

(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2006-520184

(P2006-520184A)

(43) 公表日 平成18年9月7日(2006.9.7)

(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
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-547452 (P2004-547452)	(71) 出願人	503055934
(86) (22) 出願日	平成15年10月31日 (2003.10.31)		アルカベロ アクチェセルスカブ
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月28日 (2005.6.28)		デンマーク デーコー2970 ヘルスホ
(86) 国際出願番号	PCT/DK2003/000744		ルム ベーグ アレ 6-8
(87) 国際公開番号	W02004/039834	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成16年5月13日 (2004.5.13)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	PA200201686	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成14年11月1日 (2002.11.1)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100084663
(31) 優先権主張番号	60/422, 983		弁理士 箱田 篤
(32) 優先日	平成14年11月1日 (2002.11.1)	(74) 代理人	100093300
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えタンパク質変種

(57) 【要約】

本発明は、免疫治療成分として有用な新規組換えタンパク質変種に関する。本発明は、前記タンパク質変種をコードするDNA配列及び前記タンパク質変種を含む組成物にも関する。

。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然に存在するアレルゲンに対して防御免疫応答を誘導することのできる組換えタンパク質変種であって、

- i) 天然に存在するアレルゲンに構造的に類似した三次元折りたたみ様式を有する足場タンパク質の変種であり、
- ii) 前記足場タンパク質に比較して、少なくとも一つの非変異アミノ酸残基によって隔てられた 2 以上の一次変異を含むタンパク質変種であって、前記各一次変異が、天然に存在するアレルゲン中の対応する位置のアミノ酸残基と同一又は相同な少なくとも一つのアミノ酸残基を前記足場タンパク質に導入する変異であり、
- iii) 前記足場タンパク質に比較して、天然に存在するアレルゲンに特異的な IgE 抗体へのアフィニティーおよび/または結合能が増加した、前記タンパク質変種。

10

【請求項 2】

天然に存在するアレルゲンに比べて低下したヒスタミン遊離誘導能を有する、請求項 1 記載のタンパク質変種。

【請求項 3】

ヒスタミン遊離誘導能が 2 ~ 10,000 分の 1 に低下している、請求項 2 に記載のタンパク質変種。

【請求項 4】

更に、天然に存在するアレルゲンの対応する位置には存在しないアミノ酸残基を足場タンパク質に導入する 1 以上の二次変異を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

20

【請求項 5】

2 ~ 50、好ましくは 2 ~ 40、より好ましくは 3 ~ 25、更に好ましくは 4 ~ 15、最も好ましくは 5 ~ 12 の一次変異を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 6】

足場タンパク質が天然に存在するアレルゲンと 20 ~ 60%、好ましくは 30 ~ 50% のアミノ酸同一性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 7】

天然に存在するアレルゲンに比較して、前記天然に存在するアレルゲンに対して特異的な抗体に対する結合能が低下している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

30

【請求項 8】

結合能が、天然のアレルゲンの抗体結合能に対して少なくとも 10%、好ましくは 50%、および 100% まで増加している、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 9】

一次変異の少なくとも一つが置換である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 10】

少なくとも一つの一次変異の導入が欠失および/または付加である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

40

【請求項 11】

デコンボリューションした CD-スペクトルが、天然に存在するアレルゲンのデコンボリューションした CD-スペクトルに比較して、30% 未満、好ましくは 20% 未満、更に好ましくは 10% 未満しか偏差のない、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 12】

全ての一次変異が約 600-900 ² の面積を有する表面領域内に位置する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 13】

一次変異が表面露出アミノ酸の変異を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載のタン

50

パク質変種。

【請求項 1 4】

変異されるアミノ酸残基が20%、好ましくは30%、より好ましくは40%、最も好ましくは50%を超える溶媒接近性を有する、請求項 1 3 記載のタンパク質変種。

【請求項 1 5】

1 以上の変異が部位特異的変異導入によって導入される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 1 6】

1 以上の変異がDNAシャッフリングによって導入される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

10

【請求項 1 7】

遺伝子ライブラリ法によって得られる、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 1 8】

以下の工程を含む、天然に存在するアレルゲンに対する防御免疫応答を誘導することのできる組換えタンパク質変種を作成する方法：

i) 天然に存在するアレルゲンと構造的に類似した三次元折りたたみ様式を有する足場タンパク質を選択する工程、

ii) 少なくとも一つの実変異アミノ酸残基によって隔てられた 2 以上の一次変異を前記足場タンパク質に導入する工程であって、前記各一次変異が、天然に存在するアレルゲン中の対応する位置のアミノ酸残基と同一又は相同な少なくとも一つのアミノ酸残基を前記足場タンパク質に導入する変異である、前記工程、

20

iii) 前記足場タンパク質に比較して、天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体へのアフィニティーおよび/または結合能が増加した、タンパク質変種。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載の方法によって得ることのできる産物。

【請求項 2 0】

天然に存在するアレルゲンが吸入アレルゲンである、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

【請求項 2 1】

天然に存在するアレルゲンが花粉アレルゲンである、請求項 2 0 記載のタンパク質変種。

30

【請求項 2 2】

天然に存在するアレルゲンが、ブナ目、モクセイ目、マツ目の花粉アレルゲンである、請求項 2 1 記載のタンパク質変種。

【請求項 2 3】

天然に存在するアレルゲンがBet v 1である、請求項 2 2 記載のタンパク質変種。

【請求項 2 4】

足場タンパク質がMal d 1である、タンパク質変種。

【請求項 2 5】

少なくとも 2 つの一次変異が、(E12V, E12I, E12M, E12L), P16A, (H40S, H40T), I43N, L44I, D47N, G65K, K70R, (E76H, E76R, E76K, Q76H), S107T, G108P, +109D, S110G, E129A, K152L, (P154S, P154T), P155S からなる群より選ばれ、場合により 1 以上の二次変異がN28X, 好ましくはN28T, K32X, 好ましくは K32Q, E45S, E96X, +159Xからなる群より選ばれる、請求項 2 4 記載のタンパク質変種。

40

【請求項 2 6】

配列番号 2 に記載の配列を含み、以下の一次変異を含む、請求項 2 4 記載のタンパク質変種 (rMal d 1 (2781)) : I43N, L44I, G65K, K70R, Q76H。

【請求項 2 7】

配列番号 3 に記載の配列を含み、以下の一次変異を含む、請求項 2 4 記載のタンパク質

50

変種 (rMal d 1 (2762)) :E12V、P16A、K152L、P155S、S107T、G108P、+109D、S110G。

【請求項 2 8】

(E12V, E12I, E12M, E12L), (H40S, H40T), (E76H, E76R, E76K), E129A, (P154S, P154T)からなる群より選ばれる少なくとも2つの一次変異を含み、場合により、E8X, N28X, K32X, E96X, +159Xからなる群より選ばれる1以上の二次変異を含む、請求項 2 4 記載のタンパク質変種。

【請求項 2 9】

Bet v 1の足場タンパク質がDau c 1である、請求項 2 3 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 0】

少なくとも2つの一次変異が、(S12V, S12L, S12I, S12M), S14P, E16A, P105A, A107P, (A148S, A148T), (I151L, I151V, I151M), (N153H, N153K, N153R), (+154S, +154T), (+155D, +155E), +156A, (+157Y, +157F), (+158N, +158Q), (K39S, K39T), (K44E, K44D), (V52I, V52M, V52L), (I54K, I54R, I54H), (T64K, T64R, T64H), (T65Y, T65F, T65W), (T67K, T67R, T67H), D86E, L91G, (G92D, G92E)からなる群より選ばれ、場合により1以上の二次変異がK32X, E42X, E59X, R69X, E95X, K122X, E8X, T10X, D25X, K32X, D46X, E59X, E95X, D108X, K122Xからなる群より選ばれる、請求項 2 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 1】

(S12V, S12L, S12I, S12M), S14P, E16A, P105A, A107P, (A148S, A148T), (I151L, I151V, I151M), (N153H, N153K, N153R), (+154S, +154T), (+155D, +155E), +156A, (+157Y, +157F), (+158N, +158Q)からなる群より選ばれる少なくとも2つの一次変異を含み、場合によりK32X, E42X, E59X, R69X, E95X, K122Xからなる群より選ばれる1以上の二次変異を含む、請求項 2 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 2】

(K39S, K39T), (K44E, K44D), (V52I, V52M, V52L), (I54K, I54R, I54H), (T64K, T64R, T64H), (T65Y, T65F, T65W), (T67K, T67R, T67H), D86E, L91G, (G92D, G92E)からなる群より選ばれる少なくとも2つの一次変異を含み、場合によりE8X, T10X, D25X, K32X, D46X, E59X, E95X, D108X, K122Xからなる群より選ばれる1以上の二次変異を含む、請求項 2 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 3】

天然に存在するアレルゲンがイネ目に由来する、請求項 2 0 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 4】

天然に存在するアレルゲンがキク目またはイラクサ目に由来する、請求項 2 0 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 5】

天然に存在するアレルゲンがハウスダストダニアレルゲンである、請求項 2 0 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 6】

天然に存在するアレルゲンがヒョウヒダニアレルゲンである、請求項 3 5 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 7】

天然に存在するアレルゲンがDer p 2である、請求項 3 6 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 8】

足場タンパク質がEur m 1である、請求項 3 7 記載のタンパク質変種。

【請求項 3 9】

足場タンパク質がLep d 2である、請求項 3 7 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 0】

D17L, D17I, D17V, D17M, S19P, Q32K, Q32R, Q32H, K33P, T35Q, T35N, N88K, N88R, N88H, T92N, T92Q, A95K, A95R, A95Hからなる群より選ばれる少なくとも2つの一次変異を含み、場合により、K6X, S22X, R30X, K76S, K81X, V114Xからなる群より選ばれる1以

上の二次変異を含む、請求項 3 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 1】

D45N, D45Q, N47K, N47R, N47H, K48T, K48S, T50K, T50R, T50H, K52E, K52D, L54K, L54R, L54H, E107K, E107R, E107M, H112D, H112E, T119I, T119L, T119V, T199Mからなる群より選ばれる少なくとも 2 つの一次変異を含み、場合により、K6X, S22X, K29X, R30X, K76X, K81Xからなる群より選ばれる 1 以上の二次変異を含む、請求項 3 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 2】

足場タンパク質が Gly d 2 である、請求項 3 7 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 3】

K2Q, K2N, K4D, K4E, K10N, K10Q, T14K, T14R, S22H, S22R, S22K, K39V, K39L, K39I, K39M, D45N, D45Q, T60L, T60V, T60I, T60M, Q63D, Q63E, K80V, K80L, K80I, K80M, T91S, H112D, H112E, R122I, R122V, R122L, R122Mからなる群より選ばれる少なくとも 2 つの一次変異を含み、場合により、K6X、好ましくは K6R または K6H、R30X、好ましくは R30K、R30H, F74X, 好ましくは F74Y, F74W, K81X, 好ましくは K81R または K81H, K88X, 好ましくは K88R または K88H, T90X, および V114X, 好ましくは V114L, V114I または V114Mからなる群より選ばれる 1 以上の二次変異を含む、請求項 4 2 記載のタンパク質変種。

10

【請求項 4 4】

天然に存在するアレルゲンがゴキブリアレルゲンである、請求項 2 0 記載のタンパク質変種。

20

【請求項 4 5】

天然に存在するアレルゲンが動物アレルゲン、好ましくは哺乳動物アレルゲンである、請求項 1 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 6】

天然に存在するアレルゲンがネコ、イヌ、またはウマ由来である、請求項 4 5 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 7】

天然に存在するアレルゲンが毒物アレルゲンである、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

30

【請求項 4 8】

天然に存在するアレルゲンが膜翅目由来である、請求項 4 7 記載のタンパク質変種。

【請求項 4 9】

天然に存在するアレルゲンがスズメバチ科、ミツバチ科、またはアリ科に由来する、請求項 4 8 記載のタンパク質変種。

【請求項 5 0】

天然に存在するアレルゲンが Ves v 5 である、請求項 4 9 記載のタンパク質変種。

【請求項 5 1】

天然に存在するアレルゲンが食物アレルゲンである、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項記載のタンパク質変種。

40

【請求項 5 2】

天然に存在するアレルゲンに対して免疫応答を調節する能力を有する組換えタンパク質変種であって、

i) 植物、草、食物、及びダニアレルゲンからなる群より選択され、

ii) 足場タンパク質の変種であり、前記足場タンパク質は天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と類似の三次元折りたたみ様式を有し、前記タンパク質変種は、前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲン中の対応する位置に存在する少なくとも 1 個のアミノ酸残基に同一である又は相同な少なくとも 1 個のアミノ酸残基を前記足場タンパク質中に導入する少なくとも 1 つの一次変異を含み、かつ

iii) 前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲンに特異的な IgE 抗体

50

に対するアフィニティー及び/又は結合能が増加している、前記タンパク質変種。

【請求項 5 3】

天然に存在するアレルゲンに対する免疫応答を調節する能力を有する組換えタンパク質変種であって、

i) 足場タンパク質の変種であり、前記足場タンパク質は前記天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と類似の三次元折りたたみ様式を有し、

ii) 前記足場タンパク質は、前記天然に存在するアレルゲンと 30 ~ 50 % の配列相同性を有し、

iii) 前記タンパク質変種は、前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲン中の対応する位置に存在する少なくとも 1 個のアミノ酸残基に同一である又は相同な少なくとも 1 個のアミノ酸残基を前記足場タンパク質中に導入する少なくとも 1 つの一次変異を含み、かつ

iv) 前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲンに特異的な IgE 抗体に対するアフィニティー及び/又は結合能が増加している、
前記タンパク質変種。

10

【請求項 5 4】

天然に存在するアレルゲンに対する免疫応答を調節する能力を有する組換えタンパク質変種であって、

i) 足場タンパク質の変種であり、前記足場タンパク質は天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と同様の三次元折りたたみ様式を有し、

ii) デコンボリューションした CD-スペクトルが、前記天然に存在するアレルゲンのデコンボリューション CD-スペクトルと比較して 30 % 未満、好ましくは 20 % 未満、なおさらに好ましくは 10 % 未満しか偏差が無く、

iii) 前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲン内の対応する位置に存在する少なくとも 1 個のアミノ酸残基に同一である又は相同な少なくとも 1 個のアミノ酸残基を前記足場タンパク質中に導入する少なくとも 1 つの一次変異を含み、かつ

iv) 前記足場タンパク質と比較して、前記天然に存在するアレルゲンに特異的な IgE 抗体に対するアフィニティー及び/又は結合能が増加している、
前記タンパク質変種。

20

【請求項 5 5】

医薬品として使用するための請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質変種。

30

【請求項 5 6】

アレルギーの治療又は予防用薬物製造のための請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種の使用。

【請求項 5 7】

請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の 2 種以上の組換えタンパク質変種を含んでなる組成物であって、各変種が、他の変種の少なくとも 1 つに存在しない少なくとも 1 つの一次変異を有することによって定義される、組成物。

【請求項 5 8】

2 ~ 12 種、好ましくは 3 ~ 10 種、さらに好ましくは 4 ~ 8 種、最も好ましくは 5 ~ 7 種の請求項 1 ~ 2 1 に記載の異なるタンパク質変種を含む、請求項 5 7 に記載の組成物。

40

【請求項 5 9】

医薬品として使用するための請求項 5 7 又は 5 8 に記載の組成物。

【請求項 6 0】

アレルギーを予防及び/又は治療するための医薬品製造のための請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 6 1】

請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種又は請求項 5 7 又は 5 8 に記載の組成物を含むことを特徴とする医薬組成物。

50

【請求項 6 2】

さらに薬学的に許容しうる担体及び／又は賦形剤及び／又はアジュバントを含む、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 3】

アレルギーに苦しむ患者内で天然に存在するアレルゲンによって誘導されるアレルギー反応に対するワクチンの形態である、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4】

被験者に免疫応答を生じさせる方法であって、前記被験者に、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種、請求項 5 7 若しくは 5 8 に記載の組成物、又は請求項 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

10

【請求項 6 5】

被験者のワクチン接種又は治療方法であって、前記被験者に、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種、請求項 5 7 若しくは 5 8 に記載の組成物、又は請求項 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 6 6】

請求項 5 7 又は 5 8 に記載の医薬組成物の製造方法であって、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種又は請求項 5 7 若しくは 5 8 に記載の組成物を、薬学的に許容しうる物質及び／又は賦形剤及び／又はアジュバントと混合することを含む方法。

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載の方法で得られる医薬組成物。

20

【請求項 6 8】

被験者のアレルギー反応の治療、予防又は軽減方法であって、被験者に、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種、請求項 5 7 若しくは 5 8 に記載の組成物、又は請求項 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 6 9】

組換えタンパク質変種が足場タンパク質をコードする DNA および天然に存在するアレルゲンをコードする DNA の DNA シャッフリング（分子育種）によって得られる DNA 配列から生成される、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種を調製する方法。

30

【請求項 7 0】

請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種をコードする DNA 配列。

【請求項 7 1】

変種が足場タンパク質をコードする DNA の部位特異的変異導入によって得られる、請求項 7 0 記載の DNA 配列。

【請求項 7 2】

配列番号 2 または 3 から選ばれる配列の誘導體である、請求項 7 0 または 7 1 記載の DNA 配列。

【請求項 7 3】

請求項 7 0 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む発現ベクター。

40

【請求項 7 4】

請求項 7 3 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7 5】

請求項 7 4 記載の宿主 T 細胞を培養する工程を含む、組換えタンパク質変種を製造する方法。

【請求項 7 6】

天然に存在するアレルゲンに対して特異的な T 細胞クローンまたは T 細胞株を刺激することのできる少なくとも一つの T 細胞エピトープを含む、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質変種。

【請求項 7 7】

50

請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項記載の組換えタンパク質変種または請求項 5 7 または 5 8 に記載の組成物を用いて患者の治療の妥当性、安全性または結果を評価するための診断方法であって、患者からの IgE 含有サンプルを前記タンパク質変種または前記組成物と混合し、前記サンプル中の IgE と前記タンパク質変種との間の反応性レベルを評価する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、免疫療法に関する。特に本発明は、新規な組換えタンパク質を利用するアレルギーワクチン接種戦略に関する。 10

本発明は、新規な組換えタンパク質変種の混合物を含む組成物にも関する。

【0002】

(発明の背景)

アレルギーは、西洋の生活様式を適合している国々で主要な健康上の問題である。さらに、これら国々ではアレルギー疾患の罹患率が上昇している。一般にアレルギーは生命を脅かす病気とみなされないが、喘息は、毎年かなりの数の死をもたらす。10代の若者の約 30% という異常な罹患率は、生活の質、仕事日及び金銭の実質的な喪失を運び、西洋諸国における主要な健康上の問題のうちの 1 分類を構成している。

アレルギーは、複雑な病気である。多くの因子が感作事象に寄与する。この中には、まだ不完全にしか分かっていないいくつかの遺伝子間の相互作用によって定義される個体の感受性がある。別の重要な因子は、特定の許容限界を超えるアレルゲン曝露である。いくつかの環境因子が感作プロセスで重要であり、汚染、小児期感染、寄生虫感染、腸管微生物等が挙げられる。一旦個体が感作され、そのアレルギー免疫応答が確立されると、ほんの少量のアレルゲンの存在も効率的にその症候に翻訳される。 20

アレルギー疾患の自然の過程は、通常 2 レベルの悪化を伴う。第 1 に、症状の進行及び疾病の重症度、および、疾病の進行、例えば花粉症から喘息。第 2 に、攻撃アレルゲンの流布が最も多く起こり、その結果アレルギー性多重反応を引き起こす。慢性的炎症は粘膜の防衛機構の一般的な衰弱につながり、非特異的刺激をもたらす、究極的には粘膜組織の破壊を生じさせる。乳児は、最初に食物、すなわちミルクに感作され、湿疹又は胃腸障害を生じるが、多くの場合、乳児は成長して自発的にこれら症状を脱する。これら乳児は、その生涯の後になって吸入アレルギーを発症する危険がある。 30

【0003】

最も重要なアレルゲンの供給源は、我々が呼吸する空気中の特定サイズの最も優勢な粒子の中から見つけられる。注目すべきことにこれら供給源は世界共通であり、花粉及びハウスダストダニ糞便粒子を含み、これを合わせると全アレルギーの約 50% の原因である。世界的に重要なものには、動物のふけ、すなわちネコやイヌのふけ、ヨモギ花粉のような他の花粉、及びアルテルナリア (Arternaria) のような微細真菌もある。地域によれば、北及び中央ヨーロッパではカンバ (birch) 花粉、東及び中央アメリカではブタクサ、日本国ではスギ花粉のようなさらに他の花粉が優勢であるかもしれない。昆虫、すなわちミツバチやスズメバチの毒物、及び食物はそれぞれ全アレルギーの約 2% を占める。 40

すべての IgE 媒介アレルギー反応はタンパク質に関係する。近年、分子生物学及び構造生物学における最新技術の応用によって、アレルゲン分子の特徴づけがかなり進んで容易になってきた。これら研究は、全アレルゲンが共有する共通の構造モチーフ又は生物学的機能の存在を明らかにできていない。どのようなタンパク質もアレルゲンの可能性があり、かつ最も重要なアレルゲン、すなわち主要アレルゲンは、免疫系にその提示を容易にする大きさの浮遊性粒子上にある最も豊富なタンパク質であると予測される。

【0004】

アレルギー、すなわち I 型過敏症は、外来性の非病原性物質に対する不適性な免疫反応によって引き起こされる。アレルギーの重要な臨床徴候として、喘息、花粉症、湿疹、及 50

び胃腸傷害が挙げられる。アレルギー反応は迅速であり、攻撃アレルゲンと接触して20分以内で最高になり、8～24時後に遅延反応が起こることが多い。さらに、アレルギー反応は、特定の個体は特定のアレルゲンに感作されるが、一方、その個体はアレルギー疾患を引き起こすことが分かっている他の物質に必ずしもアレルギー反応を示さないという意味で特異的である。アレルギー表現型は、標的器官の粘膜の顕著な炎症と、循環内及び肥満細胞と好塩基球の表面上のIgEクラスのアレルゲン特異的抗体の存在を特徴とする。

アレルギー性の攻撃は、IgE抗体が肥満細胞や好塩基球の表面上の高アフィニティーIgE特異的受容体に結合している場合、外来性アレルゲンのアレルゲン特異的IgE抗体との反応によって開始される。肥満細胞及び好塩基球は予め形成された媒介物質、すなわちヒスタミン、トリプターゼ、及び他の物質を含み、これらは2以上の受容体結合IgE抗体の架橋によって放出される。IgE抗体は、1つのアレルゲン分子の同時結合によって架橋される。従って、必然的に1つの抗体結合エピトープしか持たない外来物質はアレルギー反応を惹起しない。肥満細胞の表面上の受容体結合IgEの架橋は、好酸球、アレルゲン特異的T細胞、及び他のタイプの細胞をアレルギー応答部位へ誘引する原因となるシグナル伝達分子の放出にもつながる。アレルゲンと相互作用するこれら細胞、IgE及びエフェクター細胞は、アレルゲン遭遇後12～24時間で起こる、症候の新たな突然の出現をもたらす。

10

【0005】

アレルギー疾患の管理は、診断と、予防的治療を含む治療を包含する。アレルギーの診断はアレルゲン特異的IgEの実証とアレルゲン起源の同定に関連する。多くの場合、アレルギーの診断及び攻撃アレルゲン起源物質の同定には慎重な既往歴で十分かもしれない。しかし、多くの場合、皮膚プリック検査、血液検査又は誘発試験のような客観的な測定によって診断を補助する。血液検査の背後にある原理は、アレルゲン起源のアレイを用いた特異的IgEの実証である。治療の選択肢は3つの主要カテゴリーに入る。第1の機会、アレルゲンの回避又は曝露の減少である。アレルゲン回避は、例えば、食物アレルゲンの場合明白であるが、ハウスダストダニアレルゲンに関しては困難又は費用がかかり、或いは花粉アレルゲンに関しては不可能だろう。第2の最も広く用いられている治療の選択肢は対症薬の処方である。対症薬は安全かつ効率的であるが、病気本来の原因を変えず、病気の汎発も制御しない。第3の治療選択肢は、特異的アレルギーワクチン接種、すなわち特異的免疫療法であり、多くの場合、問題のアレルゲンによって引き起こされるアレルギー症状を減少又は軽減する。

20

30

【0006】

特異的アレルギーワクチン接種は、アレルギー疾患の原因療法である。ワクチン接種は基礎免疫的機序を妨げ、患者の免疫状態の持続的な改善をもたらす。従って、特異的アレルギーワクチン接種は対症薬物治療と対照的に治療期間を超えて持続する。この治療を受けている一部の患者は治癒し、さらに、ほとんどの患者が病気の重症度の軽減又は少なくとも病気の悪化の停止を経験する。従って、特異的アレルギーワクチン接種は、喘息に発展する花粉症のリスクを減らし、かつ新しい感受性が発生するリスクを減らす予防効果を有する。

特異的アレルギーワクチン接種は、その利点にもかかわらず、主として2つの理由のため広範には使用されていない。1つの理由は、数ヶ月にわたる反復ワクチン接種を含む伝統的なワクチン接種プログラムに伴う不便さである。もう1つの理由は、さらに重要であり、アレルギー性副作用の危険性である。伝染性病原因子に対する通常のワクチン接種は、単回又は数回の高用量免疫化を用いて効率的に行われる。しかし、この戦略は、病的免疫応答が既に進行中なのでアレルギーワクチン接種には使用できない。

40

【0007】

従って、特異的アレルギーワクチン接種は、持続的期間にわたって与えられる多免疫化を利用して行われる。過程を2期、すなわち上昇投与期と維持期に分ける。上昇投与期では、微小用量で開始し、通常16週間にわたって用量を増やして投与する。推奨される維持用量に達したとき、通常6週間毎に注射で維持期間この用量を投与する。各注射後、患者は、原則的に生命を脅かすアナフィラキシー副作用のリスクのため20～60分間医師の

50

手当状態のままではいなければならない。さらに、診療所は救急治療を支えるために必要な機能を備えていなければならない。ワクチン固有のアレルギー性副作用のリスクを排除することが、より一般的な利用を促すことは疑問の余地がなく、おそらく自宅でワクチン接種を自分でできるようにさえなるだろう。

成功するアレルギーワクチン接種に内在する免疫的機序は、詳細には分かっていない。特定病原に対する抗体の産生のような特異的免疫応答は、適応性免疫応答として知られている。この応答は、病原に対する非特異的反応である生得的免疫応答と区別することができる。

【0008】

アレルギーワクチンは、T細胞及び抗体産生性B細胞のような抗原特異性を有する細胞及び分子を含む適応性免疫応答を取り扱うことに束縛される。B細胞は、対応する特異性を有するT細胞の助けなしには抗体産生細胞に成熟しえない。アレルギー性免疫応答の刺激に参与するT細胞は、主にTh2型の細胞である。Th1及びTh2細胞間の新しい平衡の確立が特異的アレルギーワクチン接種の免疫的機序に有益かつ中心的であると提案されている。これがTh2細胞の減少、Th2からTh1へのシフト、或いはTh1細胞の上方制御によってもたらされるかには議論の余地がある。

最近、調節性T細胞がアレルギーワクチン接種の機序に重要であると提案された。このモデルによれば、調節性T細胞、すなわちTh3又はTr1細胞が、対応する抗原特異性のTh1とTh2の両細胞を下方制御する。このような不明瞭さにもかかわらず、一般的に活性ワクチンはアレルゲン特異的T細胞、好ましくはTH1細胞を刺激する能力を有するにちがいない

特異的アレルギーワクチン接種の過程中的アレルゲン特異的抗体について、重要な観察は、臨床的改善にかかわらず、IgEには対応する変化がないらしいことである。アレルゲン特異的IgEは、治療の初期に暫定的に生じるかもしれないが、治療中に治療前レベルに戻り、その後徐々に減少を示しうる。一方、全治療期間中、臨床的改善は安定して上昇する。

【0009】

別の重要な観察は、治療期間の初期でアレルゲン特異的IgGが大きく増加することである。アレルゲン特異的IgGは、典型的にはIgEの濃度の数百倍又は数千倍の濃度に増加する。アレルゲン特異的IgGは、IgEとアレルゲンとの間の相互作用を妨げ、又は‘遮断’できるので、特異的アレルギーワクチン接種の免疫機序に重要であると提唱されている。このモデルによれば、IgGはアレルゲンへの結合に関してIgEと効率的に競合しうる前に反復免疫化によってアフィニティーの成熟及び/又は濃度の上昇を受ける必要があり、これが治療中に観察される臨床的改善の安定した上昇を説明する。

ヒト免疫系には、特異的分子認識の2種の異なる様式が存在する：T細胞の表面上に存在するT細胞受容体による方法と、抗体を産生するB細胞の表面に結合し、又は溶液中に遊離し、又は免疫系内の種々の細胞の表面上の特異的受容体に結合しているかもしれない抗体を介する様式。T細胞受容体による認識は、抗原が内部移行(インターナリゼーション)かつ消化され、抗原提示細胞によって抗原の断片が主要組織適合複合体(major histocompatibility complex)(MHC)と複合体として細胞表面上に提示される必要がある。この複合体全体がT細胞受容体によって認識される。

抗原提示細胞は専門的な抗原提示細胞、すなわちマクロファージ、樹状細胞又はB細胞でありうる。マクロファージと樹状細胞は食作用によって抗原を摂取し；一方、B細胞は、引き続きインターナリゼーションと提示のために表面結合抗体を介して抗原を捕獲する。T細胞エピトープは15~20個のアミノ酸のポリペプチド断片である。

B細胞エピトープ、すなわち抗体結合エピトープは線状T細胞エピトープとは異なる。フロイント完全アジュバント中で免疫することによって実験動物で生じる抗体は線状ポリペプチド断片、すなわち連続的エピトープに結合しうるが、このような抗体は、アレルゲンに対する自然応答の間にはめったに産生されない。抗体は、正確に折りたたまれた抗原分子の表面の一部に結合する。

10

20

30

40

50

【0010】

従って、天然に存在するアレルゲンのIgEエピトープは、アレルゲンの骨格と全体的な三次元構造によって支持される限定的な表面領域内の表面に露出したいくつものアミノ酸から成るとみなされる。このような“エピトープアミノ酸”は、ほとんど常に単一アミノ酸として、又は分子を折りたたむときに表面上で“合わせられる”、アレルゲンの一次配列の大きい部分全体に分布する数個のアミノ酸から成るクラスター内に見られる。抗体結合エピトープは、通常約800~900²にわたって広がるが、抗体の結合によって、さらに大きい領域が“マスク”される。これは、抗体のエピトープへの結合によって、2000²までの領域に他の抗体分子が結合できなくなることを意味する。

抗体と抗原との相互作用のアフィニティーは、誘引静電力、すなわちファンデルワールス相互作用、水素結合、及びイオンブリッジのみならず、界面からの水分子のほとんど完全な排除によって増大するエントロピーによっても決まる。従って、この2つ分子表面の輪郭間の適合が、相互作用の結合力を定義するときの重要なパラメーターであるといえる。その結果として、通常、抗原（又はアレルゲン）の変性、すなわちアンフォールディングは抗体結合エピトープを破壊し、かつ生理的濃度範囲内ではもはや抗体の結合はありえないということになる。また、エピトープ内のアミノ酸が別のアミノ酸と置換されると、相互作用のアフィニティーの低減をもたらすということにもなる。抗体結合アフィニティー低減の程度は、この特異的置換アミノ酸と、問題の抗体の両者によって決まる。例えば、ある抗原内の単一のアミノ酸置換は、係数にして1000、抗原と抗体の相互作用に影響しうる。

【0011】

特異的アレルギーワクチン接種用ワクチンを化学的修飾によって改良するための試みは30年以上の間行われており、1つの全体的目的をもった多種多様なアプローチが含まれる：すなわち、効力を損なわずに安全性を改善する、又は換言すれば、免疫原性を損なわずにIgE結合を低減する目的。

初期のアプローチはアレルゲンの完全な変性を含んでいた。しかし、ヒト治験は効力を示すことができていない。これは防御免疫応答の非効率的生成のためだろう。アレルギー免疫応答におけるT細胞に焦点を当てる目的で中間サイズの合成ペプチド（長さ50~60個のアミノ酸）がヒト治験で試された。このペプチドは、非常に高用量でいくらかの効果を示したが、不規則な副反応の出現のためこの治験は終了した。これら治験から、ワクチン中に抗体結合エピトープが存在しないと効力が損なわれると思われる。

他の初期の試みは、アセチル化（エピトープマスクング）、大きいポリマー（ポリエチレングリコール）への接合、又はホルムアルデヒド若しくはグルタルアルデヒドによる大きいいわゆる‘アレルゴイド’への重合によるアレルゲン抽出物の化学的修飾を含んでいた。前者の2つの概念はヒト治験には入らなかったが、一方‘アレルゴイド’は現在日常的な臨床利用にあるが、安全性の改善という利益はない。この理由は、おそらく化学的架橋がランダムにいくらかのエピトープを破壊し、最適効力のためにはより高い用量の使用を必要とするからで、それによって、アレルギー副作用のレベルが通常のアレルギーワクチンを用いて観察されるレベル前後に高めているからであろう。

【0012】

遺伝子工学を用いてアレルギーワクチンを改良するアプローチは、アレルゲンワクチン分子の三次元構造を破壊するための種々の戦略を含む。その中には、ジスルフィド架橋に関与するシステイン残基の置換がある。別の戦略は、部位特異的変異導入によって、1つの分子中にいくつもの天然に存在するアミノ酸置換を集めることである。これら戦略の共通の特性は、ワクチンの三次元構造を破壊すること、又は少なくとも三次元構造の保存を重要とみなさいことである。

別の一般に用いられるアプローチは、正しく折りたたまれた天然に存在するアレルゲンの組換え変異体を生産することだった。変異は、通常変異体タンパク質のIgEアフィニティーを減らすように選択される。

【0013】

10

20

30

40

50

WO 99/47608は、天然に存在するアレルゲンの -炭素骨格三次構造を保持しながら、アレルゲンの所定の重要な位置における人工的アミノ酸置換の導入を開示している。

WO 02/40676は、アレルゲンの -炭素骨格三次構造を保持しながら少なくとも4つの一次人工アミノ酸置換を所定の重要な位置に導入することを開示しており、各一次変異は別の一次変異と少なくとも15 だけ離れており、800²の面積を有する少なくとも1つの円形表面領域は変異を含まない。

J. Biomol. Struc. Dynamics (2000), vol. 17, 821-828ページ(Liangら)は、タンパク質の機能部分を別の適切な足場タンパク質に移植することによって、あるタンパク質の生物学的機能を別のタンパク質に移すことを開示している。試験系として、バルスター(bar star)の結合エピトープ、バルナーゼ(barnase)のインヒビターがより小さい分子上に移植されている。 10

Protein Science (1994), vol. 3, p. 2351-2357 (Jin & Wells)は、タンパク質-タンパク質相互作用を研究するための抗原-抗体複合体の使用について開示している。ヒト成長ホルモンhGHのモノクローナル抗体(MAb 3)への結合について研究された。MAb 3への結合に必須のhGHの5個のアミノ酸が、hGHの非結合性相同体、すなわちhGHと86%の配列同一性を有するヒト胎盤ラクトゲン(hPL)上に移植された。また、2つの追加の枠組み変異が導入された。この移植したhPL変異体はMAb 3及びhGHに結合した。hGHの23%と同一性を有する足場タンパク質上にエピトープを移植するための試みは成功しなかった。

【0014】

J. Immunol (2001), vol. 166, p. 6057-6065 (Kingら)は、ハイブリッド昆虫毒物アレルゲンを開示している。このハイブリッドは、問題のゲストアレルゲン、Ves v 5の小部分の、相同性宿主タンパク質、Pol a 5中への挿入から成る。Ves v 5とPol a 5は59%の配列同一性と低度の抗原交差反応性を有する。ハイブリッドは、約7~約50個のアミノ酸の一部をアレルゲン中に挿入することによって形成される。このハイブリッドは、タンパク質のB細胞エピトープ含有領域のマッピング及びヒトの免疫療法試薬としての用途に有用である。しかし、このアレルゲンハイブリッドを生成するアプローチは以下の理由のためアレルギーワクチン接種戦略で使うのは妥当でない。第1に、昆虫アレルゲン由来のペプチド断片の昆虫足場タンパク質中への挿入は、多くの場合、前記分子の三次元構造の不安定化につながるだろう。不安定な分子はワクチン接種で使うには不適である。第2に、エピトープは、アレルゲンの単一の線状ペプチド断片から成ることはほとんどないので、このアプローチは、アレルゲンから足場タンパク質に三次元構造のエピトープを“移植する”には適さない。 20 30

【0015】

(発明の目的)

本発明の目的は、天然に存在するアレルゲンの新規なタンパク質変種であって、アレルギーワクチン接種で有用な特性を有する前記タンパク質変種を提供することである。従って、全体的なタンパク質フォールディング(折りたたみ)様式と表面トポグラフィの輪郭について天然アレルゲンと類似し、同時に前記アレルゲンに比べてIgE結合能が低いか又は減少した表面輪郭を有する、ワクチン成分用の足場タンパク質のタンパク質変種を生成することが本発明の目的である。この目的は、IgEの天然アレルゲンへの結合を遮断する能力を有する防御IgG抗体を生成し、それによってアレルギー症候を軽減又は治癒する免疫応答の刺激の可能性を与えるため、問題の天然に存在するアレルゲンに対して類似性を有する足場タンパク質の表面輪郭を生成することである。 40

例えばアレルギーワクチンとして性能が改良されたタンパク質変種を得るための従来のアプローチは、主としてIgE結合アフィニティーを減少させるために、天然に存在するアレルゲンを改変することに焦点が当てられていた。このアプローチの主な欠点は、アレルゲンに導入する変異が増加することによって分子の三次元構造を不安定化するリスクが非常に高まること、及び不安定な分子はワクチン治療の候補として使用するには確実に魅力がないことである。

【0016】

本発明の背後にある概念は、天然アレルゲンに対して配列相同性を有する天然に存在する“足場タンパク質”を選択することである。足場タンパク質は、天然アレルゲンの折りたたみ様式と類似する折りたたみ様式を有し、同時に実質的に低減した抗体交差反応性を示す。このようにして、“出発材料”が、適切な三次元折りたたみ様式を有し、かつ天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体にほとんど又は全く結合しない安定分子であることが保証される。足場タンパク質における変異の導入、すなわちアレルゲンの構造に相同な既存の抗体結合表面輪郭又はエピトープを導入又は調節又は除去すると、変異した足場タンパク質変種は天然アレルゲンに比べて低い抗体反応性を示すので、防御免疫応答を起こすことができ、かつ副作用を誘発する危険性の低い安定なタンパク質変種の生成をもたらす。

10

【0017】

本発明は、エピトープに対応する足場タンパク質表面領域部分のアミノ酸を、アレルゲンの一次アミノ酸配列中の対応する位置にあるアミノ酸で置換することによって、足場タンパク質上のアレルゲンのエピトープを部分的又は完全に模倣することができるという認識に基づいている。特に、本発明は、大部分のエピトープは不連続であるにもかかわらず、一次アミノ酸配列の異なる位置にあるエピトープの重要な表面アミノ酸の選択的かつ特異的変異によって該エピトープを完全又は部分的に生じさせることができるという認識に基づいている。さらに、本発明は、このような変異した足場タンパク質変種が治療及び診断目的の天然アレルゲンの代わりに使用でき、かつこのような変異した足場タンパク質は抗体の結合に対する特性を改変し、すなわちアレルギーワクチン成分として使用する場合アナフィラキシー反応のリスクの低減という利点を有するという発見に基づいている。

20

防御免疫応答のさらに効率的な生成は、異なるタンパク質変種の混合物を用い、それによっていくつかの異なるエピトープ領域に対する免疫系を提示することによって達成することができ、好ましくは同一分子で1つより多くのエピトープ領域を提示しない。

【0018】

本発明の一つの特徴は、天然アレルゲン上のエピトープを模倣する表面領域を確立するため、約5000²までの所定の表面領域内に一次変異を導入することを含む。一度に単一の抗体分子の結合だけを許し、それによってワクチン接種のシナリオでエフェクター細胞を起動するという危険性を回避するという目的のため、変異を起こさせる表面積は約5000²に制限される。好ましくは、足場タンパク質はアレルゲン特異的IgE抗体とほとんど又は全く測定可能な結合を持たず、従って結果として変異したアレルゲン変種は、好ましくは1つの抗体分子と結合する能力しか持たない。

30

本発明の別の目的は、アレルゲンエピトープを模倣するいくつかの表面領域を確立する目的のための変異の導入を含む。また、アレルゲン特異的IgE交差反応性を有する他の表面領域のアフィニティーを低減するために変異を導入することができる。理論的には、問題の変異したタンパク質変種にいくつかの抗体分子が結合できるであろうが、天然のアレルゲンに対するこれら抗体の結合に比べてアフィニティーは大いに低減している。IgE相互作用のアフィニティーは、エフェクター細胞に脱顆粒を起こさせる危険性が制限される又は消滅するレベルまで低減され、同時に、問題のアレルゲンと反応性の防御抗体の形成を誘発する能力を保持しなければならない。

40

【0019】

(発明の概要)

本発明は、天然に存在するアレルゲンに対して防御免疫応答を誘発する能力を有する組換えタンパク質変種に関し、前記タンパク質変種は、

- ・足場タンパク質の変種であり、前記足場タンパク質は、天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と構造的に類似の三次元折りたたみ様式を有し、

- ・前期足場タンパク質に比べて、少なくとも1個の非変異アミノ酸残基で隔てられた2以上の一次変異を含み、各一次変異は、天然に存在するアレルゲン中の対応するアミノ酸残基と同一又は相同的な少なくとも1個のアミノ酸残基を足場タンパク質中に導入し、かつ

50

・前記足場タンパク質に比べて、天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体に対するアフィニティー及び/又は結合能が増加している。

さらに、本発明は、アレルギー個体の治療用医薬組成物を製造するための1種以上のタンパク質変種の使用に関する。

本発明は、本発明のタンパク質変種をコードするDNA配列、並びに前記DNA配列を含むベクターおよび宿主、及び組換えタンパク質の製造方法にも関する。

また、本発明は、診断アッセイにも関する。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明の概念は、新規アレルゲン変異体を生じさせる基礎として、天然に存在するアレルゲンと類似の三次元折りたたみ様式を有するが、ほとんど又は全く抗体交差反応性のない“足場タンパク質”を使用することである。 10

この足場タンパク質を用いて、アレルゲン特異的抗体との抗体交差反応性のある表面領域と抗体交差反応性のない表面領域を有する新規な組換えタンパク質変種を生じさせることができる。アレルゲンワクチン候補を生じさせる基礎として足場タンパク質を使用することによるいくつかの重要な利点がある。そのアレルゲン特異的IgE反応性を低下させ、ひいてはワクチン接種時の副作用を誘発する危険性を低減するためには、通常、アレルゲンの多数の変異を行う必要がある。また、多数の変異はタンパク質を不安定にする傾向があるので、これら変異したアレルゲンはワクチン候補としての使用に不適なことが多い。従って、本発明の背後にある概念は、適切な足場タンパク質の表面上にアレルゲン特異的IgEによって認識される輪郭を部分的又は完全に確立するためには一般に比較的小数の変異が必要とされる、ということである。このような分子は、アレルゲン曝露時にIgE結合と競合しうる新しい防御免疫応答を誘導する可能性を有し、IgE媒介アレルギー反応を誘導するリスクの減少につながる。 20

【0021】

本発明の一つの特徴は、1つのアレルゲン相同性表面領域を有する、変異したタンパク質変種を生成することである。この特徴による好ましい足場タンパク質は、出発点として天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体に対する結合性がほとんど又は全くない足場であり、それによって二次変異導入の必要を最小限にする。アレルゲン特異的抗体に対していくらかの結合性がある足場も適しうる。このような足場タンパク質における1つ以上の二次変異の導入は、潜在的な交差反応性を制限又は排除しうる。足場タンパク質及び足場タンパク質変種の天然に存在するアレルゲンに特異的な抗体と結合する能力は、問題のアレルゲンにアレルギー性の患者由来の血清のパネルを用いてRAST阻害によって検査することができる(Nolteら(1987) Allergy, 42:366-373)。抗体結合性を欠くとは、 10^3 、さらに好ましくは 10^4 、最も好ましくは 10^5 以上の係数で抗体アフィニティーが減少することを意味する。 30

【0022】

足場タンパク質と問題のアレルゲンとの間の構造上の類似性の比較は、三次元構造及び/又はアミノ酸配列の評価を含む。折りたたみ様式類似性は、好ましくは足場とアレルゲンの三次元構造の比較によって評価する。足場タンパク質及び/又は天然に存在するアレルゲンの既知の三次元構造が存在しない場合、前記アレルゲンと10%以上、好ましくは20%以上配列同一性を有するタンパク質は一般的に相同な折りたたみ様式を有すると予測できるので、足場タンパク質として適用することができる。しかし、10%未満のアミノ酸同一性を有するタンパク質でさえ(アクセッション番号AAH05642とpdbエントリー1jssで例示される)、比較されるアレルゲンと同一の折りたたみ様式を有することが分かった(例えば、この例ではBet v 1)。 40

足場タンパク質の三次元構造は、問題のアレルゲンの既知構造に基づいて設計することもでき、或いは逆も可能である。さらに好ましくは、足場分子と問題のアレルゲンとの間のアミノ酸同一性は、67%未満、さらに好ましくは20~60%、さらに好ましくは20~50%、なおさらに好ましくは30~50%である。 50

足場分子の分子表面上の多くのアミノ酸は、対象アレルゲンの表面上のアミノ酸と同一であり、相同的構造中の対応する位置にある。これは、三次元モデル又は予測三次元構造の比較によって可視化することができる。

【0023】

“エピトープ移植”のために表面領域が選択されるが、足場及びアレルゲン中にそれぞれできる限り多くの同じ位置にあるアミノ酸残基を含む領域が優先的に選択される。それによって、足場タンパク質の表面上でアレルゲンを模倣する表面領域を完全又は部分的に確立するために必要な人工的変異の数が最小限になる。好ましくは、生成される表面領域は1000~3600²を占め、5000²より大きくない。CDR領域よる結合のみでほぼ2000²がマスクされると推定した。さらに、完全抗体の存在によって生じる立体障害があるだろう。従って、5000²までの領域は他の抗体分子による結合に利用しがたい。

足場タンパク質の選択領域内で、足場タンパク質と問題のアレルゲンとの間で異なる表面アミノ酸は、前記選択領域内の大部分或いは好ましくはすべての表面に露出したアミノ酸残基を、問題のアレルゲンの表面に露出したアミノ酸と相同、又は同一になるように変異させる。

【0024】

さらなる特徴において、アレルゲン特異的抗体のこれら表面への交差反応を回避するため、表面領域を修飾してアレルゲン表面への同一性又は相同性を低くなるようにしてもよい。このような領域内では、アレルゲンの対応する位置のアミノ酸残基に同一又は相同的なアミノ酸残基を、異なる又は相同性の低い残基で置換する。

変異した足場タンパク質、すなわち組換えタンパク質変種の三次元構造は、その全体的な折りたたみ様式および“移植された”エピトープ領域のコンホメーションについて確認することができる。タンパク質の二次及び三次構造の決定方法として、X線結晶法、NMR分光法、及び円偏光二色性分光法が挙げられる。生成した変異分子の安定性は、尿素濃度、pH、イオン強度、温度、又は他のパラメーターに一連の変化を与えて円偏光二色性分光法で評価することができる。

【0025】

ワクチン接種のシナリオでは、重複しないアレルゲン特異的表面領域を有するタンパク質変種又は優先的にはタンパク質変種混合物が安全であると予想される。問題のアレルゲンに特異的な2つのIgE抗体は好ましくは同時には結合できないので、アレルギー反応を引き起こさないからである。さらに、これらは、アレルゲン特異的表面領域で覆われた表面領域内において、防御的IgG抗体反応の刺激（このIgGは問題の天然アレルゲンと反応性である）に効率的であると予想される。

本発明の他の特区庁により、分子の一部又は全体にわたっていくつかの移植領域が分布している変異したタンパク質変種が生成される。抗体結合アフィニティーを減らし又は増やし、或いは増減するために、足場タンパク質を変異させることができ、それによってエピトープ領域を完全若しくは部分的に除去し、及び/又は足場タンパク質の他の部分にエピトープ領域を確立することができる。この発想は、アレルゲン特異的IgE抗体の結合に関して、全表面にわたって一般的な低アフィニティー相互作用を達成することである。

【0026】

足場タンパク質の表面上の多くのアミノ酸残基は、問題のアレルゲンの表面上のアミノ酸残基と同一である。これは、アレルゲンと足場タンパク質の三次元構造の比較によって可視化することができる。

足場タンパク質のIgEアフィニティーを低減するために選択される表面領域は、アレルゲンと足場タンパク質の間で相同な又は同一のアミノ酸残基を含む密集表面領域である。そしてこのようなアミノ酸残基が、問題のアレルゲン中のアミノ酸残基に関連し或いは関連しないアミノ酸残基に変異される。

タンパク質変種のアレルゲン特異的抗体交差反応性を高めるために選択される表面領域内では、足場分子とアレルゲンを比較したとき異なる表面アミノ酸残基が選択される。次に、これらアミノ酸残基が、問題のアレルゲンと相同性、さらに好ましくは同一のアミノ

10

20

30

40

50

酸に変異される。

【0027】

組換えタンパク質変種の表面は、問題のアレルゲンと同一のアミノ酸の領域のみならず非同一のアミノ酸の領域を含む。組換えタンパク質変種の表面をグラフによって表すと、その表面が、天然に存在するアレルゲンの対応する領域と相同な又は同一の少なくとも1つの本質的に円形の領域を含むことを可視化することができる。この領域は、約300~900²、さらに好ましくは500~800²、最も好ましくは約500~600²をカバーする。

従って、好ましくは足場タンパク質は、天然に存在するアレルゲン特異的抗体といかなる免疫原反応性をも持たない。しかし、天然に存在するアレルゲン特異的抗体との反応性を有する足場タンパク質を使用することができ、この場合、1つ以上のエピトープを修飾してこれらエピトープの抗体結合アフィニティーを排除又は低減することが好ましい。

10

【0028】

換言すれば、本発明の主な特徴は、天然に存在するアレルゲンに対して防御免疫応答を誘導する能力を有する組換えタンパク質変種に関し、前記タンパク質変種は、

- ・足場タンパク質の変異体であり、前記足場タンパク質は、天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と構造的に類似の三次元折りたたみ様式を有し、

- ・前記足場タンパク質に比べて、少なくとも1個の非変異アミノ酸残基で隔てられた2以上の一次変異を含み、各一次変異は、天然に存在するアレルゲン中の対応するアミノ酸残基と同一性又は相同性の少なくとも1個のアミノ酸残基を前記足場タンパク質中に導入し、かつ

20

- ・前記足場タンパク質に比べて、天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体に対するアフィニティー及び/又は結合能が増加している。

【0029】

本発明の一次変異は、置換、欠失及び/又は付加を含みうる。本発明により、2~50、好ましくは2~40、さらに好ましくは3~25、さらに好ましくは4~15、最も好ましくは5~12の一次変異が行われる。本発明において、少なくとも2つの一次変異を行い、それによってアレルゲン特異的抗体と結合できる三次元エピトープ領域を確立して足場分子上に確実に移植されることを保証することが非常に重要な特徴である。

さらに、本発明は、天然に存在するアレルゲンの対応する位置には存在しないアミノ酸残基を足場タンパク質中に導入する1つ以上の二次変異を有するタンパク質変種を含む。二次変異を導入する目的は、例えばタンパク質変種の三次元折りたたみ様式を安定化し、或いはアレルゲン特異的IgE交差反応性を減らすためである。

30

本発明により、0~20、好ましくは1~10、最も好ましくは2~5の二次変異が行われる。

一般に、本発明の二次変異は、足場タンパク質および天然に存在するアレルゲンのどちらの特定の位置にも存在しないいずれかのアミノ酸残基による、1個以上のアミノ酸残基の変異として行うことができる。好ましくは、二次変異は、タンパク質変種を不安定にするリスクを最小限にするため、天然に存在するアレルゲン中には存在しないが足場アミノ酸に相同的なアミノ酸残基の置換である。

【0030】

40

本発明の一次又は二次変異は、部位特異的変異導入(挿入、欠失又は置換)、DNAシャッフリング、及び/又は遺伝子ライブラリー法によって行うことができる。

本発明のいずれの一次又は二次変異も多数の連続的に変異したアミノ酸から成りうる。本発明の一次又は二次変異において1~15、好ましくは1~10、最も好ましくは1~5個の連続したアミノ酸が変異される。多くの場合、エピトープ領域の一部である表面露出アミノ酸はアレルゲンの一次構造内の単一アミノ酸“点”として存在する。このような場合、通常、これらのアミノ酸を点変異すれば十分である。しかし、他の場合は、抗体結合アフィニティーを増加又は減少させるため、数個の連続したアミノ酸を変異させる必要がある。

【0031】

50

本発明の一つの特徴は、天然に存在するアレルゲンに対する防御免疫応答を誘発する能力を有する組換えタンパク質変種の製造方法を含み、以下の工程：

- ・天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と構造的に類似の三次元折りたたみ様式を有する足場タンパク質を選択する工程、

- ・この足場タンパク質中に、少なくとも1個の非変異アミノ酸残基で隔てられた2以上の一次変異を導入し、各一次変異が、足場タンパク質中に、天然に存在するアレルゲン中の対応するアミノ酸残基と同一又は相同な少なくとも1個のアミノ酸残基を導入する工程、及び

- ・これによって、前記足場タンパク質に比べて、天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体に対するアフィニティー及び/又は結合能が高いタンパク質変種を製造する工程、

を含む。

上記方法で得られる産物も本発明の範囲内に包含される。

【0032】

一実施形態では、本発明のタンパク質変種は、足場タンパク質に比し、天然に存在するアレルゲンに特異的な抗体について高い結合能を有する。前記結合能は、天然に存在するアレルゲンの抗体結合能の好ましくは少なくとも10%に、好ましくは少なくとも50%に、または100%まで高められる。さらに、前記タンパク質変種は、好ましくは天然に存在するアレルゲンに比し、ヒスタミン放出を誘導する能力が減少している。タンパク質変種のヒスタミン放出可能性の減少は、天然に存在するアレルゲンの能力に比し、好ましくは2

倍、さらに好ましくは10倍、なおさらに好ましくは100倍、なおさらに好ましくは1000倍、最も好ましくは10,000倍以上低減している。

ヒスタミン放出を引き起こす能力は即時型アレルギー反応およびアレルギーワクチン接種に伴う副作用に大いに関連し、かつその原因なので、ヒスタミン放出を誘導するタンパク質変種の能力、すなわち前記変異体のIgE受容体を架橋する能力を確実に大きく減らすことによって、前記タンパク質変種はアレルギーワクチンの活性成分として天然アレルゲンに対してより安全な代替を構成する。

【0033】

第2の実施形態により、本発明のタンパク質変種は、実施例4で述べるように測定した場合、足場タンパク質と密接に類似した三次元折りたたみ様式又は炭素骨格鎖三次構造を有する。エピトープを構成する表面輪郭は前記ペプチドの炭素骨格鎖の折りたたみ様式によって支持されている。

従って、好ましい実施形態によれば、本発明のタンパク質変種は、天然に存在するアレルゲンとアミノ酸同一性のレベルが20~60%、好ましくは30~50%の足場タンパク質から誘導される。

第3の実施形態によれば、本発明のタンパク質変種は、一次変異が、アレルゲン特異的抗体の領域を決定する相補性によって認識されうるエピトープ領域を確実に構成するように、約600~900²の面積を有する表面領域内にすべての一次変異を有する。さらに、本発明のタンパク質変種は、好ましくは表面露出アミノ酸の一次変異を含む。表面露出アミノ酸は、20%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上、最も好ましくは50%以上の溶媒接近性を有する。

本発明の第4の実施形態によれば、天然に存在するアレルゲンは、好ましくは分類上ブナ目(Fagales)、モクセイ目(Oleales)又はマツ目(Pinales)、最も好ましくはBet v 1(データベースアクセッション番号：Z80104)に由来する吸入アレルゲンである。好ましいBet v 1足場タンパク質はMal d 1である。

【0034】

他の好ましい実施形態では、主要カンパ花粉アレルゲンBet v 1の足場タンパク質は、例えばアクセッション番号S50892で例示されるAin g 1(ハンノキ)のイソ型、アクセッション番号Q96382、Q96381、CAA47367、Q96377、Q96378、Q96379、Q96503、Q96501、CAA47366、Q96380で例示されるCar b 1(シデ)のイソ型、AJ130889で例示されるFag s 1(ブナノ

10

20

30

40

50

キ)のイソ型、AJ417550で例示されるCas s 1[Castanea sativa]のイソ型、アクセッション番号AJ488060、Q43550、Q43551、Q43552、Q43549、AKK13027、AKK13028、Q40280、AAD13683、Q9SYV2、Q9SYV3、Q9SYV4、Q9SYV6、Q9SYV9、Q9SYW3、Q9SYV5、AAK13029、Q9SYV7、Q9SYV8、JC4276、S51119で例示されるMal d 1(リンゴ)のイソ型、アクセッション番号022521、024248、050001及びgi13787043で例示されるPru av 1(サクランボ)のイソ型、アクセッション番号AF057030で例示されるPyr c 1(セイヨウナシ)のイソ型、アクセッション番号p49372、p92918で例示されるApj g 1(セロリ)のイソ型、アクセッション番号004298、t14322、t14325で例示されるDau c 1(ニンジン)のイソ型、アクセッション番号p52779(pdbエントリー1FV_A)で例示されるLupinのイソ型、アクセッション番号CAA10719、S20517、P93333、AB17_PEA、AB18_PEA、T14817で例示される他のPatogenesis関連タンパク質及びアクセッション番号AAH05642(pdbエントリー1jss)で例示される二次構造要素の同一配列を含有する他のタンパク質のイソ型である。

【0035】

Mal d 1(2620) (データベースアクセッション番号：AJ488060) がBet v 1足場タンパク質である一実施形態では、タンパク質変種は、(E12V、E12I、E12M、E12L)、P16A、(H40S、H40T)、I43N、L44I、D47N、G65K、K70R、(E76H、E76R、E76K、Q76H)、S107T、G108P、+109D、S110G、E129A、K152L、(P154S、P154T)、P155Sから成る群より選択される少なくとも2つの一次変異を含み、かつ場合によって1以上の二次変異が、N28X、好ましくはN28T、K32X、好ましくはK32Q、E45S、E96X、+159Xから成る群より選択される。この文脈、及び以下の実施例では、最初の文字と数字は、特定のアミノ酸位置の元のアミノ酸コードに相当する。その後の文字は、元のアミノ酸と置換しうるアミノ酸である。括弧は、所定のアミノ酸位置で変異を起こすために選択するとき、いくつかの異なる選択肢があることを意味する。これらの1つを選択することができる。

【0036】

特有の実施形態では、Mal d 1タンパク質変種 (rMal d 1(2760)) は、以下の配列番号1：

GVVYTYENEYTSSEIPPPRLFKAFLVDADTLIPQIAPQAIKHAEILSGDGGPGTIKKITFGEGSQYGYVKHKIDSVDEANYS
YAYTLIEGDALTDITIEKVSYETKLVASGSGSIIKSISHYHTKGDVEIMEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLKDHDPDAYN

に定義される配列を含み、

前記変種は、以下の二次変異を含む：N28T、K32Q、E45S。rMal d 1(2760)は、本発明の足場タンパク質の例であり、実施例で詳細に説明するように、共に前記足場タンパク質のBet v 1特異的IgE反応性を減少させるいくつかの二次変異を含む。

別の特有の実施形態では、Mal d 1タンパク質変種 (rMal d 1(2781)) は、以下の配列番号2：

GVVYTYENEYTSSEIPPPRLFKAFLVDADNLIPIKQAIKHAENIEGNGGPGTIKKITFGEGSQYKYVKHRIDSVDHANYS
YAYTLIEGDALTDITIEKVSYETKLVASGSGSIIKSISHYHTKGDVEIMEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLKDHDPDAYN

に定義される配列を含み、

前記変種は、以下の一次変異を含む：I43N、L44I、D47N、G65K、K70R、Q76H。rMal d 1(2781)変異体は、“天然の”Mal d 1 2620に比べて高いBet v 1特異的IgE反応性を有する本発明のタンパク質変種の例である。これについては実施例で詳細に説明する。

さらに別の特有の実施形態では、Mal d 1タンパク質変種 (rMal d 1(2762)) は、以下の配列番号3：

GVVYTYENEYTSVIPPARLFKAFLVDADNLIPIKQAIKHAIELEGDGGPGTIKKITFGEGSQYGYVKHKIDSVDEANYS
YAYTLIEGDALTDITIEKVSYETKLVATPDGGSIIKSISHYHTKGDVEIMEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLLDHS DAYN

に定義される配列を含み、

前記変種は、以下の変異を含む：E12V、P16A、K152L、P155S、S107T、G108P、+109D、S110G。ここで、“+”は指定位置でのアミノ酸の挿入を意味する。rMal d 1(2762)変種は、“天然の”Mal d 1 2620に比べて高いBet v 1特異的IgE反応性を有する本発明のタンパク質変種の例である。これについては実施例で詳細に説明する。

【0037】

Mal d 1のタンパク質変種が一次及び二次の両変異を含んでもよいことを明らかにする実施形態では、このようなタンパク質変種は、(E12V、E12I、E12M、E12L)、(H40S、H40T)、(E76H、E76R、E76K、E76K)、E129A、(P154S、P154T)から成る群より選択される少なくとも2つの一次変異、及び場合によって、E8X、N28X、K32X、E96X、+159Xから成る群より選択される1以上の二次変異を含む。

第5実施形態によれば、本発明のタンパク質変種は、Dau c 1(データベースアクセス番号:T14325)がBet v 1の足場タンパク質であるタンパク質変種である。この実施形態により、Dau c 1のタンパク質変種は、(S12V、S12L、S12I、S12M)、S14P、E16A、P105A、A107P、(A148S、A148T)、(I151L、I151V、I151M)、(N153H、N153K、N153R)、(+154S、+154T)、(+155D、+155E)、+156A、(+157Y、+157F)、(+158N、+158Q)、(K39S、K39T)、(K44E、K44D)、(V52I、V52M、V52L)、(I54K、I54R、I54H)、(T64K、T64R、T64H)、(T65Y、T65F、T65W)、(T67K、T67R、T67H)、D86E、L91G、(G92D、G92E)から成る群より選択される少なくとも2つの一次変異を含み、かつ場合によって、1以上の二次変異が、K32X、E42X、E59X、R69X、E95X、K122X、E8X、T10X、D25X、K32X、D46X、E59X、E95X、D108X、K122Xから成る群より選択される。

【0038】

特定の実施形態では、Dau c 1タンパク質変種は、(S12V、S12L、S12I、S12M)、S14P、E16A、P105A、A107P、(A148S、A148T)、(I151L、I151V、I151M)、(N153H、N153K、N153R)、(+154S、+154T)、(+155D、+155E)、+156A、(+157Y、+157F)、(+158N、+158Q)から成る群より選択される少なくとも2つの一次変異及び場合によって、K32X、E42X、E59X、R69X、E95X、K122Xから成る群より選択される1以上の二次変異を含む。この実施形態は、足場タンパク質の表面上に単一のエピトープ領域を確立しながら、他の領域は抗体アフィニティーを減じるように変異を起こしていることを明らかにする。

別の特定の実施形態では、Dau c 1変異体は、(K39S、K39T)、(K44E、K44D)、(V52I、V52M、V52L)、(I54K、I54R、I54H)、(T64K、T64R、T64H)、(T65Y、T65F、T65W)、(T67K、T67R、T67H)、D86E、L91G、(G92D、G92E)から成る群より選択される少なくとも2つの一次変異を含み、かつ場合によって、少なくとも1つの二次変異がE8X、T10X、D25X、K32X、D46X、E59X、E95X、D108X、K122Xから成る群より選択される。この実施形態は、足場タンパク質の表面上の単一のエピトープ領域の確立と前記分子の他の部分の抗体アフィニティーを低減させる別の例である。

【0039】

本発明の第6実施形態では、天然に存在するアレルゲンは、分類上イネ目(Poliales)、キク目(Asterales)又はイラクサ目(Ulticales)を起源とする。主要な草花粉アレルゲンPhi p 1の足場タンパク質の例は、アクセス番号Q07154で例示されるZea m 1のイソ型、アクセス番号U03860で例示されるGly m 1のイソ型、アクセス番号U31771で例示されるOry s 1のイソ型、アクセス番号:U95968、AC001229、U95967、s53082、U30477、U85246、Y07782、U30479、U30481、U30480、U30478、U30476、U30460、U30382、U64890、U64891、U64892、U64893、U82123、D26459、D8845で例示される -エクスパンシンのイソ型、アクセス番号:P14947、X73363、A48595、P43214、P14948、U25343、Z50867で例示される2群及び3群の草アレルゲンのイソ型である。Phi p 5は、草花粉アレルゲンの別の例である。チモシー(Phleum pratense)5群アレルゲン、Phi p 5足場タンパク質としては、P93466、081342、Q9SBE0、081343、081344、2023228A、S38584が挙げられる。ドクムギ(Lolium perenne)5群アレルゲン、Lol p 5足場タンパク質としては、CAB64344、Q9XF24、a38582が挙げられる。ポラ・プラテンシス(Poa pratensis)5群アレルゲン、Poa p 5足場タンパク質としては、Q9FPR0、B39098が挙げられる。(023971、023972、Q9FPQ9)で例示されるホルカス・ラナタス(Holcus lanatus)5群アレルゲン、Hol l 5のイソ型が挙げられる。(MP51_PHAHQ)で例示されるファラリス・アクアチカ(Phalaris aquatica)5群アレルゲン、Pha a 5のイソ型。(Q93XE0、Q93XD9)で例示されるオーチャードグラス(Dactylis glomerata)5群アレルゲン、Dac g 5のイソ型。(004828)で例示されるHor v 9とも呼ばれるオオムギ(Hordeum vulgare)5群アレルゲン、Hor

v 5のイソ型。(Q65868、CAA76557)で例示されるチモシー(*Phleum pratense*)6群アレ
ルゲン、Phi p 6のイソ型。

【0040】

本発明の第7の実施形態では、天然に存在するアレルゲンはダストダニアレルゲン、好
ましくはヒョウヒダニ(*Dermatophagoides*)を起源とする、好ましくはDer p 2(デー
タベースアクセッション番号:P49278)である。好ましいDer p 2足場タンパク質は、Eur m
1(データベースアクセッション番号:P25780)、Gly d 2(データベースアクセシ
ョン番号:AJ272216)、及びLep d 2(データベースアクセッション番号:S66499)である
。

Lep d 2タンパク質変種の具体的な実施形態は、D17L、D17I、D17V、D17M、S19P、Q32K 10
、Q32R、Q32H、K33P、T35Q、T35N、N88K、N88R、N88H、T92N、T92Q、A95K、A95R、A95Hか
ら成る群より選択される少なくとも2つの一次変異と、場合によって、K6X、S22X、R30X
、K76S、K81X、V114Xから成る群より選択される1以上の二次変異を含むタンパク質変種
である。これは、前記タンパク質の表面上に単一のエピトープ領域が確立され、場合によ
っては前記表面の他の部分でDer p 2抗体交差反応性が下方制御されているLep d 2タン
パク質変種の例である。

Lep d 2タンパク質変種の別の具体的な実施形態は、単一のエピトープ領域内に、D45N
、D45Q、N47K、N47R、N47H、K48T、K48S、T50K、T50R、T50H、K52E、K52D、L54K、L54R、
L54H、E107K、E107R、E107M、H112D、H112E、T119I、T119L、T119V、T119Mから成る群よ
り選択される少なくとも2つの一次変異と、場合によって、K6X、S22X、K29X、R30X、K76 20
X、K81Xから成る群より選択される1以上の二次変異を含むタンパク質変種である。

【0041】

Gly d 2タンパク質変種の具体的な実施形態は、K2Q、K2N、K4D、K4E、K10N、K10Q、T14
K、T14R、S22H、S22R、S22K、K39V、K39L、K39I、K39M、D45N、D45Q、T60L、T60V、T60I
、T60M、Q63D、Q63E、K80V、K80L、K80I、K80M、T91S、H112D、H112E、R112I、R122V、R1
22L、R122Mから成る群より選択される少なくとも2つの一次変異と、場合によって、K6X
、好ましくはK6R又はK6H、R30X、好ましくはR30K又はR30H、F74X、好ましくはF74Y又はF7
4W、K81X、好ましくはK81R又はK81H、K88X、好ましくはK88R又はK88H、T90X、及びV114X
、好ましくはV114L、V114I又はV114Mから成る群より選択される1以上の二次変異を含む 30
タンパク質変種である。これは、Der p 2に比べてIgE反応性が高く、かつ場合によっては
前記タンパク質変種の不安定化を回避するため、アミノ酸が相同アミノ酸残基で置換され
る二次変異を有するタンパク質変種の例である。

Der p 2足場タンパク質の他の具体的な実施形態は、アクセッション番号002380で例示
される2群ダストダニであるケナガコナダニ(*Tyrophagus putrescentiae*)アレルゲンTyr
p 2のイソ型、アクセッション番号:P80384、S48727、2118249Bで例示される貯蔵ダニ、
レピドグリファス・デストラクター(*Lepidoglyphus destructor*)2群アレルゲンLed d
2(誤ってLed d 1と称している刊行物もある)のイソ型、アクセッション番号:CAB76459
、Q9U5P7で例示されるGly d 2のイソ型、アクセッション番号097763、P79345、Q9VQ62、Q
9Z0J0、AAF99719、Q28895で例示される相同タンパク質の群由来のイソ型である。

さらに好ましい実施形態では、主要ハウスダストダニアレルゲンDer p 1の足場タンパ 40
ク質はDer f 1(アクセッション番号P16311)である。

【0042】

本発明の第8の実施形態では、天然に存在するアレルゲンは、ゴキブリ(チャバネゴキ
ブリ(*Blattella germanica*))(アレルゲン:Bla g 1又はBla g 2)、ワモンゴキブリ(*Perip
laneta americana*)(アレルゲン:Per a 1)又はミジ(midges)(*Chironimus Spp.* - アレ
ルゲン:Chi t 1)由来の昆虫アレルゲンである。

本発明の第9の実施形態では、天然に存在するアレルゲンは、動物アレルゲン、好まし
くは哺乳類アレルゲン、好ましくはネコ、イヌ、ラット、マウス又はウマを起源とし、好
ましくはネコ由来のFel d 1である。

本発明の第10の実施形態では、天然に存在するアレルゲンは、毒物アレルゲン、好まし 50

くは分類上膜翅目、スズメバチ科、ミツバチ科、又はアリ上科を起源とする。好ましい毒物アレルゲンはVes v 5である。可能なVes v 5足場タンパク質として、P35783、P35760、P35785、P35784、P35787、P35736、P35786、P10737、Q05108、P35781、P35782、P81657、P81656、P35780、P35759、Q05109、P35779、P35778が挙げられる。(P54108、O19010、P16562、Q16937、P48060、Q60477、P35795、P35795、Q09566、P47033、Q40374、P12020、Q41359、P47032、Q91055、Q034401、P08299、P11670、P36110、P16563、P54107、Q08697、Q04108、P79845、P07053、P09042、P35794、P04284、Q03402、P33154、P35792、Q05968、P35793、Q00008、Q41495、P16547、P13390、O22456、Q15335、Q62871、O88487、Q13409、P54131、Q9LRZ5、P18859、O04067)で例示されるさらに他の低相同タンパク質。

本発明の第11実施形態では、天然に存在するアレルゲンは、ピーナッツ、大豆、牛乳、鶏卵の白身と黄身、シュリンプ又はタラ由来の食物アレルゲンである。 10

【0043】

本発明の第12の実施形態では、足場タンパク質は、植物、草、食物、又はダニアレルゲンに相同的である。この実施形態のタンパク質変種は、少なくとも1個の一次変異を含む。さらに、タンパク質変種は、天然のアレルゲンのデコンボリューションした(deconvoluted, 逆重畳)CD-スペクトルと比較して30%未満、好ましくは20%未満、なおさらに好ましくは10%未満しか偏差のないデコンボリューションCD-スペクトルを有する。好ましくは、足場タンパク質は、天然に存在するアレルゲンと30~50%の配列同一性のレベルを有し、かつ好ましくは、前記足場タンパク質と天然に存在するアレルゲンの炭素骨格鎖三次構造は、それらの円偏光二色性スペクトル間の偏差が、30%未満、好ましくは20%未満、なおさらに好ましくは10%未満しか偏向しないであろう程度まで相互に類似している。 20

本発明の第13の実施形態では、天然に存在するアレルゲンは真菌タンパク質である。

好ましくは、本発明のタンパク質変種は、天然に存在するアレルゲンに特異的なT細胞クローン又はT細胞株を刺激できる少なくとも1個のT細胞エピトープを含む。

従って、タンパク質変種は、好ましくはTh2 T細胞応答に加えて新しいアレルゲン特異的Th0/1 T細胞免疫応答を誘導し、或いは足場タンパク質変種は、T細胞アネルギー又はTh2型からTh1型へのT細胞応答のシフトを誘導する。

【0044】

さらに、本発明は、本発明のタンパク質変種の、医薬品として使用するため及びアレルギ-の治療又は予防用薬物の製造のための使用に関する。好ましくは、医薬組成物は2種以上の本発明の組換えタンパク質変種を含み、各変異体は、他の変異体の少なくとも1つには存在しない少なくとも1つの一次変異を有することによって規定される。このようにして、例えば肥満細胞の表面上のIgE架橋結合という危険性を最小限にしなが、天然に存在するアレルゲンのエピトープを模倣する異なったエピトープ領域の提示を達成しうる。本発明の組成物は、好ましくは2~12、好ましくは3~10、さらに好ましくは4~8、最も好ましくは5~7種の異なるタンパク質変種を含む。このような組成物は、アレルギ-を予防及び/又は治療するための医薬品の製造に使用することができる。 30

【0045】

本発明の医薬組成物は、好ましくはさらに生理学的又は薬学的に許容しうる担体及び/又は賦形剤及び/又はアジュバントを含む。“担体”又は賦形剤は、油、デンプン、スクロース及びラクトースのような医薬品と共に通常使用されるいずれの担体又は賦形剤も包含する。本発明の組成物は、カプセル剤、丸剤、錠剤及びシロップ剤を含む経口摂取に適した形態でよい。或いは、本発明の組成物は、例えば、静脈内、皮下等の投与に好適な非経口製剤の形態でよい。 40

“アジュバント”は、抗原と一緒に注射するとき、抗体合成を刺激かつ延長する物質を意味する。アジュバントの例として、フロイント完全/不完全アジュバント及び水酸化アルミニウムゲルが挙げられる。本発明の医薬組成物は、好ましくはアレルギ-に苦しむ患者内で天然に存在するアレルゲンによって誘発されるアレルギ-反応に対するワクチンの形態である。

【0046】

本発明の範囲には、本発明の組換えタンパク質変種又は医薬組成物を被験者に投与することを含む、個体の免疫応答を生じさせることによって個体のワクチン接種又は治療の方法が包含される。

本発明の組換えタンパク質変種又は組成物を薬学的に許容しうる物質及び/又は賦形剤及び/又はアジュバントと混合する医薬組成物の製造方法も本発明の範囲に含まれる。

本発明のさらなる局面は、組換えタンパク質変種の製造方法を含み、前記組換えタンパク質変種は、足場タンパク質と天然に存在するアレルゲンをコードするDNAのDNAシャッフリング(分子育種)によって得たDNA配列から生産される。

最後に、本発明は、組換えタンパク質変種をコードするDNA配列に関する。同様に、本発明は、本発明のDNA配列を含有し、かつ組換えタンパク質変種を生産できる発現ベクターと宿主細胞を含む。宿主細胞をベクターと共に培養する工程を含む組換えタンパク質変種の製造方法も本発明に含まれる。組換えタンパク質変種を用いて被験者の治療の妥当性、安全性、又は結果を評価するための診断アッセイも本発明に含まれ、このアッセイでは、被験者のIgE含有試料を前記タンパク質変種又は前記組成物と混合し、かつ前記試料中のIgEと前記タンパク質変種の反応性のレベルを評価する。

10

【0047】

(定義)

足場タンパク質：足場タンパク質は、多くの場合、アレルギーワクチン接種用に選択されるアレルゲンと有意な程度のアミノ酸配列相同性を有する天然に存在するタンパク質である。さらに、足場タンパク質は、天然に存在するアレルゲンの三次元折りたたみ様式と類似した三次元折りたたみ様式を有する。2つのタンパク質が類似した折りたたみ様式を有するために満たさなければならない基準について正確な定義を与えることは難しい。しかし、当業者は、10%を超えるアミノ酸相同性を有するタンパク質又はタンパク質ドメインは、類似した様式で折りたたまれ、かつ類似した量の α -ヘリックス、ランダムコイル、及び β -シートを共有することを知っている。これは、例えば円偏光二色性によって測定することができ、それによれば、これらの2つのタンパク質スペクトル間の偏差は30%未満、好ましくは20%未満、さらに好ましくは10%未満しか偏向しないであろう。

20

好ましくは、足場タンパク質のアレルゲン特異的IgEとの測定可能な反応性はほとんど或いは全くなく、それによってアレルゲン特異的表面領域、すなわち足場タンパク質上のエピトープ構造の確立が可能になる。アレルゲン特異的エピトープ領域を1つだけ有する変異した足場タンパク質は、1つのIgE分子以外とは結合できないので、例えば肥満細胞の表面に結合したIgE分子の架橋結合を引き起こすことができない。本明細書では、アレルゲンエピトープに類似するタンパク質変種表面領域を例えば“エピトープ領域”、“エピトープを模倣する”等と称する。

30

【0048】

“アレルゲン特異的抗体”、例えばBet v 1特異的抗体は、天然に存在するアレルゲンと反応する抗体を意味する。このような抗体は、さらに変異体変種を含む他の構造的に関連するタンパク質と反応しうる。

足場タンパク質とアレルゲンの間の配列相同性の程度は、0~95%、好ましくは5~90%、さらに好ましくは10~67%、なおさらに好ましくは20~60%、最も好ましくは30~50%である。イソ型又は相同性タンパク質として2つのタンパク質を特徴づけするために最低度の配列同一性として67%が選択されることが多い(Kingら, (1995) J. Allergy Clin. Immunol. 96:5-14)。足場タンパク質は、好ましくは天然に存在するアレルゲンのイソ型又は相同性タンパク質ではなく、それによって足場タンパク質がアレルゲンとの低度の抗体交差反応性を有することを保証する。

40

タンパク質変種は、足場タンパク質に比べて天然に存在するアレルゲンに特異的な抗体について高い結合能を有する：このことは、完全なタンパク質変種のみならず単一のエピトープについてもいえる。

天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体への結合性のない足場タンパク質：変異のために選択される足場分子は、問題のアレルゲンに特異的な抗体と結合性を欠いていて

50

よく、或いは好ましくは、問題のアレルゲンに対する平均的なアレルギー患者由来のIgE抗体が交差反応性であってもよい。抗体結合性を欠くとは、 10^3 、さらに好ましくは 10^4 、最も好ましくは 10^5 以上の係数の平均抗体アフィニティーの減少を意味する。ポリクロナールでは、抗体アフィニティーは、通常平均アフィニティーである。モノクロナール抗体では、アフィニティーはアビディティー（抗体結合力）とも呼ばれる。

【0049】

一次変異（エピトープの生成、骨格鎖の安定化など）：一次変異の導入は、置換、欠失又は付加であり得る。好ましくは、一次変異は、少なくとも1個の骨格アミノ酸残基と、天然アレルゲン中の対応する位置に見られるアミノ酸に同一又は相同な残基との置換である。好ましくは、タンパク質変種は、2～50、さらに好ましくは2～40、さらに好ましくは3～25、さらに好ましくは4～15、最も好ましくは5～12個の一次変異を含む。また、タンパク質変種は、いくつかの連続的な変異したアミノ酸から成る1以上の変異した配列断片を含みうる。好ましくは、変異した配列断片は、2～15、さらに好ましくは3～12、最も好ましくは5～10個のアミノ酸から成る。

本発明の好ましい実施形態では、タンパク質変種のすべての一次変異は、約900の面積を有する表面領域内に位置する。本発明のこの好ましい実施形態では、タンパク質変種は、天然に存在するアレルゲンに特異的なIgE抗体に反応性のエピトープを1つだけ有する。このようなタンパク質変種は、望ましくない免疫応答、例えばアナフィラキシー反応を引き起こさないという利点を有すると考えられる。なぜなら、このような応答は引き金となるIgE架橋結合を必要とする、すなわちこのような応答は、アレルゲンが少なくとも2個の重複しないエピトープを有する必要があるからである。

【0050】

好ましくは、変異を起こさせる一次アミノ酸残基は、表面露出アミノ酸である。変異を起こさせるアミノ酸残基は、20%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上、最も好ましくは50%以上の溶媒接近性を有することが好ましい。

表面露出アミノ酸の変異、すなわちエピトープを構成するアミノ酸の変異に加え、或いはその代替として、タンパク質の骨格鎖のアミノ酸、すなわちタンパク質三次構造の内部に位置するアミノ酸を変異させてもよい。このような変異は、前記分子のフォールディングを修飾し、ひいてはタンパク質の表面上のエピトープの結合特性を変える可能性がある。変異の1つの目的は、骨格のフォールディング、ひいてはタンパク質の三次構造を安定化することであってもよい。一例は、ジスルフィドブリッジの導入である。

本発明の一実施形態では、変異の1以上は部位特異的変異導入によって行われる。部位特異的変異導入は、例えば、Sambrook & Russelの“Molecular Cloning” (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Pressに詳述されているように行うことができる。

【0051】

DNAシャッフリング：DNAシャッフリングはいくつかの組換え法を含む用語であり、有意な相同性を共有するいくつかの配列又は配列断片が、例えば消化、超音波処理などによって破壊されるいくつかの組換え法を含む用語である。再連結及び引き続くPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によって、基本的にランダムに多数の新規な変異体が生成される。DNAシャッフリングは、例えば反応中に明確に規定された配列を有するプライマーを導入することによって、より制御した様式で行うこともできる。

遺伝子ライブラリー法：遺伝子ライブラリー法は、変異したタンパク質の変異体をコードする何れの形態のDNAライブラリーの構築、発現及びスクリーニングをも包含する。タンパク質コーディングDNA配列は、半ランダム又はランダムに変異しうる。半ランダムライブラリーを表す非限定的な例は、変異した遺伝子変異体が、表面露出アミノ酸残基を表すDNAコドンに関してのみ変異を導入されたライブラリーである。別の例は、変異の結果についての何らかの制限であり、すなわち、変異が、特定のアミノ酸残基、すなわち相同アミノ酸残基、小さい又は荷電した/荷電していないアミノ酸残基に対する置換だけを許す場合である。一例では、縮重したオリゴヌクレオチドプライマーとPCR法を用いて多様性が導入される。別の例では、高頻度で変異を導入する宿主生物を用いて変異多様性が導

10

20

30

40

50

入される。1以上の変異が半ランダムライブラリー方法論で導入される。

【0052】

二次変異（エピトープの弱化／排除）：二次アミノ酸変異は、足場タンパク質中に、天然に存在するアレルゲン中の対応する位置に存在しないアミノ酸残基を導入する変異である。

二次アミノ酸変異は、置換、欠失又は付加であり得る。好ましくは、タンパク質変種は0～50、さらに好ましくは1～40、さらに好ましくは2～25、さらに好ましくは3～15、最も好ましくは4～12個の二次変異を含む。また、タンパク質変種は、それぞれいくつかの連続的な変異したアミノ酸から成る1以上の二次変異を含みうる。好ましくは変異した配列断片は、2～15、さらに好ましくは3～12、最も好ましくは5～10個のアミノ酸から

10

成る。上述したような二次変異の目的は、足場タンパク質のエピトープを修飾してその抗体結合効果、ひいてはIgE架橋結合とアナフィラキシー反応を誘導する危険性を排除又は減らすことである。

【0053】

エピトープ移植：エピトープ移植は、足場タンパク質の表面上にアレルゲン特異的抗体結合特性を確立することとして理解される。この“移植を受けた”足場タンパク質変種は、防御免疫応答を起こす能力の故に、アレルギーに対する魅力的なワクチン候補を提示する。

防御免疫応答：防御免疫応答を起こすとは、アレルギーに関連する有害な効果を回避するため、天然に存在するアレルゲンに対する免疫系の反応を変えることを意味する。防御免疫応答は、おそらくアレルゲンとIgE抗体の相互作用を遮断する多数のIgG抗体の生産によって大部分媒介されると考えられる。防御免疫応答は、おそらくT細胞の刺激をも含むだろう。

20

表面構造／輪郭：タンパク質の三次元フォールディングは、炭素骨格鎖の三次フォールディングによって決まるが、タンパク質の形態学（トポグラフィ）と電荷分布に関する分子表面／輪郭の性質は、表面に存在し、従ってある程度の溶媒接近性を示すアミノ酸鎖の性質と組成によって部分的に決まる。従って、タンパク質表面に一次及び／又は二次変異を導入すると、タンパク質の表面構造／輪郭の性質を変えるだろう。

【0054】

本発明の組成物：本発明の組成物又は医薬組成物は、少なくとも1種の足場タンパク質変種及び他の医薬又は非医薬試薬、賦形剤、アジュバント、担体、媒体又は薬物送達システムを含みうる。

30

タンパク質変種：1個以上のアミノ酸によって天然に存在するタンパク質と異なるアミノ酸配列を有するタンパク質。好ましくは、本発明のタンパク質変種は、足場タンパク質の組換えタンパク質であり、前記タンパク質変種は、天然に存在するアレルゲンと有意なアミノ酸配列相同性を有するアレルゲンに対してアレルギーである個体由来の患者血清と反応することができる。しかし、本タンパク質変種は、天然に存在するアレルゲンと比べて低度のIgE反応性を有する。

アミノ酸同一性の程度：アミノ酸同一性の程度は、本明細書では、2つの一次タンパク質配列中、対応する位置について同一であるアミノ酸残基のパーセンテージで定義する。

40

アミノ酸相同性の程度：アミノ酸相同性の程度は、本明細書では、2つの一次タンパク質配列中、対応する位置について同一又は相同であるアミノ酸残基のパーセンテージで定義する。

アレルゲン：本発明のアレルゲンは、アレルギーを誘導する、すなわち、それが繰り返し個体にさらされたときのIgE媒介反応を誘導すると報告されている任意の天然に存在するタンパク質である。天然に存在するアレルゲンの例として、吸入アレルゲン（木及び草の花粉アレルゲン、ダニアレルゲン、昆虫アレルゲン（吸入及び毒物アレルゲン）、例えばイヌ、ネコ、ウマ等由来の動物の毛やふけアレルゲン）、及び食物アレルゲンが挙げられる。

50

【0055】

免疫応答の調節：アレルゲンの構造を部分的に模倣する組換えタンパク質変種でワクチン接種をすると、“免疫応答”はいくつかのレベルで起こると考えられる：(a) タンパク質変種が、(例えば肥満細胞に)既に結合しているか或いは循環内で見いだされる既に形成されたIgEに結合し、肥満細胞の表面上におけるIgE架橋結合を生じさせないかもしれず、(b)新規なIgG抗体が形成され、或いは既存のIgG抗体がエピトープアフィニティーを高めるため“成熟”するようになるかもしれず、かつ(c)新規又は既存のT細胞が活性化されるようになるかもしれない。従って、本発明の内容の免疫応答の調節は、組換えタンパク質変種の、防御的IgE応答を誘導し、かつ好ましくはT細胞も刺激し、同時に例えば肥満細胞の表面上のIgE架橋結合のリスクを低減する能力として解釈される。アレルゲン曝露後の有害効果の原因と考えられるのは、主に肥満細胞の表面上のIgE架橋結合である。

10

【0056】

アレルゲン変異体が“天然に存在するアレルゲンの免疫応答に相当する免疫応答”を引き起こすかどうかは、いくつかの方法で測定することができる。本発明に限らず、これを測定する好ましい方法は、少なくとも1つのイムノアッセイで統計的に有意な様式($p < 0.05$)で、足場タンパク質変種の、アレルギー患者由来の血清IgEに結合する能力を測定すること、又はアレルギー被験者由来の血清IgEの天然に存在するアレルゲンに対する結合性を阻害する足場タンパク質変種の能力を測定することによる。別の好ましい方法は、足場タンパク質変種免疫化動物由来の血清試料中の抗体の、イムノアッセイにおけるアレルゲン特異的IgEに対する結合性と競合する能力の測定である。

20

抗体-抗原相互作用のアフィニティー：抗体-抗原相互作用の特異性とアフィニティーは、同じ事の裏表である。この理由は、結合力、すなわちアフィニティーは、誘引力(エンタルピー寄与)、すなわちイオン相互作用、水素結合及びファンデルワールス相互作用によってのみならず、複合体中の2つの分子間の境界から水分子のほとんど完全な置換によって(エントロピー寄与)も決まることである。一般的に言えば、これは、分子表面の局所的輪郭の完全な適合が非常に重要であることを意味する。

適合性が(例えば変異の結果として)減少すると、ほとんど必ず相互作用のアフィニティーの減少につながる。複合体はなお形成されるであろうが、それはより高濃度においてであり、かつキネティクスの点では平衡がずれるので、任意の時点において抗原分子と抗体分子の多くが自由溶液中にあり、逆に、より少ない割合の分子が複合体として結合しているだろう。

30

このように、反応物のいずれか、すなわち抗原又は抗体のいずれの濃度を増やしても、アフィニティーとは関係なく複合体の濃度の増加につながる。一般的に言えば、これは、どのような抗原も濃度が十分高いことを条件にどのような抗体にも結合することを意味する。このことは、生理的濃度に近い濃度で反応が起こることを保証するため(すなわち特異的相互作用)、何らかの制限を反応体の濃度に課されなければならないことを意味する。

【0057】

その結果として、Kdが、相互作用のアフィニティーの直接的尺度ということにもなる。しかし、実際には、通常ポリクロナール抗体が利用されるのでKdは難しい尺度である。一定の[Ab]で $\log[Ag]$ の関数として[AgAb]をプロットするとS形曲線が得られる。最大結合性の半分における[Ag]が実用上有用な尺度であるが、それはKdとBmaxの組合せの尺度である。飽和状態における[AgAb]は、所定の[Ag]における定数、Bmaxである。Bmaxは結合の最大レベルなので概念的に理解しやすいが、実際には、十分高い濃度のAgを達成することは困難だろう。Bmaxは結合能である。従って、任意の[Ab]における結合能の相対尺度を比較することができる。

40

【0058】

表面の一部が有意に変わるように変異させた抗原は、非変異抗原に特異的なポリクロナール抗体に対して、より低い結合能を有する。変異した抗原とポリクロナール抗体との

50

相互作用の平均アフィニティーもおそらく減少するだろう。しかし、ポリクロナール抗体の特異性が表面全体わたってランダムに分散していない場合（個々の患者由来のいくらかのIgEで既知の状況である）、或いはモノクロナール抗体の場合、すなわち、抗体によって認識されるエピトープが変異によって影響を受けた領域の外側である場合、結合能および平均アフィニティーは変異によって影響されない。患者の血清又は大量免疫による実験動物で産生されたポリクロナール抗体のプールの場合、この状況が起こる機会は減少する。

【0059】

本発明により、問題のアレルゲンに特異的な抗体に対して全表面上で均等化した低アフィニティー相互作用を達成するという目的のために、いくつかの表面領域において平均アフィニティーを減少させるためにこれら領域に変異を導入し、また他の場所ではその反対のを行うことがある。これらの足場タンパク質変種は問題のアレルゲンと類似の抗体結合能を有するが、平均アフィニティーはかなり減少している。インビトロ試験システムにおいて、肥満細胞又は好塩基球の表面上の受容体-結合IgEを架橋することによってヒスタミンを放出する能力を用いて、足場タンパク質変種のこれらの複合した特徴を評価することができる。ヒスタミンを放出する潜在力はある程度まで平均アフィニティーを反映し、かつある程度までそれは関連する臨床反応を反映する。さらに、このような足場タンパク質変種はIgG抗体の生産を刺激し、それらはおそらく天然アレルゲンと低アフィニティーで相互作用するだろう。IgEに比べてIgG抗体は大量なため、低アフィニティーのIgG相互作用でさえ、天然アレルゲンと低濃度のIgEとの高アフィニティー相互作用を有利に妨げるための能力を有すると考えられる。

【0060】

IgE反応性、例えば結合能及び結合アフィニティーの評価

足場タンパク質変種のIgE反応性の評価を取り扱う実験的アプローチは、多くの方法で達成することができる。例えば、Kd、すなわち抗体-抗原相互作用の平均アフィニティー、及びBmax、すなわち結合能は、固相免疫-阻害アッセイ又は直接結合アッセイで実験的に取り扱うことができる。

固相免疫-阻害アッセイでは、抗体を固相に結合することができる。この実験は固相結合抗原を用いても達成できる。精製かつ標識したアレルゲンの結合を、試験抗原、すなわち変異した足場の希釈列で阻害し、非変異分子を用いて行った同様の実験と比較する。インヒビター濃度の対数の関数として阻害率をプロットすると、その関係はS形曲線に相当する。変異した抗原が、改変されたKdを有するが同一のBmaxを有する場合、これはx軸に沿った曲線の平行移動に対応する。より高いアフィニティーは、曲線を左にずらし、逆もまた言えるだろう。Bmaxの変化は、曲線の最大レベル及びS形曲線の直線部分の傾きに影響するだろう。変異させた抗原を非変異分子と比較する場合の全てにおいて、前記曲線の直線部分を直線性について統計的に調べることができ、かつ曲線の直線部分が平行であるかどうか、又は完全曲線適合、すなわち4変数対数曲線適合(four parameter logistic curve fit)から得られるパラメーター間の比較を統計的分析に利用することができる。曲線が平行であり、かつ相互に移動している場合は、抗体-抗原相互作用の異なるアフィニティーの指標である。傾きが異なる場合は、エピトープ組成、すなわち結合能の変化又は結合能とアフィニティーの両方の変化の指標である。

【0061】

表面露出アミノ酸：表面露出アミノ酸とは、アレルゲンが溶液中にある場合にアミノ酸残基の少なくとも1個の原子の少なくとも一部が周囲の溶媒と接触するために近づきうるように、三次元構造の表面にアミノ酸残基が位置することを意味する。好ましくは、三次元構造内のアミノ酸残基は、少なくとも20%、好適には少なくとも30%、さらに好適には少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%の溶媒（水）接近性を有する。

