(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-530926
(P2024-530926A)
(43)公表日　令和6年8月27日(2024.8.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/415	*(2006.01)*	C07K	14/415	ZNA	4B065
C12N 15/29	*(2006.01)*	C12N	15/29		4C084
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C085
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		4C086
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全135頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-506789(P2024-506789)
(86)(22)出願日　令和4年8月2日(2022.8.2)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月8日(2024.3.8)
(86)国際出願番号　PCT/IB2022/057144
(87)国際公開番号　WO2023/012652
(87)国際公開日　令和5年2月9日(2023.2.9)
(31)優先権主張番号　63/228,604
(32)優先日　令和3年8月3日(2021.8.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/228,606
(32)優先日　令和3年8月3日(2021.8.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/284,108
最終頁に続く

(71)出願人　521567055
ウッコ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州 ９４１０４－５４０１・サンフランシスコ・マーケット ストリート ナンバー９７９
(74)代理人　110001379
弁理士法人大島特許事務所
(72)発明者　オフラン、ヤナイ
イスラエル国テル アビブ ６２１５４２・アキヴァ アリー ストリート ２１
(72)発明者　ベン デイビッド、モシェ
イスラエル国レホボト ７６６２０３７・ハル ハツォフィム ストリート ２５
(72)発明者　マーク ガーバー、オーリー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　低アレルゲン性ピーナッツアレルゲン、その製造方法、及びその使用

(57)【要約】
一実施形態では、本開示によれば、抗Ａｒａｈ１抗体または抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される少なくとも１つのエピトープが欠失し、その結果、ピーナッツアレルゲン変異体への抗体結合が減少または消失した、低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１変異体またはＡｒａｈ２変異体が提供される。このような低アレルゲン性ピーナッツアレルゲン変異体は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象（患者）において、ピーナッツに対する減感作を誘導する方法に使用され得る。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含み、かつ、
前記組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、配列番号３に記載の配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
前記置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせは、
（ａ）位置１２における、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｄ、Ｔ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、Ｃ、Ｋ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＡ；
（ｂ）位置１５における、Ｒ、Ｅ、Ｋ、Ｙ、Ｗ、Ｆ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、またはＡ；
（ｃ）位置１６における、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｑ、Ｔ、Ｍ、Ｐ、Ｃ、Ｅ、またはＷ；
（ｄ）位置２２における、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｑ、Ｅ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｃ、Ｒ、またはＨ；
（ｅ）位置２４における、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｌ、Ｉ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｆ、Ｐ、Ａ、またはＧ；
（ｆ）位置４６における、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、Ａ、Ｇ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｒ、Ｐ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、またはＣ；
（ｇ）位置５３における、Ｔ、Ｓ、Ｑ、Ｖ、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｐ、Ｍ、Ｌ、Ｉ、Ｅ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｎ、またはＤ；
（ｈ）位置６５における、Ｔ、Ａ、Ｎ、Ｄ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｗ、Ｐ、Ｇ、Ｃ、またはＥ；
（ｉ）位置８０における、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｃ、Ｅ、Ｋ、Ｒ、またはＧ；
（ｊ）位置８３における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｉ、Ｐ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ、またはＱ；
（ｋ）位置８６における、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｒ、Ｅ、Ｃ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、またはＱ；
（ｌ）位置８７における、Ｆ、Ｙ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ａ、Ｓ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｎ、Ｅ、またはＰ；
（ｍ）位置９０における、Ｓ、Ｐ、Ｑ、またはＲ；
（ｎ）位置１０４における、Ｌ、Ｍ、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、またはＷ；
（ｏ）位置１１５における、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ａ、Ｉ、Ｗ、Ｆ、Ｙ、またはＨ；
（ｐ）位置１２３における、Ｉ、Ｑ、またはＡ；
（ｑ）位置１２７における、Ｈ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、Ｙ、Ｑ、またはＶ；及び、
（ｒ）位置１４０における、Ｇ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、またはＶ；
のうちの１以上を含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項３】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２～１８の置換、

欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項４】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号４の位置１２～１６のアミノ酸が配列番号５に記載の配列を含む、
配列番号４の位置４４～６５のアミノ酸が配列番号６に記載の配列を含む、
配列番号４の位置４４～６７のアミノ酸が配列番号９に記載の配列を含む、または、
配列番号４の位置１１～９０のアミノ酸が配列番号７もしくは配列番号８に記載の配列を含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項５】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号４の位置２８、４４、４８、５１、５５、６３、６７、１０７、１０８、１０９、１２４、１２５、及び１４２のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項６】
請求項５に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
前記追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせは、
（ａ）位置２８における、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｎ、Ａ、Ｐ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｅ、またはＤ；
（ｂ）位置４４における、Ｉ、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｋ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｍ、またはＲ；
（ｃ）位置４８における、Ｖ、Ｇ、Ｃ、Ｅ、Ｈ、Ｑ、Ｆ、Ｋ、Ｌ、Ｉ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、またはＤ；
（ｄ）位置５１における、Ｓ、Ｇ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｔ、Ｄ、またはＶ；
（ｅ）位置５５における、Ｇ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｑ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｒ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、またはＷ；
（ｆ）位置６３における、Ｐ、Ｃ、Ｆ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｑ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、またはＲ；
（ｇ）位置６７における、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｐ、またはＧ；
（ｈ）位置１０７における、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｑ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹ；
（ｉ）位置１０８における、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｇ、Ａ、Ｑ、またはＫ；
（ｊ）位置１０９における、Ｋ、Ｃ、Ｓ、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｙ、Ｗ、Ｌ、またはＩ；
（ｋ）位置１２４における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ、Ｌ、Ｅ、またはＱ；
（ｌ）位置１２５における、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、Ｙ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｔ、Ｖ、またはＡ；及び、
（ｍ）位置１４２における、Ｍ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹ；
のうちの１以上を含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項７】
請求項５に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、２８、４４、４６、４８、５１、５３、５５、６３、６５、６７、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１０７、１０８、１０９、１１５、１２３、１２４、１２５、１２７、１４０、及び１４２のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、２～３１の置換、

欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項８】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、
配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、
配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチド。
【請求項９】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列であって、
前記ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡを含む、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列。
【請求項１０】
請求項９に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列であって、
前記ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列は、
配列番号１６７もしくは１６９に記載のヌクレオチド配列を含むか、または、
配列番号１６７もしくは１６９に記載のヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列。
【請求項１１】
請求項９に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む発現ベクター。
【請求項１２】
請求項１１に記載の発現ベクターを含む原核細胞または真核細胞であって、
前記真核細胞は、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、または哺乳類細胞を含む、原核細胞または真核細胞。
【請求項１３】
請求項１に記載の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドを含む組成物。
【請求項１４】
請求項１３に記載の組成物であって、
アジュバントをさらに含む、組成物。
【請求項１５】
ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、
前記対象に対して請求項１３に記載の組成物を投与するステップを含み、
それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法。
【請求項１６】
請求項１５に記載の方法であって、
前記組成物は、経口、皮下、皮内、筋肉内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、静脈内、経皮、及びバイオリステック経路から選択される経路、または、吸入によって投与される、方法。
【請求項１７】
請求項９に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む組成物。
【請求項１８】
請求項１７に記載の組成物であって、
アジュバントをさらに含む、組成物。
【請求項１９】
ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、
前記対象に対して請求項１７に記載の組成物を投与するステップを含み、

それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法。
【請求項２０】
請求項１９に記載の組成物であって、
前記組成物は、経口、皮下、皮内、筋肉内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、静脈内、経皮、及びバイオリステック経路から選択される経路、または、吸入によって投与される、方法。
【請求項２１】
組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、
配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含み、かつ、
前記組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６５に記載された配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。
【請求項２２】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、
前記置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせは、
（ａ）位置１９４における、Ｄ；
（ｂ）位置１９４における、Ａ；
（ｃ）位置２１３における、Ｈ；
（ｄ）位置２１５における、Ｒ、Ｄ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、またはＡ；
（ｅ）位置２３１における、Ａ；
（ｆ）位置２３４における、Ｅ；
（ｇ）位置２４５における、Ｒ；
（ｈ）位置２６７における、Ｅ；
（ｉ）位置２８７における、Ｄ；
（ｊ）位置２９４における、Ｅ；
（ｋ）位置３１２における、ＡまたはＨ；
（ｌ）位置３３１における、Ｈ；
（ｍ）位置４１９における、Ｅ、Ｖ、またはＡ；
（ｎ）位置４２２における、ＲまたはＡ；
（ｏ）位置４４３における、Ａ；
（ｐ）位置４５５における、Ａ；
（ｑ）位置４６２における、Ａ、Ｋ、またはＴ；
（ｒ）位置４６３における、Ｓ；
（ｓ）位置４６４における、ＡまたはＳ；
（ｔ）位置４８０における、Ｑ；
（ｕ）位置４９４における、Ａ、Ｅ、またはＮ；及び、
（ｖ）位置５００における、Ｋ；
のうちの１以上を含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。
【請求項２３】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、
配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２～２２の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。
【請求項２４】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、

配列番号６７の位置１２、２４、２７、３０、４２、５７、５８、７３、及び５２３のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項２５】

請求項２４に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、

前記追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせは、

（ａ）位置１２における、ＫまたはＡ；

（ｂ）位置２４における、ＶまたはＥ；

（ｃ）位置２７における、ＡまたはＨ；

（ｄ）位置３０における、ＥまたはＡ；

（ｅ）位置４２における、ＬまたはＫ；

（ｆ）位置５７における、ＤまたはＬ；

（ｇ）位置５８における、ＳまたはＲ；

（ｈ）位置７３における、ＡまたはＭ；及び、

（ｉ）位置５２３における、ＡまたはＫ；

のうちの１以上を含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項２６】

請求項２４に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、

配列番号６７の位置８７、８８、９６、９９、１９６、１９７、２００、２０９、２３８、２４９、２６０、２６１、２６３、２６５、２６６、２７８、２８３、２８８、２９０、２９５、３１８、３２２、３３４、３３６、３７８、４１７、４２１、４４１、４４３、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、及び４９１のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項２７】

請求項２６に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、

前記追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせは、

（ａ）位置８７における、Ａ；

（ｂ）位置８８における、Ａ；

（ｃ）位置９６における、Ａ；

（ｄ）位置９９における、Ａ；

（ｅ）位置１９６における、Ｈ；

（ｆ）位置１９７における、Ａ；

（ｇ）位置２００における、Ｖ、Ａ、またはＱ；

（ｈ）位置２０９における、Ｓ；

（ｉ）位置２３８における、Ｑ；

（ｊ）位置２４９における、Ｎ；

（ｋ）位置２６０における、Ｋ；

（ｌ）位置２６１における、Ｒ；

（ｍ）位置２６３における、ＫまたはＬ；

（ｎ）位置２６５おける、Ｓ；

（ｏ）位置２６６における、ＲまたはＬ；

（ｐ）位置２７８における、Ｒ；

（ｑ）位置２８３における、Ｅ；

（ｒ）位置２８８における、Ｑ；

（ｓ）位置２９０における、Ｒ；

（ｔ）位置２９５における、Ａ；

（ｕ）位置３１８における、Ｈ；

（ｖ）位置３２２における、ＡまたはＫ；

（ｗ）位置３３４における、Ｄ、Ａ、またはＮ；
（ｘ）位置３３６における、ＲまたはＳ；
（ｙ）位置３７８における、ＫまたