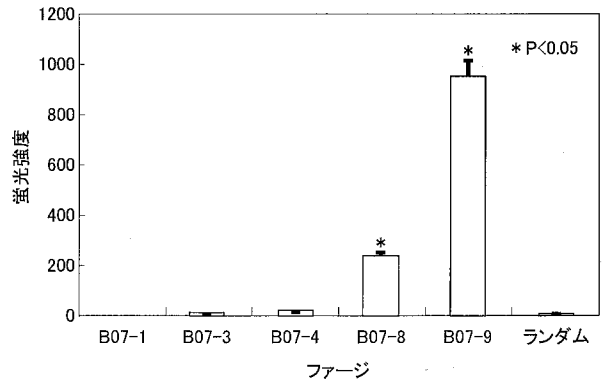
【 図 7 】

モノクローナル抗体	ファージ:アミノ酸配列
S95	S95-1: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-2: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-3: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-4: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-5: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-6: HQYQRDHGPKKS (1 / 10)
	S95-7: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-8: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)
	S95-9: KMHTASLSHPLM (1 / 10)
	S95-10: TYSPFHSFTSIP (8 / 10)

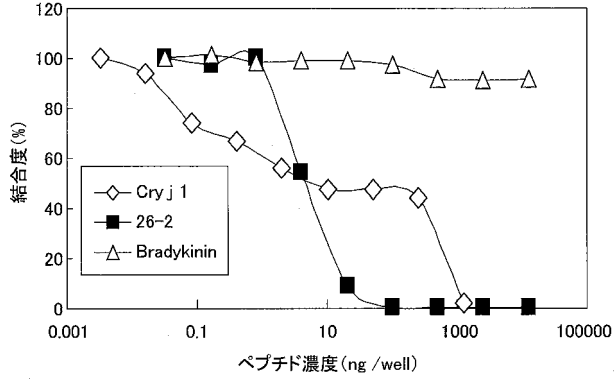
【 図 9 】



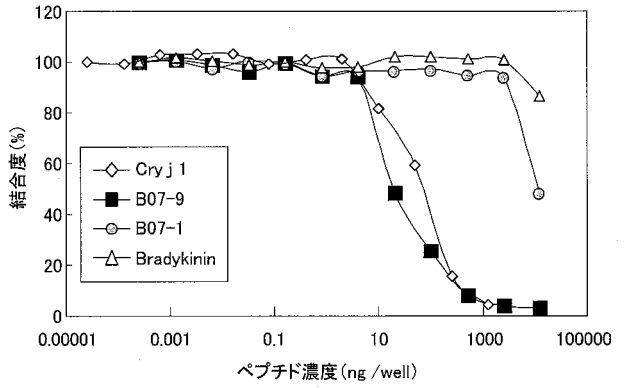
【 図 10 】



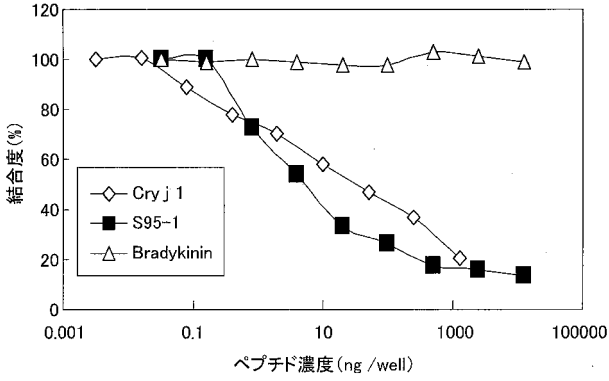
【 図 1 1 】



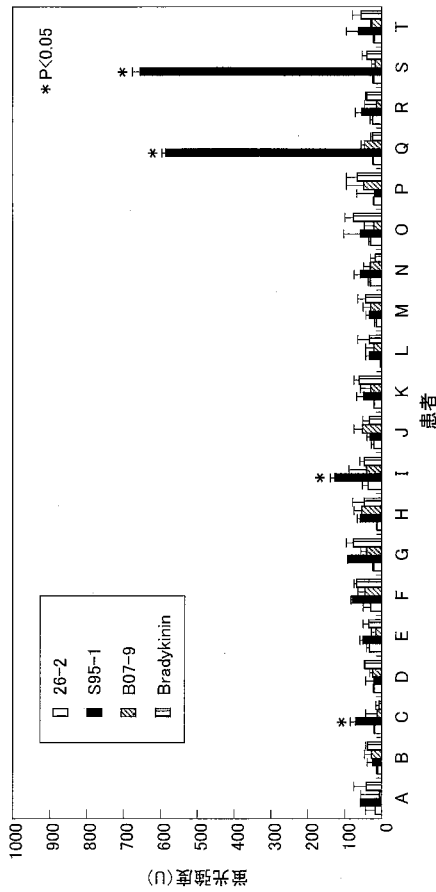
【 図 1 3 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2006280210000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 16/16 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/415	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/16	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	Q
	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 秋 庸裕

広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院先端物質科学研究科内

(72)発明者 河本 正次

広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院先端物質科学研究科内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA01 DA05 EA04 GA11 HA11  
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA59 NA14 ZB13  
 4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 DD88 EE01  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA16 CA30 DA76 DA86 EA20  
 EA50 FA33 FA41 FA74