溶媒接近性：溶媒（水の場合、 $r = 1.4$ ）分子に匹敵する直径を有する球に近づきうる分子の領域として定義される。表現“表面露出”、“表面アミノ酸”、及び“溶媒曝露”は、相互交換可能に使用される。

10

20

30

40

50

相同なアミノ酸残基：相同なアミノ酸残基は、本質的に同一の化学的特徴を共有することによって特徴付けられる。アミノ酸を分類する例は、Ala、Val、Leu、Ile、及び時にはGly及びProを“脂肪族残基”と特徴づけることである。他の“群”として、ヒドロキシル残基（SerとThe）、酸性残基（AspとGlu）、アミド残基（Asn、Try、及びGln）、塩基性残基（LysとArg）、及び芳香族残基（Phe、Tyr、及びTrp）が挙げられる。勿論、類似の化学的特徴を共有する群へのアミノ酸の他の分類は可能であり、例えば、アミノ酸の疎水性及び親水性残基への分類が可能である。

【0062】

以下の非限定的実施例により本発明をさらに説明する。

（実施例）

実施例 1

Bet v 1に相同な足場タンパク質の修飾

部位特異的変異導入

すべてのMal d 1変異体は以下のように生成した。第1に(I)、図1(I)に概略的に示されるように、Mal d 1(2620)（アクセッション番号：AJ488060）をコードするDNA配列中に、Mal d 1の各変異に適合させたセンス及びアンチセンス変異特異的オリゴヌクレオチドプライマーを、上流若しくは下流の隣接変異又はN末端/C末端のいずれかに適合させたセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーと共にそれぞれ用いて、各単一変異（又はDNA配列内で一緒に近接して位置する場合は数個の変異）を導入した。第2に、図1(II)に概略的に示されるように、PCR反応(I)からのPCR産物をアガロースゲル電気泳動法及びPCRゲル精製法で精製し、混合し、Mal d 1のN末端およびC末端に適合するオリゴヌクレオチドプライマーとのさらなるPCR反応(II)のための鋳型として使用した。このPCR産物をゲル電気泳動法及びPCRゲル精製法後エタノール沈殿法で精製し、制限酵素（Sac/EcoRI）又は（SacI/XbaI）で切断し、かつ同一酵素で制限されたpMAL-c中に方向を定めて連結した。

ヌクレオチド配列決定

0.1g/lのアンピシリンを添加したLB培地内で一晩、飽和まで成長させた10mlの細菌培養からのプラスミドDNAをチップ20カラム（QIAGEN）で精製し、迅速反応色素終結周期配列決定（Ready reaction dye terminator cycle）キット及び蛍光シークエンサーAB PRISM 377（両者ともPerkin Elmer）を用い、供給業者の推奨に従って配列決定した。

【0063】

タンパク質発現及び精製

組換えMal d 1(2620)および変異体を、アミノ末端大腸菌融合パートナー、マルトース結合タンパク質（MBP）とのオペロン（in operon with）として、大腸菌DH 5 細胞内で過剰発現させた。100mg/Lのアンピシリンを添加した1リットルのLB-培地を含有する6本の5Lフラスコに、37℃で振とうして600nmで0.75の光学密度まで増殖させた形質転換大腸菌細胞の一夜培養物10mlを接種後、5mlの100mM IPTGを添加して誘導し、誘導3時間後に遠心分離で収集した。6Lの培養からの細胞を2x150mlの溶解緩衝液（30mM NaCl、10mM EDTA、1mMのベンズアミジン、10µg/ml SBTI、10mM Na₂HPO₄・12H₂O/NaH₂PO₄・H₂O緩衝液、pH 7.0、0.02% NaN₃）に再懸濁させ、3mM PMSFを加え、氷上で10分間超音波処理により溶解させた。超音波処理後、1.5mlの1mg/ml DNase、5mM MgCl₂及び40mlの4M NaClを添加後、室温で30分間インキュベーションすることによってDNAを除去した。細胞溶解物を30分間12000rpm、4℃で遠心分離機にかけた。上清（300ml）を集め、0.45µmのフィルターでろ過後、1200mlの希釈緩衝液（0.5M NaCl、2mM EDTA、1mMのベンズアミジン、10µg/ml SBTI、10mM Na₂HPO₄・12H₂O/NaH₂PO₄・H₂O緩衝液、pH 7.0、0.02% NaN₃）を添加した。Unicore 4.0ソフトウェアを搭載したAkta探索システム（Pharmacia Biotech, Sweden）で200mlのアミロースカラムを操作することによって、組換え融合タンパク質をアミロースアフィニティークロマトグラフィーにより単離した。溶出した融合タンパク質を、30kDaカットオフフィルターを備えたアミコン（amicon）圧力セルを用いて30mlまで濃縮し、2x5Lの20mM TRIS-HCl pH 8.0に対して一晩透析した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

すべてのMBP-Mal d 1融合タンパク質を、切断緩衝液（20mM TRIS-HCl pH 8.0、100mM NaCl、2mM CaCl₂、0.02% SDSから1.00%）中で、融合タンパク質濃度OD280 = 4～6にて1%の1mg/mlの第Xa因子と共にゆっくり攪拌しながら20℃で20時間切断した。5mMのベンズアミジンと10mMのEDTAを添加して第Xa因子切断を停止した。10kDaのカットオフフィルターを備えたアミコン圧力セルを用いてタンパク質溶液を20mlまで濃縮し、50mlのスーパーループに添加後、10ループ用Pharmacia Sephadex G-75カラムを用いるFPLCに供し、供給業者の推奨に従ってAkta探索システムで操作した。Mal d 1を含有するタンパク質フラクションを集め、NaClを200mMまで、DTTを5mMまで添加し、ろ過（45μm）後、アミロースアフィニティークロマトグラフィーの第2回目に供した。精製したMal d 1を含有するタンパク質フラクションを集め、2x5LのTRIS-HCl緩衝液、pH 7.5に対して透析後、3又は10kDaのカットオフフィルターを備えたアミコン圧力セルを用いて、4℃又は-80℃で貯蔵するため1mg/mlを超えるまで濃縮した。真正なアミノ末端を有するMal d 1変異体を、培養基1リットル当たり2～5mg収量で電気泳動的に均一にまで精製した。すべての精製Mal d 1調製物は、銀染色SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、単一バンドとして現れ、見掛け分子量は17.5kDaだった。

10

【 0 0 6 5 】

円偏光二色性分光法

円筒形（31-Q1/CD）又は方形（21-Q-1/CD）の0.1cm光経路石英キュベット（Starna. Essex, UK）を備えたOLIS DSM 10 CD分光計（On Line Instrument Systems, Bogart, Geo, USA）を用いて円偏光二色性スペクトルを得た。スペクトルは、260nm～184nmの間で記録し、2nmごとにデータを収集し、スペクトルあたり38個のデータ点を記録した。キュベットの温度はJulabo Model F30-C浴/循環器温度制御モジュール（Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany）を用いて一定に維持した。0.01Mのリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.2中、0.1mgのタンパク質/mLの濃度でスペクトルを得た。各スペクトルは、緩衝液吸収について補正し、かつ260nmで吸光度 = 0 に正規化した4つの測定値の算術平均を表す。下記式を用い、記録したmDegを吸光度に変換した：

20

$$\text{Abs} = \text{mDeg} / (32980 \times c \times l) \text{ Abs単位} / (\text{M} \times \text{cm})$$

式中、mDegは円偏光二色性シグナル、cは、アミノ酸分析で測定されたmol/Lで表した濃度であり、lはcmでの光経路の長さである。

30

【 0 0 6 6 】

IgE-結合実験

個々の患者由来の血清又は数人のカンパ花粉アレルギー患者由来の血清の等体積のプールを特異的血清IgE阻害アッセイに用いた。rMal d 1について上述したように、rBet v 1.2801（データベースアクセス番号：Z80104）を発現させ、精製し、1：5のモル比（Bet v 1：ビオチン）でビオチン化した。阻害アッセイは、ADVIA Centaur System（Bayer, Denmark）で以下のように行った：血清試料（25μl）を、モノクロナールマウス抗ヒトIgE抗体（ALK-Abello, Denmark）で被覆した常磁性ビーズ（固相）と共にインキュベートし、洗浄し、再懸濁し、一連の希釈列のビオチン化Bet v 1およびインヒビター（非ビオチン化Bet v 1、rMal d 1(2620)又は変異rMal d 1アレルギー）の混合物と共にインキュベートした。アクリジニウムエステル標識ストレプトアビジンとのインキュベーション後、測定される相対光単位（RLU）から、固相上で血清IgEに結合したビオチン化Bet v 1の量を測定した。阻害の程度は、緩衝液及びインヒビターとして変異体を用いて得たRLUの比として計算した。

40

【 0 0 6 7 】

ヒスタミン放出実験（rMal d 1(2762)及び(2781)）

100μlのピペス（Pipes）緩衝液pH7.4又は100μlのアレルギー希釈物（ピペス緩衝液pH7.4中）、1ng、3ng、10ng、30ng、100ng、1000ngのrBet v 1.2801、rMal d 1(2620)又は変異rMal d 1(2762)又は(2781)を三つ組で96ウェルプレートに添加した。プレートを37℃で予熱後、ピペス緩衝液pH7.4で1:5に希釈し、予熱した（37℃）100μlの血液を種々のア

50

レルゲン希釈物又はピペス緩衝液を有するウェルに添加した。プレートを37℃で30分間インキュベート後、プレート-ローターを備えた遠心分離機内で10分間800gで遠心分離した。各ウェルからの上清を新しい微量定量プレートの各ウェルに移し、蓋をし、かつ封止テープでシール後0℃でインキュベートした。

ELISAを基礎とするエンザイムイムノアッセイキットref. 2015 (Immunotech, France)を用い、供給業者の推奨に従って各試料内のヒスタミン放出を測定した。100µlの試料又は標準溶液を25µlのアシル化緩衝液及び25µlのアシル化試薬でアシル化し、後の抗-ヒスタミン-抗体への結合を可能にした。アシル化した50µlのヒスタミン試料、標準溶液又は負対照を、200µlのアルカリホスファターゼ結合ヒスタミンと共に抗-ヒスタミン-抗体コートウェルに添加し、振とうしながら5℃で2時間インキュベートした。希釈した洗浄溶液で3回プレートをすすいだ後、200µlのパラ-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) 基質溶液をプレートに添加し、振とうしながら室温で30分間インキュベート後、50µlの停止溶液を添加した。ヒスタミン試料及びヒスタミン標準溶液 (1nM、3nM、10nM、30nM、100nM、1000nM) の、アルカリホスファターゼ結合ヒスタミンの抗-ヒスタミン抗体コートウェルへの結合を阻害する能力を405nmでの相対吸光度として測定した。

10

【0068】

結果

260nm未満の遠紫外線領域でポリペプチド骨格鎖は吸収を示し、光学的に活性であり、吸光度の大きさは骨格鎖のコンホメーションによって決まる。円偏光二色性分光法により左-及び右-円偏光の吸収の差異を測定すれば、 α -ヘリックス、 β -シート又はランダムコイル要素のような二次タンパク質構造の変化を検出することができる。さらに、タンパク質の熱変性の際に円偏光二色性スペクトルを測定するとタンパク質の安定性についての情報が得られる。長期貯蔵又は緩衝液シフトに関してタンパク質の安定性を評価するため、生物学的試験の前に、すべてのタンパク質調製物に円偏光二色性分光法を適用した。rMal d 1(2620)に対して熱変性を行った。非変異rMal d 1(2620)とrMal d 1変異体(2781及び2762)はすべて天然の折りたたまれたrBet v 1.2801の円偏光二色性(CD)スペクトルに匹敵する形状のCDスペクトルを有していた(図2参照)。これは、rMal d 1分子がrBet v 1.2801と同一の二次構造要素を含むことを示している。

20

【0069】

リング由来のMal d 1イソ型は、Bet v 1と50~60%のアミノ酸同一性を有し、かつBet v 1特異的IgEとの限定的な反応性を示す。これは図3A及び3Bに示され、異なる血清プールからのカンバ花粉アレルギー患者血清IgEの、ピオチン化rBet v 1.2801への結合(rMal d 1(2620)で阻害される)が示されている[]。この阻害曲線は、血清プールAはrMal d 1(2620)と結合できず、rMal d 1(2620)は、血清プールB中のrBet v 1特異的IgE-抗体の20%未満にしか結合しないことを示している。天然に存在するイソ型なので、rMal d 1(2620)は安定なタンパク質である。これは図4に示されており、熱変性実験により、rMal d 1(2620)は70℃までの温度でその二次構造要素の大部分を維持することが示されている。さらに、熱変性実験は、タンパク質の完全な再フォールディング能力を示す。

30

従って、Mal d 1、例えばrMal d 1(2620)のイソ型はBet v 1の好適な候補足場とみなされる。

40

【0070】

いくらかのアミノ酸変動にもかかわらず、1つの大きい表面領域(図5A及び5B参照)はBet v 1 IgEとの高度な構造類似性を有する。この領域における交差反応性は、ある種のカンバ花粉アレルギー患者におけるリング誘発経口アレルギー症候群(OAS)と大いに関係する。足場タンパク質rMal d 1(2620)がカンバ花粉アレルギー患者にヒスタミン放出を引き起こす可能性を減らすため、カンバ及びリングタンパク質間で共通のrMal d 1(2620)上の表面領域に3種の二次変異、N28T、K32Q、E45Sを導入した。この変異体をrMal d 1(2760)と命名する。rMal d 1(2620)上の他の表面領域は、非常に高密度の、Bet v 1では見られないMal d 1特異的残基を有するので、これら領域内では交差反応性は生じないと予想される。このような表面構造がBet v 1特異的抗体に結合する可能性を高める

50

ため、足場タンパク質上のMal d 1特異的表面領域中に特異的アミノ酸残基を導入した。このような一次変異を含む2例のrMal d 1変異体は、rMal d 1(2781) (配列番号2) (図6A、B及びC参照)とrMal d 1(2762) (配列番号3) (図7A、B及びC参照)である。

【0071】

一次変異

rMal d 1(2762)及びrMal d 1(2781)において、それぞれ8及び6個の一次変異の導入は、rMal d 1(2620)に比べてこれら変異体のカンパ花粉アレルギー患者血清IgEと結合する能力を実質的に高めた。これは図8Aに示されており、rMal d 1(2762)及びrMal d 1(2781)のビオチン化rBet v 1.2801への血清-IgEの結合を阻害する能力は、3000ng/試験のインヒビター濃度でそれぞれ0%~62%及び39%増加した。さらに、rBet v 1.2801に比べてこれら変異体で62%及び39%のIgE阻害に達するにはそれぞれ500倍及び1000倍高い抗原濃度を必要とし、rMal d 1変異体がrBet v 1.2801よりかなり低いアフィニティーでIgEと結合することを示している。

10

さらに、変異rMal d 1分子をヒト好塩基球ヒスタミン放出アッセイで試験した。測定した抗原濃度範囲内では、非変異rMal d 1(2620)によってヒスタミン放出は起こらなかった。rBet v 1.2801及び変異rMal d 1は、すべてヒスタミン放出を引き起こした。図8Bに示されるように、変異rMal d 1(2781)及び(2762)のヒスタミン放出曲線は、rBet v 1.2801に比し、より高い抗原濃度にそれぞれ2倍及び20倍シフトしている。

【0072】

二次変異

図9(右側)では、足場タンパク質rMal d 1(2620)及び変異rMal d 1(2760)が、個々の患者においてrBet v 1.2801へのヒト血清IgEの結合を0%~30%阻害している。図9(左側)に示されるように、すべてではないが何人かのカンパ花粉アレルギー患者の好塩基球において、rMal d 1(2620)はrBet v 1.2801に比べてヒスタミン放出を引き起こす能力がかなり減少していることが示された。図9(左側)に示されるように、足場タンパク質(rMal d 1(2760))上のBet v 1特異的表面構造への3種の二次変異、Asn28Thr、Lys32Gln及びGlu45Serの導入は、2人のカンパ花粉アレルギー患者の好塩基球(o、p)においてヒスタミンを誘導する能力をさらに減じた。ここで、患者(o)では3種の二次変異の導入は測定した濃度範囲内でヒスタミン放出を消滅させ、患者(p)内ではヒスタミン放出を引き起こすためにはrBet v 1.2801に比べて100倍高濃度のrMal d 1(2760)を必要とした。

20

30

【0073】

一次及び二次変異

図10A及びBには、足場タンパク質と、一次及び二次変異を導入することで足場タンパク質から誘導される足場変異体を示す。例としてrMal d 1(2620)を用いる。これらタンパク質の前面と背面を示す。足場(Mal d 1)特異的表面構造を白色で示す。Bet v 1とMal d 1の共通表面構造を灰色で示す。二次変異を黒色で示す。上の前面図は、高アフィニティーでBet v 1特異的ヒト血清IgEと結合する足場タンパク質上の2つの大きい表面領域を示す。下の前面図は、IgE結合アフィニティーを減らすために足場タンパク質に導入した4つの二次変異を示す。上の背面図は、ほとんど共通表面構造のない足場タンパク質上の表面領域を示す。下の背面図は、一次変異を導入して、天然Bet v 1イソアレルゲンと交差反応性の遮断抗体に向けられ得る共通表面構造の密度を増やすことの効果を示す。図10B。上下の前面図：3個の二次変異の導入によって生じる推定的Bet v 1特異的抗体の減少した適合性が示される。上の背面図は、Bet v 1に対する不十分な抗体交差反応性を有する遮断抗体(IgG)の生成を示す。下の背面図は、Bet v 1に対する高い交差反応性を有する遮断抗体(IgG)生成を示す。

40

【0074】

組換え野生型(wt)及び変異Mal d 1アレルゲンに対するT細胞応答

アレルゲンのアミノ酸配列の変化は、T細胞エピトープの除去及び/又は付加を生じさ

50

せる可能性がある。このような場合、改変されたアレルゲンは野生型アレルゲンに対する応答に比べてT細胞応答の低下を誘導することがあり、及び/又はそれらは新しいエピトープを認識するT細胞を活性化するだろう。理論的に、既存のアレルゲン特異的T細胞集団を改変し、遮断性非-IgE抗体の生産を支持するために、Bet v 1低アレルギー性Mal d 1変異体のT細胞刺激特性を維持することが重要である。そこで、rMal d 1アレルゲンのT細胞活性化特性を調べた。

2種の細胞型を分析した。どちらの場合も、細胞はカンバアレルギー個体に由来する。

1) ポリクロナールT細胞を含有する血液細胞(PBL)を新たに単離した。これらのT細胞は、Bet v 1特異的エピトープ及びMal d 1特異的エピトープのみならず配列内の変化から生じる新しいエピトープにも応答する能力を有する。血液細胞を7日間アレルゲンの存在下で培養後、分析に供した。3人の個別の提供者由来のPBLを試験した。 10

2) nBet v 1による刺激を繰り返してアレルゲン特異的細胞株を生成した。これらの細胞は培養維持することができ、長期間にわたって試験することができる。T細胞を3日間アレルゲンと共に培養する。抗原提示細胞(APC)として自己PBL細胞を加える。これらのT細胞は、主に元のBet v 1特異的エピトープに応答し、アレルギー患者の既存Bet v 1特異的T細胞集団におけるT細胞活性化レベルを示す。4種のBet v 1特異的T細胞株を試験した。

【0075】

以下の2つのアッセイを用いてrMal d 1アレルゲンに対するT細胞応答を分析した。

1) T細胞増幅の刺激：18時間の培養の間のDNA中への放射標識チミジンの取込みを測定する。 20

2) サイトカイン生産の刺激：6種の異なるTh1/Th2サイトカインを測定するCBA、FACSに基づくアッセイを用いて細胞上清中のサイトカインを測定する。

図11は、3人の個別提供者由来のPBL刺激アッセイの結果を示したものであり、そのまとめを図12に示す。これらの実験では、wt Mal d 1アレルゲン(2620)とMal d 1三重変異体(2760)はいずれのT細胞活性も誘導しない。変異体2762は1人の患者において、2781は行った3種のPBLアッセイのうち3種において、rBet v 1(2801)により誘導される活性化に匹敵するT細胞増殖を誘導した。このことは、これらの分子内に導入されたアミノ酸置換によってT細胞エピトープが修復されたかもしれないことを示している。あるいは、匹敵するT細胞活性化につながる新しいエピトープが導入されたかもしれない。予想されたように、すべてのT細胞株がnBet v 1に応答する。 30

【0076】

図13は、試験した4つのBet v 1特異的T細胞株の1つのT細胞増殖応答を示す。このT細胞株は、wt Mal d 1分子(2620)に対して明かな交差反応性を示すが、変異体2760は認識しない。このことは、この分子内に導入した変異が、このT細胞株によって認識されるBet v 1/Mal d 1交差反応性T細胞エピトープを破壊することを示唆している。対照的に、変異体2762及び2781は両方とも増殖を誘導する。

PBL培養におけるサイトカイン生産(図14)及び交差反応性T細胞株(図15)におけるサイトカイン生産により、増殖アッセイで示されたT細胞活性化が確認される。Bet v 1. 2801及びMal d 1アレルゲンに対する応答を比較した場合、サイトカイン生産プロファイルの有意な変化は観察されなかった。これはBet v 1とMal d 1との差異又は変異によって導入された変化が、Th1活性化の増強または選択的なTh1活性化をもたらさないことを示唆している。阻害性サイトカインIL-10の誘導は観察されなかった。 40

結論として、Mal d 1変異体2762、特に2781は、wt(野生型) Mal d 1アレルゲン(2620)に比べて、Bet v 1特異的T細胞株においてもアレルギー患者の新たに単離した血液細胞培養物においても、より高いT細胞活性化を誘導するようである。

【0077】

(実施例2)

Bet v 1相同性足場タンパク質(表面領域I)の改変

この実施例は、Dau c 1(アクセッション番号T14325)の修飾を基礎とする。以下にお 50

けるアミノ酸残基位置番号付けは、図16に示されたT14325を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入に基づく：K32X、E42X、E59X、R69X、E95X、K122X（Xはいずれの型のアミノ酸残基でもよいが、好ましくはBet v 1の既知イソ型の対応する位置に存在しないアミノ酸残基である）。この実施例は、さらに、以下の一次変異の1以上の導入を含む。これらの変異では、残基がBet v 1のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に相同な、さらに好ましくは同一である残基に置換される。相同なアミノ酸残基は、E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：S12V又はS12L又はS12I又はS12M又、S14P、E16A、P105A、A107P、A148S又はA148T、I151L又はI151V又はI151M、N153H又はN153K又はN153R。さらに、以下の1以上のアミノ酸残基によるアミノ酸の伸長が示唆される：+154S又は+154T、+155D又は+155E、+156A、+157Y又は+157F、+158N又は+158Q。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列の概略図を図16に示す。

10

【0078】

Bet v 1相同足場タンパク質（表面領域II）の改変

この実施例は、Dau c 1（アクセッション番号T14325）の改変を基礎とする。以下におけるアミノ酸残基位置番号付けは、図17に示されたT14325を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入を基礎とする：E8X、T10X、D25X、K32X、D46X、E59X、E95X、D108X、K122X（Xはいずれの型のアミノ酸残基でもよいが、好ましくはBet v 1の既知イソ型の対応する位置に存在しないアミノ酸残基である）。この実施例は、以下の一次変異の1以上の導入を含む。これらの変異では、残基がBet v 1のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に相同である、さらに好ましくは同一である残基に置換される。相同なアミノ酸残基は、E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：K39S又はK39T、K44E又はK44D、V52I又はV52M又はV52L、I54K又はI54R又はI54H、T64K又はT64R又はT64H、T65Y又はT65F又はT65W、T67K又はT67R又はT67H、D86E、L91G、G92D又はG92E。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列の概略図を図17に示す。

20

【0079】

Der p 2相同性足場タンパク質（表面領域I）の改変

この例は、Lep d 2（アクセッション番号S66499）の改変を基礎とする。以下におけるアミノ酸残基位置番号付けは、図18に示されるS66499を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入を基礎とする：K6X、S22X、R30X、K76X、K81X、V114X（Xはいずれの型のアミノ酸残基でもよいが、好ましくはnDer p 2又はnDer f 2又はEur m 2の既知イソ型の対応する位置に存在しないアミノ酸残基である）。この実施例は、さらに、nDer p 2又はnDer f 2又はnEur m 2のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に相同である、好ましくは同一である以下の一次変異の1以上の導入を含む。相同なアミノ酸残基は、E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：D17L又はD17I又はD17V又はD17M、S19P、Q32K又はQ32R又はQ32H、K33P、T35Q又はT35N、N88K又はN88R又はN88H、T92N又はT92Q、A95K又はA95R又はA95H。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列を図18に示す。変異体の3-Dモデルを図19A、B、C及びDと、図20A、B、C及びDに示す。

30

40

【0080】

Der p 2相同性足場タンパク質（表面領域II）の改変

この例は、Lep d 2（アクセッション番号S66499）の改変を基礎とする。以下におけるアミノ酸残基位置番号付けはS66499を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入を基礎とする：K6X、S22X、H29X、R30X、K76X、K81X（Xはいずれの型のアミノ酸残基でもよいが、好ましくはnDer p 2又はnDer f 2又はEur m 2の既知イソ型の対応する位置に存在しないアミノ酸残基である）。この実施例は、さらに、nDer p 2又はnDer f 2又はnEur m 2のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に相同である、好ましくは同一性である以下の一次変異の1以上の導入を含む。相同なアミノ酸残基は、

50

E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：D45N又はD45Q、N47K又はN47R又はN47H、K48T又はK48S、T50K又はT50R又はT50H、K52E又はK52D、L54K又はL54R又はL54H、E107K、E107R又はE107H、H112D又はH112E、T119I又はT119L又はT119V又はT119M。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列を図18に示す(既述)。

【0081】

(実施例3)

Bet v 1相同性足場タンパク質の修飾

この実施例は、Mal d 1(2620)(アクセッション番号AJ488060)の改変を基礎とする。以下におけるアミノ酸残基位置番号付けは、図21に示されたAJ488060を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入を基礎とする：E8X、N28X、K32X、E96X及びアミノ酸挿入+X159(Xはいずれかのアミノ酸残基である)。本発明の好ましい一実施形態では、導入される1以上のアミノ酸残基(X)は、それぞれ個々に対応する位置についてBet v 1特異的残基に相同なアミノ酸残基でよい。相同なアミノ酸残基残基は、E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：E8D、N28Q、K32R又はK32H、E96D。この実施例は、さらに、以下の一次変異の1以上の導入を含む。導入される変異はBet v 1のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に同一である又は相同な残基である。以下の変異が示唆される：E12V又はE12I又はE12M又はE12L、H40S又はH40T、E76H又はE76R又はE76K、E129A、P154S又はP154T。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列を図21に示す。

【0082】

Der p 2相同性足場タンパク質の改変

この実施例は、Gly d 2(アクセッション番号AJ272216)の改変を基礎とする。以下におけるアミノ酸残基位置番号付けは、図22に示されたAJ272216を参照したものである。この実施例は、以下の二次変異の1以上の導入を基礎とする：K6X、R30X、F74X、K81X、K88X、T90X、V114X(Xはいずれかのアミノ酸残基である)。

本発明の好ましい一実施形態では、導入される1個以上のアミノ酸残基(X)は、それぞれ個々に対応する位置についてDer p 2又はDer f 2又はEur m 2特異的残基に相同なアミノ酸残基でよい。相同なアミノ酸残基残基は、E=D、V=L=I=M、S=T、Y=F=W、K=R=H、N=Q、ここで、“=”は2個以上のアミノ酸残基が相同であることを示す。以下の変異が示唆される：K6R又はK6H、R30K又はR30H、F74Y又はF74W、K81R又はK81H、K88R又はK88H、T91S、V114L又はV114I又はV114M。この実施例は、さらに、Der p 2又はDer f 2又はEur m 2のいずれかの既知イソ型内の対応するアミノ酸残基に同一又は相同性である以下の一次変異の1以上の導入を含む。

以下の変異が示唆される：K2Q又はK2N、K4D又はK4E、K10N又はK10Q、T14K又はT14R、S22H又はS22R又はS22K、K39V又はK39L又はK39I又はK39M、D45N又はD45Q、T60L又はT60V又はT60I又はT60M、Q63D又はQ63E、K80V又はK80L又はK80I又はK80M、H112D又はH112E、R122I又はR112V又はR112L又はR122M。変異したアミノ酸残基を有するタンパク質配列を図22に示す。変異体の3-Dモデルを図23A、B、C及びDと、図24A、B、C及びDに示す。

【0083】

(実施例4)

CD分光法、または2つのタンパク質の三次元構造が有意な相同性を共有するかを決定するための実験的アプローチによる、相同的に折りたたまれたタンパク質の相同調製物における二次構造要素の比較：

異なるタンパク質又は相同タンパク質について決定したCDスペクトルの視覚的比較は、この分野の専門家によって行うことができる。スペクトルが合理的に重ねられるように見える場合、これらのタンパク質はおそらく同一構造分類に属し、デコンボリューション(逆重畳)処理によりこの分類を確認することができる。

260nmから少なくとも184nmの波長範囲で記録したCDスペクトルを以下のプログラムCDNN

でデコンボリューションした : www.bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn

デコンボリューションは、以下のように行った :

CDデータ (コンマ区切りtxtファイルとして (nm;mDeg)) をソフトウェアに取り込み、適切なパラメーターを与え (Mw、濃度 (mg/ml)、アミノ酸の数)、33のトレーニングベーススペクトルセットを用いてデコンボリューションした。

全二次構造要素の合計が100% ± 1% (185 ~ 260nm)の値を与えるようにタンパク質の濃度を調整した。

二次構造要素を3つの値、ヘリックス、“シート” = 逆-平行 + 平行及びターン + コイル = -ターン + ランダムコイルに変換した。そのデコンボリューションセット (ヘリックス、シート、ターン + コイル) が、参照タンパク質について決定されるデコンボリューションセットの値 ± 20%の範囲内であれば、それらタンパク質は構造的に類似であると考えた。

図25により、Mal d 1(2762)、Mal d 1(2781)及びBet v 1.2801のデコンボリューションセットは基準タンパク質、rMal d 1(2620)について決定される許容限界内 (± 15%) なので、これらタンパク質は構造 (二次構造) 的に類似と考えることができる。

【 0 0 8 4 】

(実施例5)

Bet v 1及び変異Mal d 1の抗体反応性 :

nBet v 1に対して産生されたモノクローナルマウスIgG抗体 (BV16) と、2種のアレルゲンrBet v 1.2801及び変異rMal d 1(2781)との相互作用の動力的パラメーターをそれぞれ表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定した。

組換えタンパク質は、実施例1で述べたように調製した。供給業者の推奨に従ってピアコア (Biacore) 実験を設定した (ピアコア2000装置ハンドブック (Biacore(登録商標)2000 Instrument Handbook), 2001年1月; ピアコア3000の使い方 (Getting started Biacore(登録商標)3000), 1998年10月)。簡単に言えば、モノクローナル抗体BV16 (ALK, Hørsholm, Denmark) (HBS-EP biacore 緩衝液中1 ~ 10 µg/ml) を、BiacoreセンサーチップCM5上の4つのフローチャンネル中に300秒間30 µL/分の流速で注入 (充填段階) 後、HBS-EP緩衝液を150秒間流した (30 µL/分) (平衡段階)。抗原、すなわちrBet v 1.2801、rMal d 1(2620)又は変異rMal d 1(2781)を180秒間注入 (会合段階) 後、HBS-EP緩衝液を1000秒までの間流し (解離段階)、30 µL/分の流速で30秒間、10mMのグリシン溶液、pH 1.8のパルスでフローチャンネルを再生した。k1(M⁻¹s⁻¹)、k₋₁(s⁻¹)及びK_d(M)値を評価するために使用するデータは、5種の異なる抗原濃度で行った実験から得た (1 ~ 150 µg/mL)。

【 0 0 8 5 】

Biacore実験の結果を図26にグラフで示す。下表1に動力的パラメーターを示す。

表 1

複合体	k ₁ ± S. E. M ⁻¹ s ⁻¹	k ₋₁ ± S. E. s ⁻¹	~K _d ± S. E. M
BV16 rBet v 1.2801	(1.0 ± 0.1) * 10 ⁵	(2.5 ± 1.4) * 10 ⁻⁵	=(2.4 ± 1.4) * 10 ⁻¹⁰
BV16 rMal d 1(2781)	(1.2 ± 0.1) * 10 ⁵	(3.2 ± 0.3) * 10 ⁻⁵	=(2.7 ± 0.4) * 10 ⁻¹⁰

表1 : モノクローナル抗体BV16と2種のアレルゲン、rBet v 1.2801と変異rMal d 1(2781)との相互作用の動力的パラメーター。動力的パラメーターは、種々の抗原濃度、および1000秒までの種々の時間における数回の測定に基づいて計算した。

【 0 0 8 6 】

2種の抗体 / 抗原複合体について得られたK_d値は事実上同一だった。これは、これらのタンパク質が非常に類似したβ-炭素骨格鎖フォールディング構造を有することを強く示

10

20

30

40

50

している。さらに、BV16抗体によって認識されるエピトープは、rBet v 1.2801の結晶学的構造 (pdbエントリー1bv1) 中に存在する逆-平行 β -シート内の鎖のいくつかに位置するアミノ酸残基を含む。結論として、本質的に完全かつ機能的なエピトープがrBet v 1からrMal d 1に移植されているだけでなく、Kd値が事実上同一であるということは、完全なBV16構造エピトープがMal d 1の表面上に導入されていることを示唆している。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】部位特異的変異導入による変異。破線はDNA配列を表す。線の上の括弧内の数(1)、(3)、(5)、(7)、(9)、(11)はセンスオリゴヌクレオチドプライマーを表す。線の下に括弧内の数(2)、(4)、(6)、(8)、(10)、(12)はアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーを表す。記法X(位置(pos))Yは種々の位置での変異を表す。(1)はタンパク質N末端に適合するセンスオリゴヌクレオチドプライマーを表す。(12)はタンパク質C末端に適合するアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーを表す。

10

【図2】円偏光二色性(CD)分光法。rMal d 1(2620)()、rBet v 1.2801()、変異rMal d 1(2762)()及び変異rMal d 1(2781)()のCDスペクトル。

【図3A】カンパアレルギー患者から集めたIgE血清(血清プール0202/148)に対するビオチン化rBet v 1.2801の結合のrBet v 1.2801()、rMal d 1(2620)()又は3つの二次変異を有する変異rMal d 1(2760)[]による阻害。

【図3B】カンパアレルギー患者からプールしたIgE血清(血清プール11-97)に対するビオチン化rBet v 1.2801の結合のrBet v 1.2801()、rMal d 1(2620)()又は3つの二次変異を有する変異rMal d 1(2760)[]による阻害。

20

【図4】Mal d 1(2620)の熱変性。15 ~ 90 で得た円偏光二色性(CD)スペクトルの重ね合わせを示す。天然の折りたたまれた(15) rMal d 1(2620)は、214~216nmと192~194nmでそれぞれ負と正の振幅を有する。熱変性した(90) rMal d 1(2620)タンパク質調製物は、204nmで負の振幅を有し、天然の折りたたまれたアレルゲンに比べて214~216nmと192~194nmでそれぞれ相対的に少ない負と正の値を有する。90 に加熱したタンパク質調製物は15 ()でさらに記録をとるため冷却した。15 では、天然の折りたたまれたタンパク質調製物のスペクトルと重なっている。さらに、70 で記録したrMal d 1(2620)のCD-スペクトルは、15 で記録したスペクトルと比べてほんのわずかに変化している。

【図5A】rMal d 1(2620)の三次元構造モデル。分子表面を示す。灰色表面領域はMal d 1上のBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。前面図。1つの大きいカンパ-リンゴ抗体交差反応表面領域を黒枠内に示す。

30

【図5B】rMal d 1(2620)の三次元構造モデル。分子表面を示す。灰色表面領域はMal d 1上のBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。背面図。

【図5C】rMal d 1(2760)の三次元構造モデル。分子表面を示す。灰色表面領域はMal d 1上のBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。前面図。3つの二次変異N28T、K32Q、E45Sを黒枠内に示す。2つの二次変異N28T、K32Qは大きいカンパ-リンゴ抗体交差反応表面内の形態(トポグラフィー)とアミノ酸電荷分布の両方に影響する。

40

【図6A】rMal d 1(2620)の三次元構造モデル。分子表面(前面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。

【図6B】rMal d 1(2781)の三次元構造モデル。分子表面(前面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。rMal d 1(2781)に導入された6つの一次変異を黒色で示す。

【図6C】rBet v 1.2801の三次元構造モデル。分子表面(前面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。Bet v 1.2801中、同一アミノ酸残基を黒色で示す。図A、B及びCを比

50

較すると、rMal d 1(2781)の6つの一次変異がrMal d 1上の一表面上にBet v 1特異性表面構造を導入することが分かる。

【図7A】rMal d 1(2620)の三次元構造モデル。分子表面(背面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。

【図7B】rMal d 1(2762)の三次元構造モデル。分子表面(背面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。灰色表面はBet v 1.2801特異的なアミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。rMal d 1(2762)に導入された8つの一次変異を黒色で示す。

【図7C】rBet v 1.2801の三次元構造モデル。分子表面(背面図)を示す。灰色表面領域はBet v 1.2801特異的アミノ酸残基を示す。白色表面領域はMal d 1(2620)特異的アミノ酸残基を示す。Bet v 1.2801中、同一アミノ酸残基を黒色で示す。図A、B及びCを比較すると、rMal d 1(2762)の8つの一次変異がrMal d 1上の一表面上にBet v 1特異性表面構造を導入することが分かる。

【図8A】カンパアレギー患者から集めたIgE血清に対するビオチン化rBet v 1.2801の結合の、rBet v 1.2801()、rMal d 1(2620)()又はそれぞれ8及び6つの一次変異を有する変異rMal d 1(2762)[]若しくは(2781)[]による阻害。

【図8B】rBet v 1.2802と比較したrMal d 1と変異rMal d 1のヒスタミン放出。rBet v 1.2801()、rMal d 1(2620)()又はそれぞれ8及び6つの一次変異を有する変異rMal d 1(2762)[]若しくは(2781)[]。

【図9】5人の個別患者由来の血清によるIgE-阻害実験(右)とヒスタミン放出実験(左)の結果を示すグラフである。右側:rMal d 1(2620)()及び変異rMal d 1(2760)()について、ヒト血清IgEのrBet v 1.2801()に対する結合の阻害曲線。左側:rBet v 1.2801と比較したrMal d 1と変異rMal d 1のヒスタミン放出。

【図10A】足場タンパク質と一次及び二次変異を導入して足場タンパク質から誘導した足場変異体の概略図。

【図10B】足場タンパク質と一次及び二次変異を導入して足場タンパク質から誘導した足場変異体の概略図。

【図11】3人の個別患者(MCDS12(A)、GUA(B)及びAHB21(C))のrMal d 1アレルギーに対するT細胞増殖反応。

【図12】図11の3人の患者(A、B、C)のT細胞刺激指標。

【図13】Bet v 1特異性T細胞株のT細胞増殖応答。

【図14】PBL培養物中のMal d 1アレルギーのサイトカイン応答。

【図15】Bet v 1特異性T細胞株におけるMal d 1アレルギーのサイトカイン応答。

【図16】Bet v 1特異性表面領域Iの移植。Dau c 1及びBet v 1のアミノ酸アラインメント。配列の上の位置番号はDau c 1(T14325)を参照する。配列の下の位置番号はBet v 1(z80104)を参照する。黒色背景はポリペプチド配列中で同一のアミノ酸残基のある位置を示す。灰色背景はポリペプチド配列中で相同なアミノ酸残基のある位置を示す。実施例1Aで二次変異導入の標的にされるアミノ酸の位置を黒色背景上の三重線で表し、一次変異導入のためのアミノ酸位置を黒色矢印で表す。

【図17】Bet v 1特異性表面領域IIの移植。Dau c 1及びBet v 1のアミノ酸アラインメント。配列の上の位置番号はDau c 1(T14325)を表す。配列の下の位置番号はBet v 1(z80104)を表す。黒色背景はポリペプチド配列中で同一のアミノ酸残基を有する位置を示す。灰色背景はポリペプチド配列中で相同なアミノ酸残基を有する位置を示す。実施例1Bで二次変異導入の標的にされるアミノ酸の位置を黒色背景上の三重線で表し、一次変異導入のアミノ酸位置を黒色矢印で表す。

【図18】Lep d 2とDer p 2のアミノ酸アラインメント。配列の上の位置番号はLep d 2(S66499)を表す。配列の下の位置番号はDer p 2(P49278)を表す。黒色背景はポリペプチド配列中の同一のアミノ酸残基の位置を示す。灰色背景はポリペプチド配列中の相同なアミノ酸残基の位置を示す。実施例2Aで一次変異導入の標的にされるアミノ酸の位置を

10

20

30

40

50

黒色背景上の白色矢印で表す。実施例2Bで一次変異導入の標的にされるアミノ酸の位置を白色背景上の黒色矢印で表す。実施例2A又は2Bで二次変異の導入のために提案されるアミノ酸位置を黒色背景上の三重線で表す。

【図19A】実施例2Aで二次変異の導入に可能な標的位置として選択されるLep d 2上のアミノ酸残基の位置：K6、S22、R30、K76、K81、V114の図。<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>で鑄型としてpdbエントリー1ktjを用いてモデリングしたLep d 2（アクセス番号S66499）の分子表面を示す。前面。灰色は、対応するアミノ酸位置におけるDer p 2特異的アミノ酸残基と同一又は相同なアミノ酸残基上の -炭素骨格鎖原子と側鎖原子を示す。白色は、Lep d 2（アクセス番号S66499）に特異的なアミノ酸残基を示す。黒色は、実施例2Aで二次変異の導入のための可能な標的位置として選択されるLep d 2上のアミノ酸残基を示す。 10

【図19B】図19Aの回転1（水平軸を中心にした面から90°回転した前面）。

【図19C】図19Aの回転2（水平軸を中心にした面から180°回転した前面）。

【図19D】図19Aの回転3（水平軸を中心にした面から270°回転した前面）。

【図20A】実施例2Aで一次変異の導入のための可能な標的位置として選択されるLep d 2上のアミノ酸残基の位置：D17、S19、Q32、K33、T35、N88、T92、A95の図。<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>で鑄型としてpdbエントリー1ktjを用いてモデリングしたLep d 2（アクセス番号S66499）の分子表面を示す。前面。灰色は、Der p 2（pdbエントリー1ktj）上の対応するアミノ酸位置におけるDer p 2特異的アミノ酸残基と同一又は相同なアミノ酸残基上の -炭素骨格鎖原子と側鎖原子を示す。白色は、Lep d 2（アクセス番号S66499）に特異的なアミノ酸残基を示す。黒色は、実施例2Aで一次変異の導入のために可能な標的位置として選択されるLep d 2上のアミノ酸残基を示す。 20

【図20B】図20Aの回転1（水平軸を中心にした面から90°回転した前面）。

【図20C】図20Aの回転2（水平軸を中心にした面から180°回転した前面）。

【図20D】図20Aの回転3（水平軸を中心にした面から270°回転した前面）。

【図21】Mal d 1(2620)とBet v 1.2801のアミノ酸アラインメント。配列の上の位置番号はMal d 1（アクセス番号AJ488060）を参照する。配列の下の位置番号はBet v 1（アクセス番号Z80104）を参照する。黒色背景はポリペプチド配列中の同一のアミノ酸残基の位置を示す。灰色背景はポリペプチド配列中の相同なアミノ酸残基残基の位置を示す。実施例3で二次変異導入の標的にされるアミノ酸位置を黒色背景上の三重線で表し、一次変異導入のアミノ酸位置を黒色矢印で表す。 30

【図22】Gly d 2とDer p 2のアミノ酸アラインメント。配列の上の位置番号はGly d 2（AJ272216）を参照する。配列の下の位置番号はDer p 2（P49278）を参照する。黒色背景はポリペプチド配列中の同一のアミノ酸残基の位置を示す。灰色背景はポリペプチド配列中の相同なアミノ酸残基残基の位置を示す。実施例4で二次変異の導入の標的にされるアミノ酸位置を黒色背景上の三重線で表し、一次変異導入のアミノ酸位置は黒色矢印を表す。

【図23A】実施例4で二次変異の導入のための可能な標的位置として選択されるGly d 2上のアミノ酸残基の位置の図。<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>で鑄型としてpdbエントリー1ktjを用いてモデリングしたGly d 2（アクセス番号AJ272216）の分子表面を示す。前面。灰色は、Der p 2（pdbエントリー1ktj）上の対応するアミノ酸位置におけるDer p 2特異的アミノ酸残基と同一又は相同なアミノ酸残基上の -炭素骨格鎖原子と側鎖原子を示す。白色は、Gly d 2（アクセス番号AJ272216）に特異的なアミノ酸残基を示す。黒色は、実施例4で二次変異の導入のための可能な標的位置として選択されるGly d 2上のアミノ酸残基を示す。 40

【図23B】図23Aの回転1（水平軸を中心にした面から90°回転した前面）。

【図23C】図23Aの回転2（水平軸を中心にした面から180°回転した前面）。

【図23D】図23Aの回転3（水平軸を中心にした面から270°回転した前面）。

【図24A】実施例4で一次変異の導入のための可能な標的位置として選択されるGly d 2上のアミノ酸残基の位置の図。<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>で鑄 50

型としてpdbエントリー1ktjを用いてモデリングしたGly d 2の分子表面を示す。前面。灰色は、Der p 2 (pdbエントリー1ktj) 上の対応するアミノ酸位置におけるDer p 2特異的アミノ酸残基と同一又は相同なアミノ酸残基上の炭素骨格鎖原子と側鎖原子を示す。白色は、Gly d 2 (アクセッション番号AJ272216) に特異的なアミノ酸残基を示す。黒色は、実施例4で一次変異の導入のための可能な標的として選択されるGly d 2上のアミノ酸残基を示す。

【図24B】図24Aの回転1 (水平軸を中心にした面から90°回転した前面)。

【図24C】図24Aの回転2 (水平軸を中心にした面から180°回転した前面)。

【図24D】図24Aの回転3 (水平軸を中心にした面から270°回転した前面)。

【図25】Mal d 1(2620)、Mal d 1(2762)、Mal d 1(2781)及びBet v 1.2801のCDスペクトルのデコンポリューションから得られる二次構造要素中の組成。Mal d 1(2762)、Mal d 1(2781)及びBet v 1.2801は、基準タンパク質、Mal d 1(2620)について決定した許容限界範囲内 (±15%) なので、これら4つのタンパク質は二次構造について構造的に同様であるとみなすことができる。

【図26】Biacore 実験。モノクローナル抗体BV16のrBet v 1.2801、非変異Mal d 1(2620)及び変異rMal d 1(2781)への結合。非変異rMal d 1(1620)では結合が観察されなかった。BV16はrBet v 1.2801と変異rMal d 1(2781)のどちらにも結合した。

【図1】

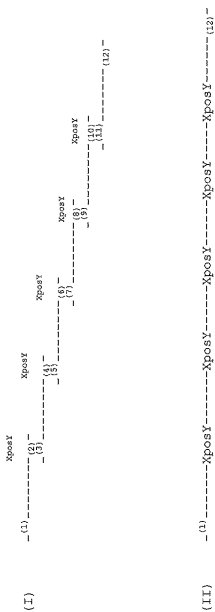


Figure 1

【図2】

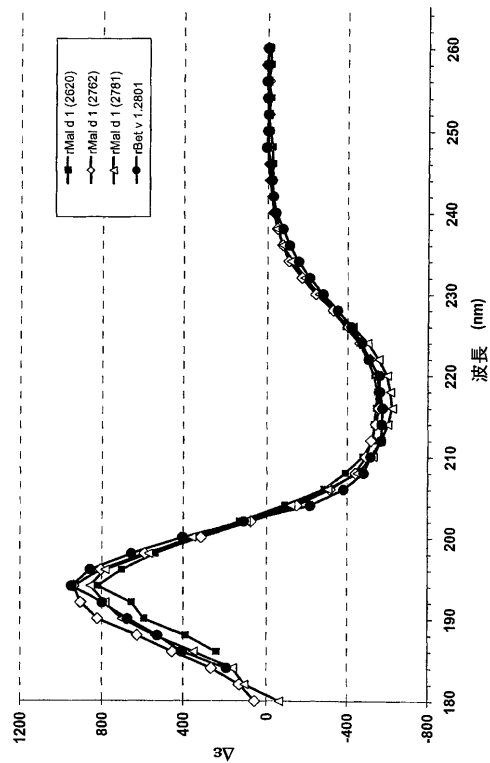


Figure 2

【 図 3 A 】

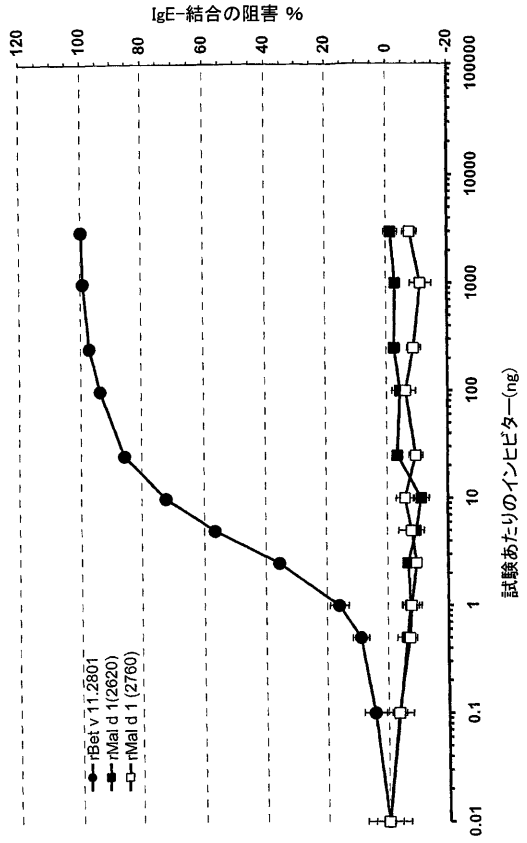


Figure 3A

【 図 3 B 】

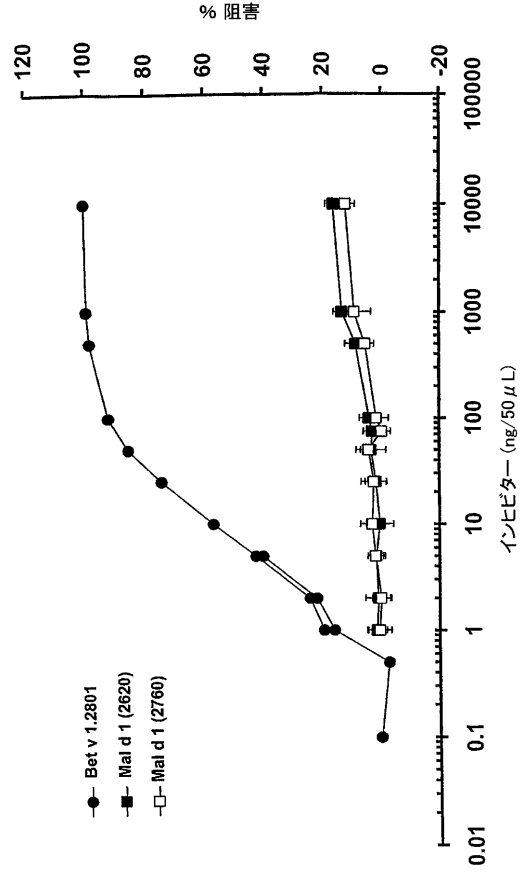


Figure 3B

【 図 4 】

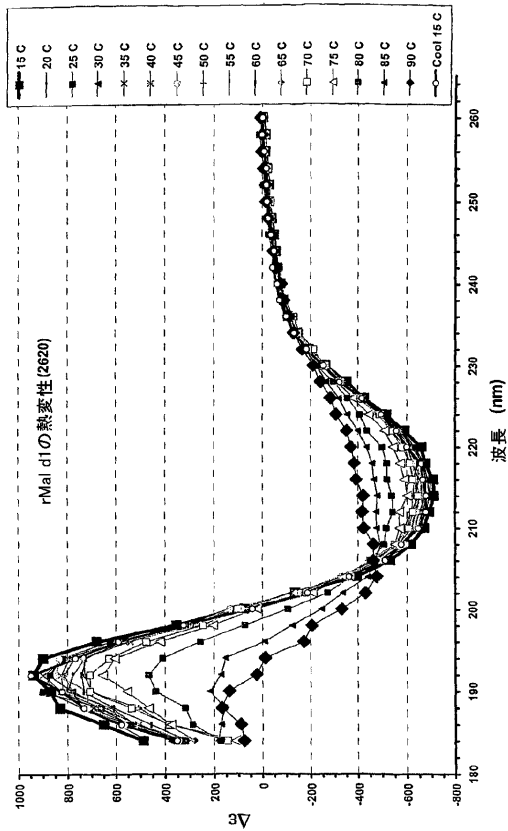


Figure 4

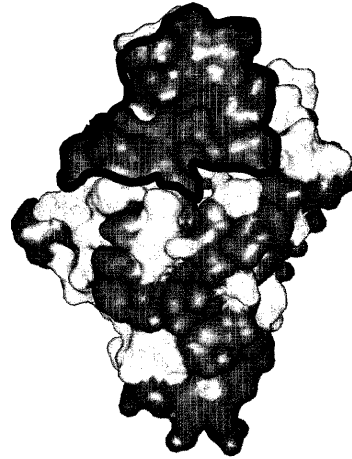


Figure 5A

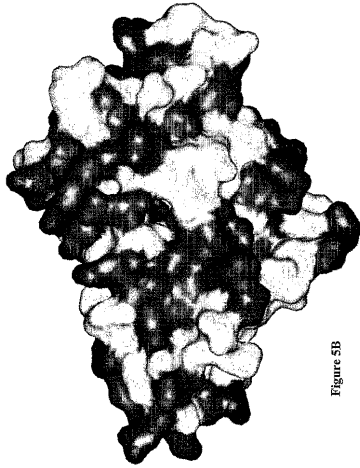


Figure 5B

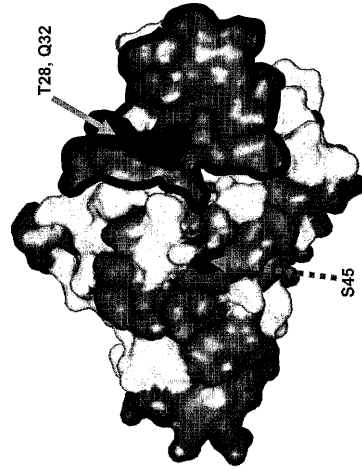


Figure 5C

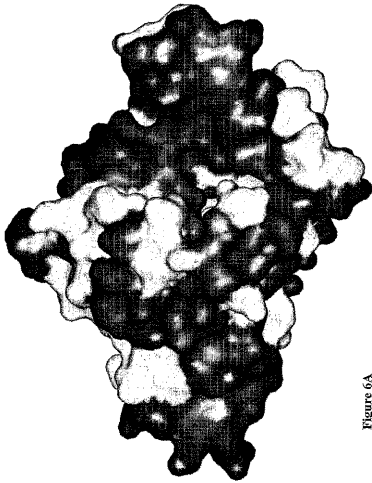


Figure 6A

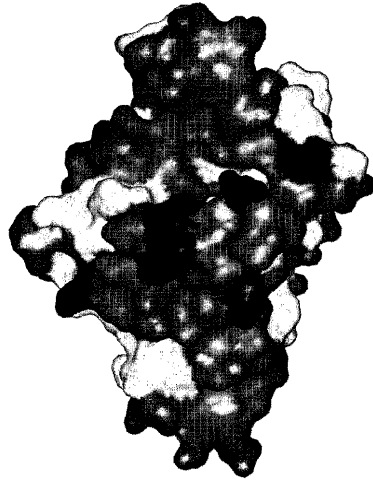
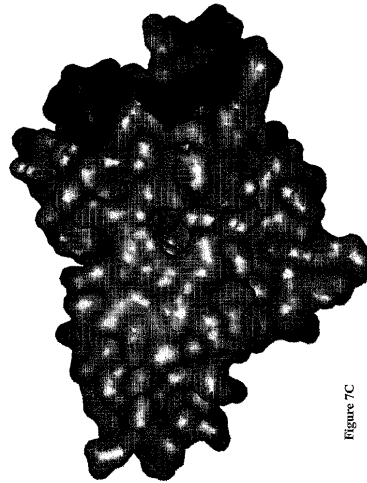
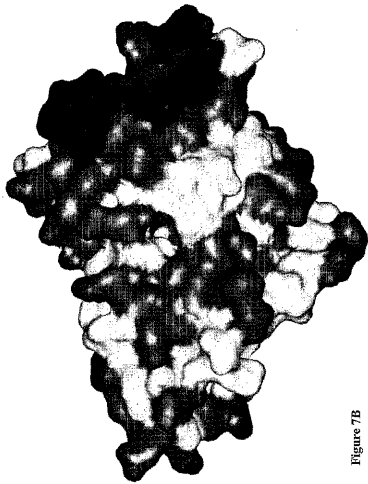
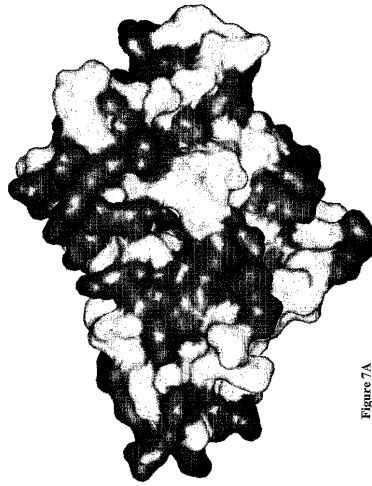
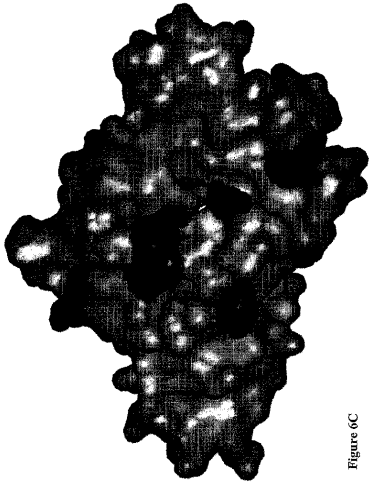


Figure 6B



【 図 8 A 】

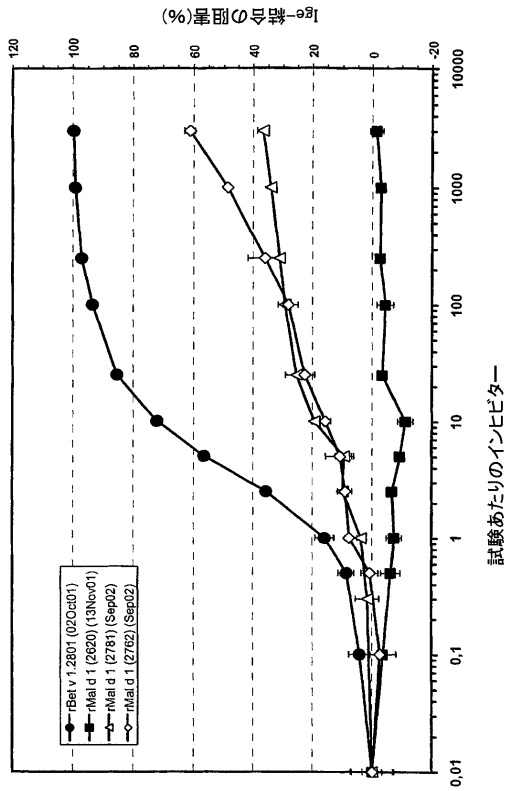


Figure 8A

【 図 8 B 】

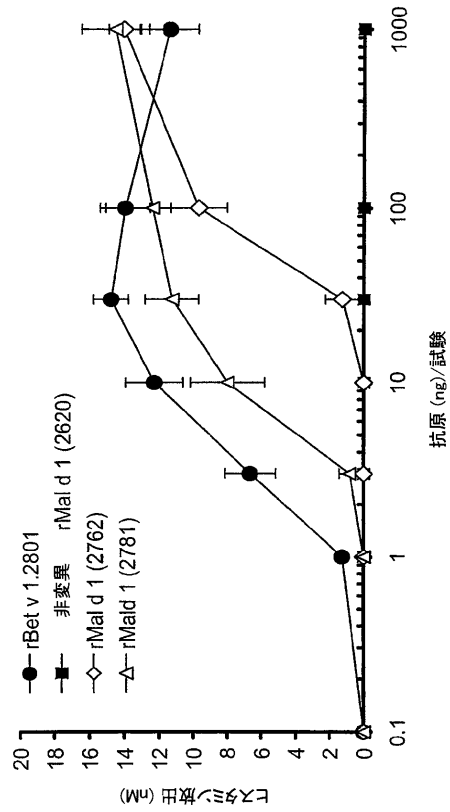


Figure 8B

【 図 9 】

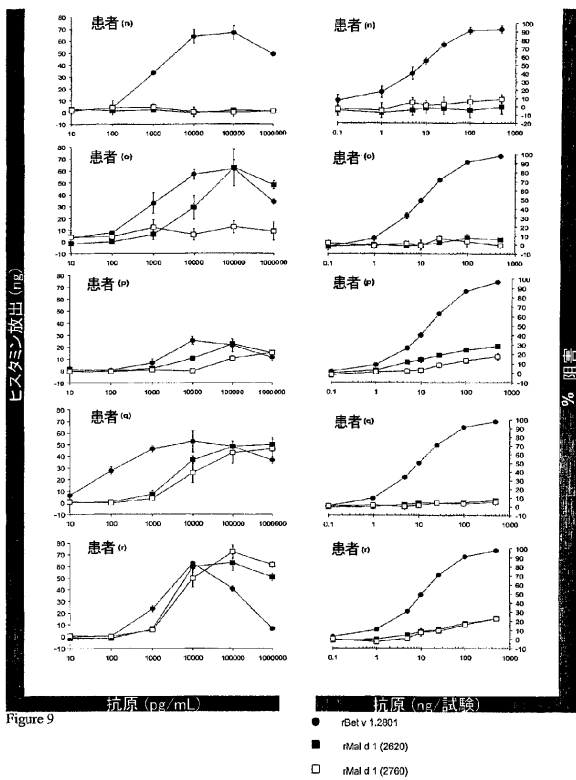


Figure 9

【 図 10 A 】

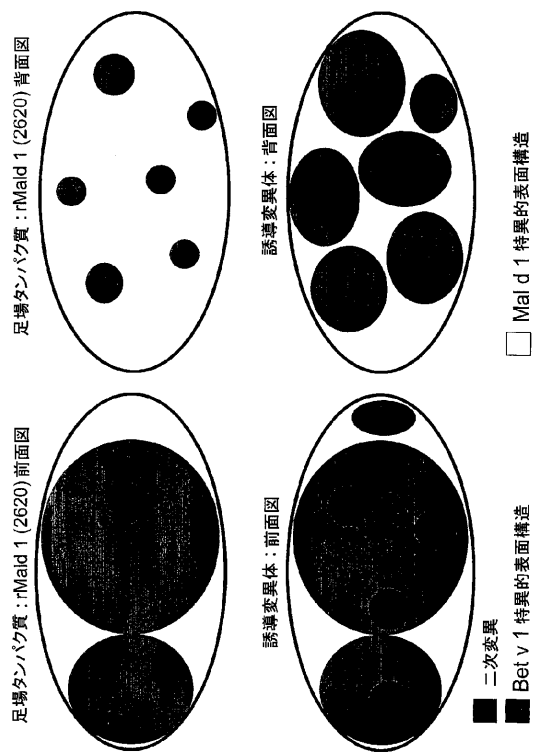


Figure 10A

【 図 1 0 B 】

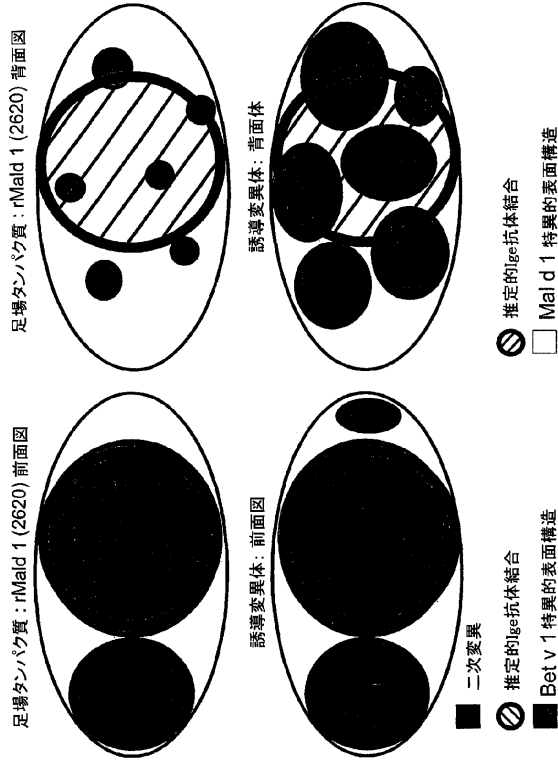


Figure 10B

【 図 1 1 】

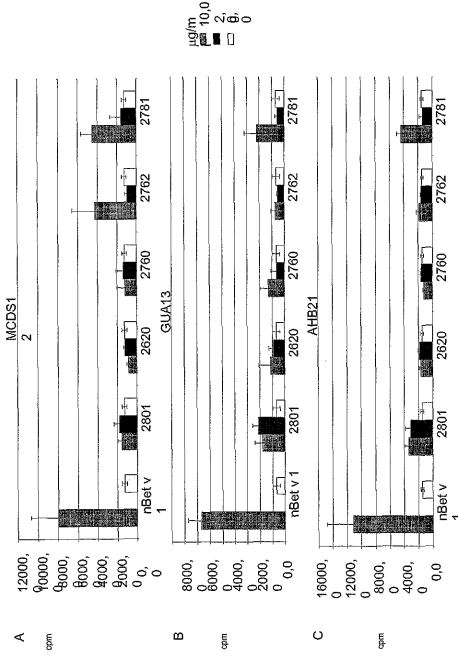


Figure 11

【 図 1 2 】

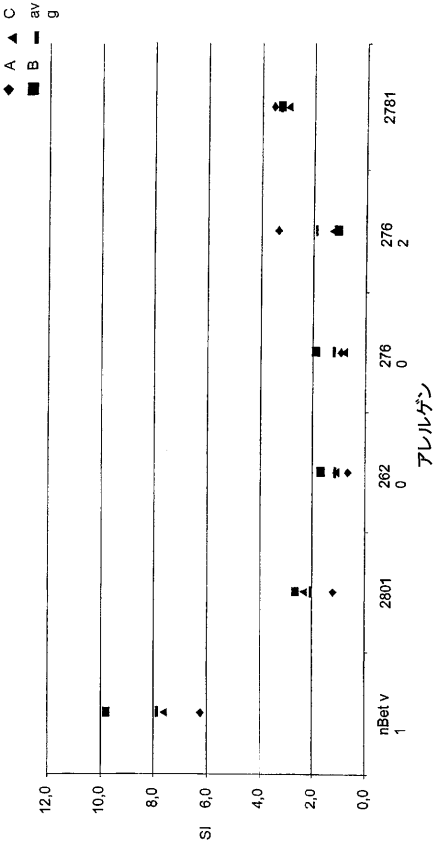


Figure 12

【 図 1 3 】

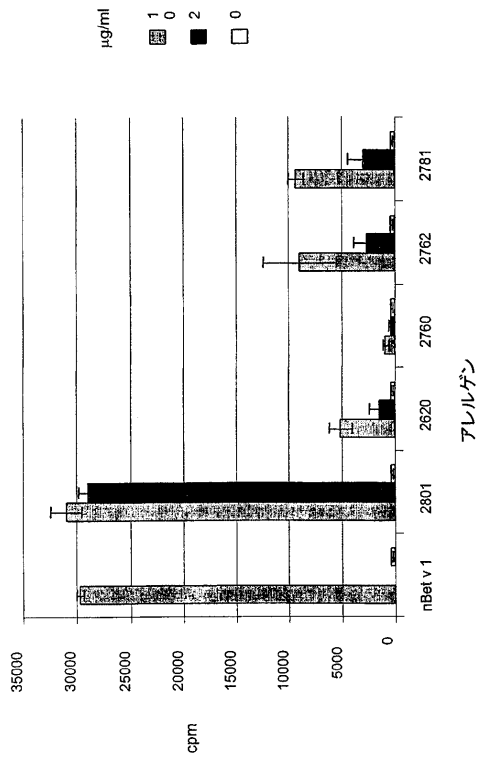


Figure 13

【 14 】

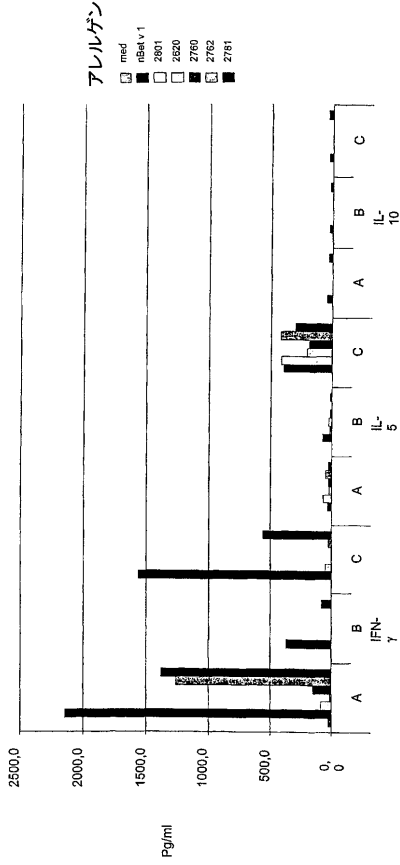


Figure 14

【 15 】

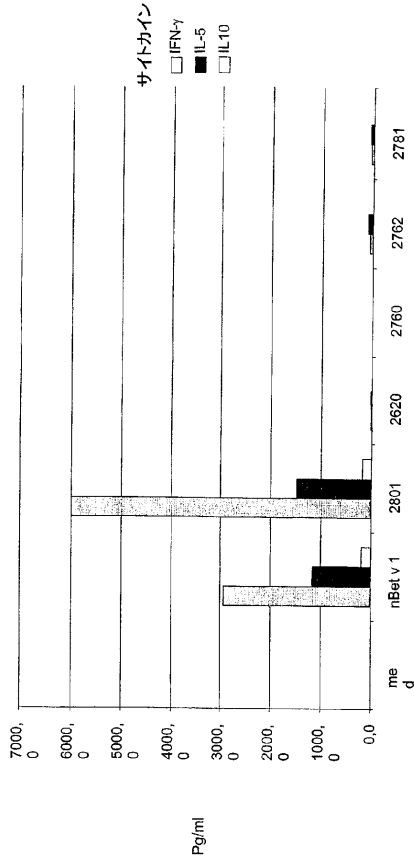


Figure 15

【 16 】

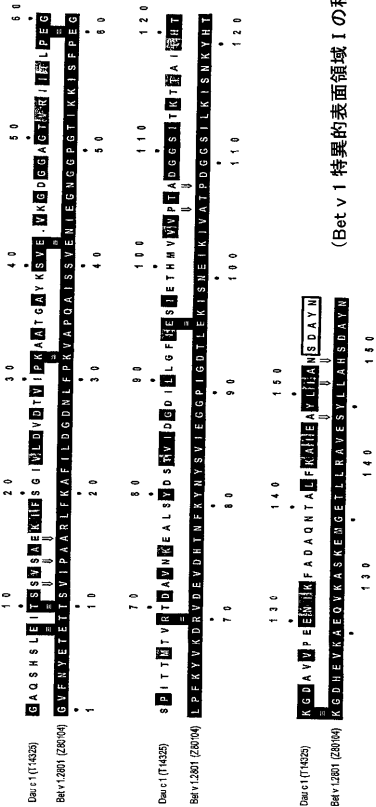


Figure 16

【 17 】

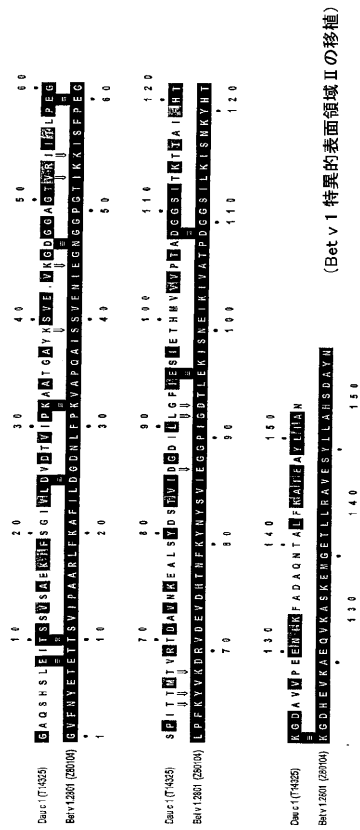


Figure 17

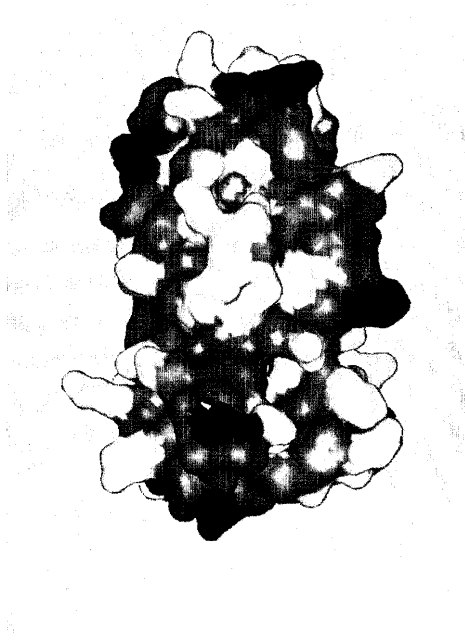


Figure 19D Turn 3 (270°)

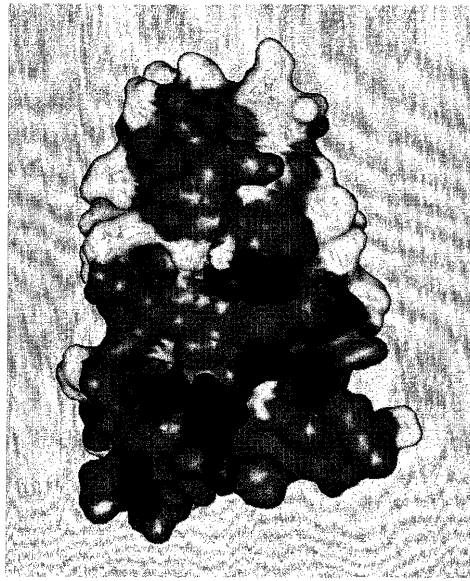


Figure 20A Grafting Front (0°)

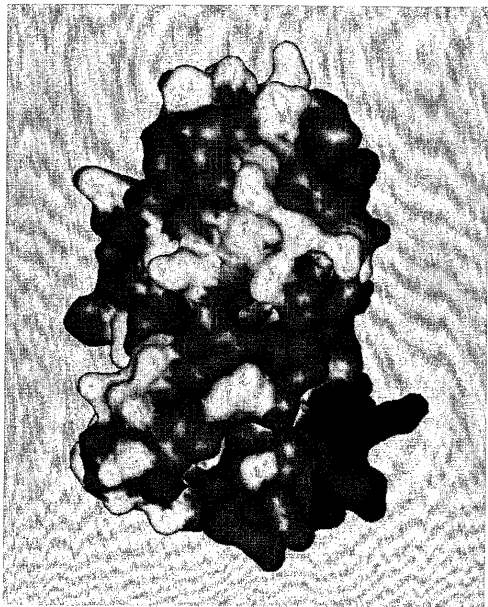


Figure 20B Grafting Turn 1 (90°)

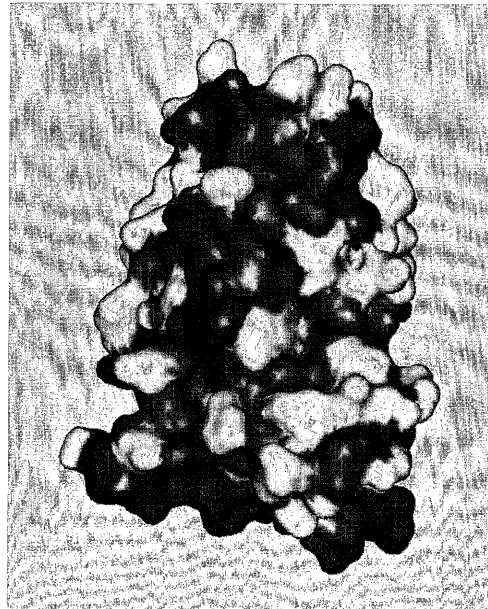


Figure 20C Grafting Turn 2 (180°)

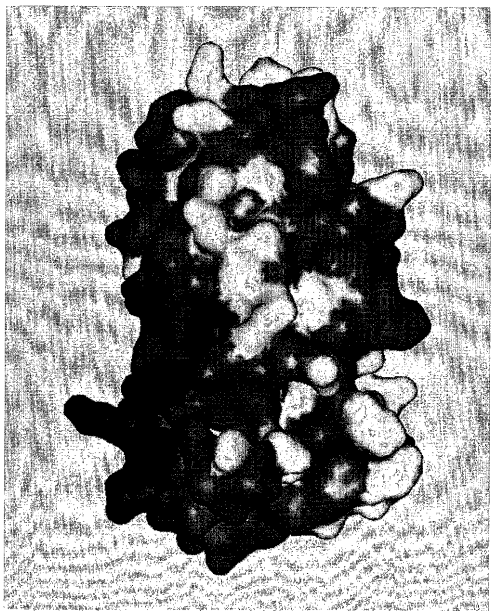


Figure 20D Grafting Turn 3 (270°)

【 2 2 】

1 10 20 30 40 50 60
 G44KPTKNSG
 110 120
 1 10 20 30 40 50 60
 G44KPTKNSG
 110 120
 1 10 20 30 40 50 60
 G44KPTKNSG
 110 120

Figure 22

【 2 1 】

1 10 20 30 40 50 60
 S V H I V E N E I S H P P P L F K A F W L D A D N H I P R P A P Q A T H A E I H E G G P G T I K K I F G E
 R V F Y V E I T S Y I P A R R L F A F I L D G G R L F K V A P A T I S S V E N I E G G P G T I K K I S F P E
 1 10 20 30 40 50 60
 S G G V V K I K E D S V A M R S V A L I E G P A L I D I H E K M S I E I H U V A S G S G I H K S I S H Y
 G P F K V Y R R D E V D H I F K I N Y V I E G G T G D I L E R I S H E I K I V A T P G G S I K I S K Y
 1 10 20 30 40 50 60
 R T G D E H I H E H K K G E K A H G P I H E S Y G D P P A V N L
 H T I G D I E V K A E Q V K A S E R G E F L I R V E S Y L A R S D A N I
 1 10 20 30 40 50 60

Figure 21

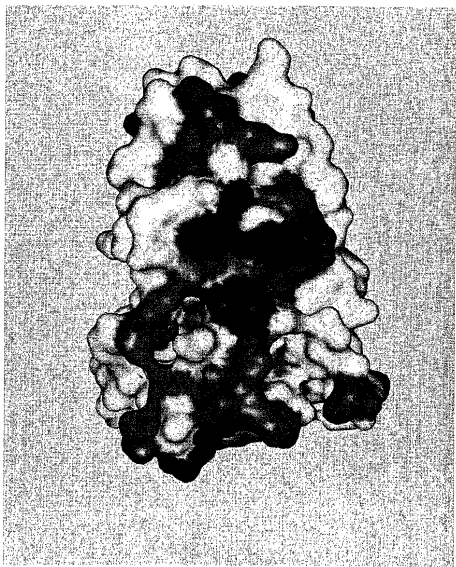


Figure 23 A Front (0°)

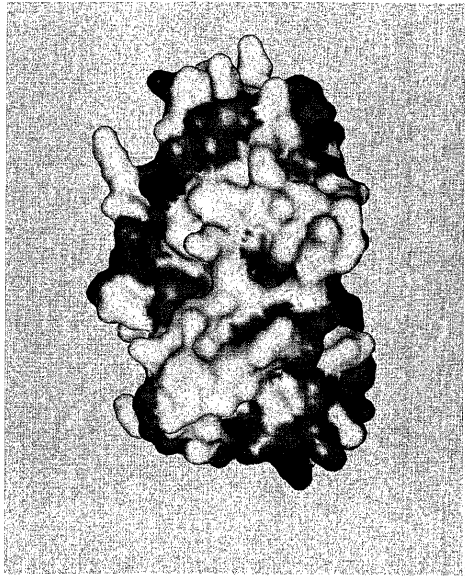


Figure 23B Tum 1 (100°)

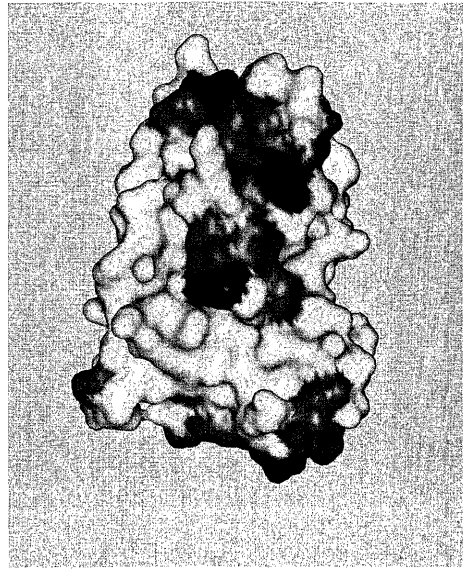


Figure 23C Tum 2 (130°)

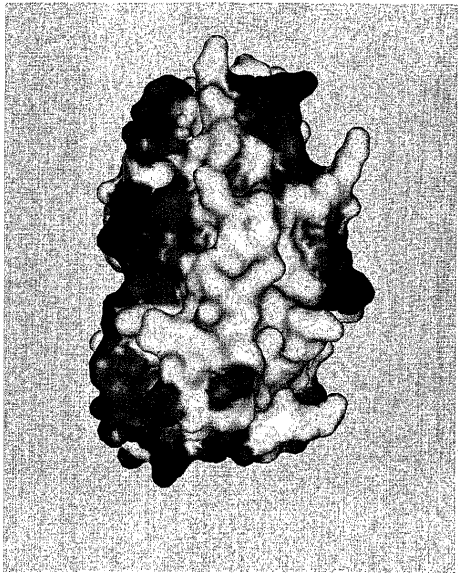


Figure 23D Tum 3 (270°)

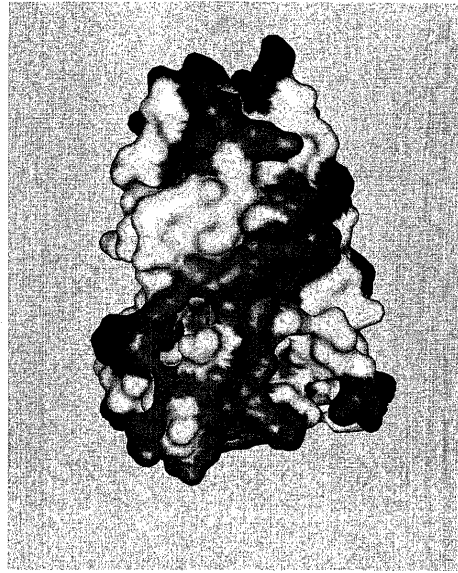
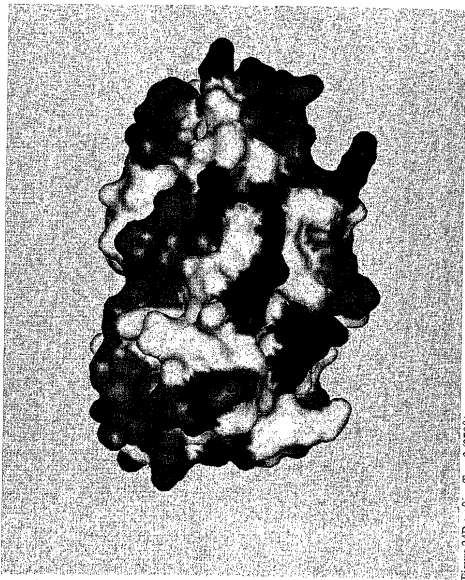
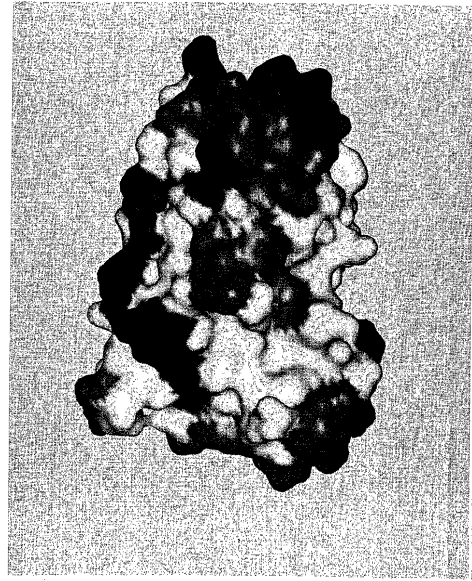
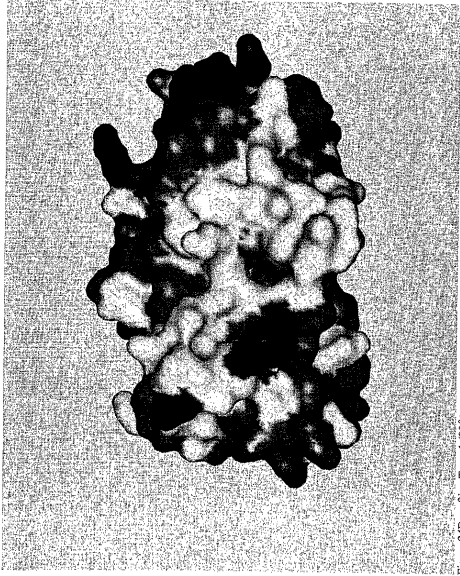


Figure 24A, grafting Front (0°)



【 図 2 5 】

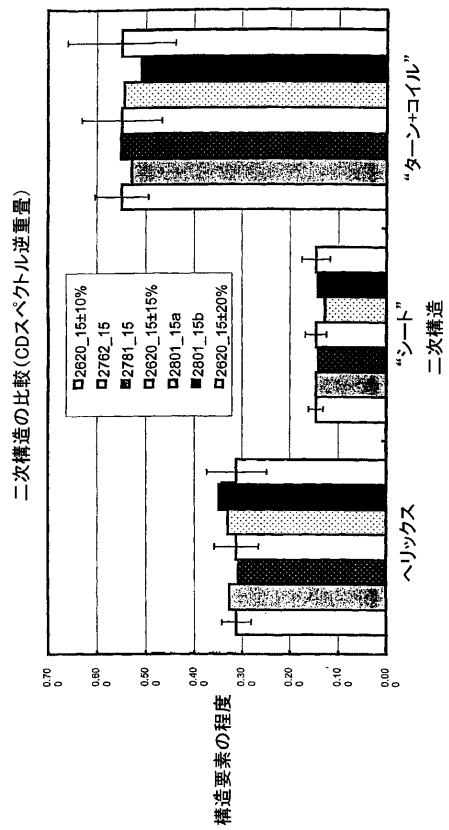
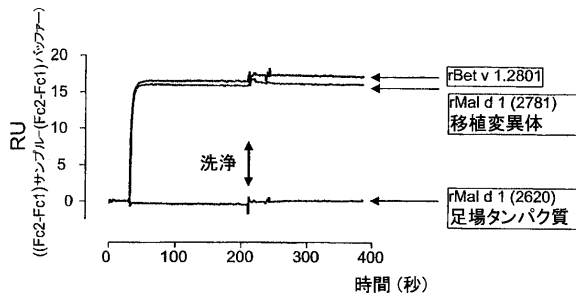


Figure 25

【 図 2 6 】

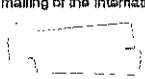
Figur 26



【 配列表 】

[2006520184000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DK 03/00744
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/29 C12N15/12 C07K14/415 C07K14/435 A61K39/35 A61K39/36 C12N5/10 //A61P37/08 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 7 C12N C07K A61K G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/070665 A (ALK ABELLO AS ; SPANGFORT MICHAEL DHO (SE); KING TE PIAO (US); UNIV RD) 12 September 2002 (2002-09-12)	53-56, 61, 64-66, 68-70, 73-77
Y	the whole document	1-18, 20-24, 29, 52-66, 68-71, 73-77
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 9 March 2004		Date of mailing of the international search report  12 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8018		Authorized officer Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DK 03/00744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIANG S ET AL: "GRAFTING OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTION EPI TOPE" JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS, vol. 17, no. 5, April 2001 (2001-04), pages 821-828, XP008004837 ISSN: 0739-1102 cited in the application the whole document	1-18, 20-24, 29, 52-66, 68-71, 73-77
A	WO 02/40676 A (NEDERGAARD LARSEN JOERGEN ; ALK ABELLO AS (DK); IPSEN HENRIK (DK); HOL) 23 May 2002 (2002-05-23) cited in the application page 36 - page 38 page 38, line 9 - line 15 example 3 page 81 - page 82 page 94, line 14 - line 26 claims	1-18, 20-24, 29, 54-66, 68-71, 73-77
X	KING T P ET AL: "Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 166, no. 10, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 6057-6065, XP002245357 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document	54,64, 65, 68-71, 73-76
A	SCHEURER S ET AL: "Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 36, no. 3, February 1999 (1999-02), pages 155-167, XP002245358 ISSN: 0161-5890	
A	HOLM J ET AL: "Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. BIOMEDICAL APPLICATIONS, vol. 756, no. 1-2, 25 May 2001 (2001-05-25), pages 307-313, XP004249674 ISSN: 0378-4347	

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/DK 03/00744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UEHARA MOTOHARU ET AL: "Sequential IgE epitope analysis of a birch pollen allergen (Bet v1) and an apple allergen (Mal d1)." ALLERGOLOGY INTERNATIONAL, vol. 50, no. 1, 2001, pages 57-62, XP002245359 ISSN: 1323-8930 -----	
A	PUNNONEN J: "MOLECULAR BREEDING OF ALLERGY VACCINES AND ANTIALLERGIC CYTOKINES" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 121, no. 3, 2000, pages 173-182, XP000979180 ISSN: 1018-2438 -----	
T	HOLM J ET AL: "Epitope grafting: The shaping of a conformational Bet v 1 epitope on Mal d 1, the major apple allergen." JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 111, no. 4, 20 April 2003 (2003-04-20), page 909, XP0008018281 ISSN: 0091-6749 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK 03/00744**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 64,65 and 68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 20-22,55-66,68-71,73-77 (in part) and claims 19 and 67
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-22, 52-71, 73-77 all partially and 33

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ DK 03/00744

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 64,65 and 68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20-22,55-66,68-71,73-77 (in part) and claims 19 and 67

Present claims 19 and 67 (as well as the parts of claims 20-22,55-66,68-71,73-77 depending thereon) relate to a compound or composition defined by reference to a method by which they can be obtained.

The claims cover all compounds and compositions having this characteristic, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/compounds/methods/apparatus. 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 compound or the composition 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, NO search has been carried out for claims 19 and 67 (as well as the parts of claims 20-22,55-66,68-71, 73-77 depending thereon).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ DK 03/00744

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-22,52-71,73-77 (all partially) and claims 23-32,72

A recombinant variant of a scaffold protein for the Bet v 1 allergen; methods for producing it and its therapeutic and diagnostic uses

2. claims: 1-22,52-71,73-77 (all partially) and claim 33

As for subject 1., but concerning allergens of the order Poales

3. claims: 1-22,34,52-71,73-77 (all partially)

As for subject 1., but concerning allergens from the order Asterales.

4. claims: 1-22,34,52-71,73-77 (all partially)

As for subject 1., but concerning allergens from the order Urticales.

5. claims: 1-22,52-71,73-77 (all partially) and claims 35-43

As for subject 1., but concerning the Der p 2 allergen.

6. claims: 1-22,53-71,73-77 (all partially) and claim 44

As for subject 1., but concerning a cockroach allergen.

7. claims: 1-22,53-71,73-77 (all partially) and claims 45-46

As for subject 1., but concerning mammalian allergens.

8. claims: 1-22,53-71,73-77 (all partially) and claims 47-50

As for subject 1., but concerning venom allergens from Hymenoptera.

9. claims: 1-22,52-71,73-77 (all partially) and claim 51

As for subject 1., but concerning food allergens.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK 03/00744

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02070665 A	12-09-2002	CA 2441476 A1	12-09-2002
		WO 02070665 A2	12-09-2002
		US 2003039660 A1	27-02-2003
WO 0240676 A	23-05-2002	AU 2350502 A	27-05-2002
		CA 2429172 A1	23-05-2002
		CN 1484699 T	24-03-2004
		CZ 20031653 A3	17-03-2004
		WO 0240676 A2	23-05-2002
		EP 1373510 A2	02-01-2004
		HU 0302601 A2	28-11-2003
		NQ 20032213 A	02-07-2003
		US 2003175312 A1	18-09-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ホルム イェンス
デンマーク デーコー 2 2 0 0 コペンハーゲン エヌ エー ジルスガーデ 6 7 2 ティーエイチ

(72) 発明者 ラーセン イェルゲン ネーデルガード
デンマーク デーコー 3 2 3 0 グレストッド ニーヴェイ 1 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA02 CA07 DA06 EA04 GA11 GA25
HA01 HA03 HA20
4B064 AG01 CA01 CA02 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA88Y AB01 AC14 BA02 BA16
BC01 BD14 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 NA14 ZB131
4C085 AA03 BB03 DD86 EE06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA30 EA20 EA50 FA74 GA01
GA10 GA15 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006520184A5	公开(公告)日	2006-11-09
申请号	JP2004547452	申请日	2003-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿库Arukabero细胞彩条扫描		
[标]发明人	ホルムイェンス ラーセンイェルゲンネーデルガード		
发明人	ホルム イェンス ラーセン イェルゲン ネーデルガード		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/00 A61K38/00 A61K39/39 A61K39/395 A61P37/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/57 A61P37/08 C07H21/04 C07K14/415 C07K14/43531 C07K14/43568 C07K2299/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/00 A61K37/02 A61K39/39 A61K39/395 A61P37/08 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA20 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065 /AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA88Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA02 4B065/BA16 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB131 4C085 /AA03 4C085/BB03 4C085/DD86 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA30 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA10 4H045 /GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	200201686 2002-11-01 DK 60/422983 2002-11-01 US		
其他公开文献	JP2006520184A		

摘要(译)

本发明涉及可用作免疫治疗组分的新型重组蛋白变体。本发明还涉及编码所述蛋白质变体的DNA序列以及包含所述蛋白质变体的组合物。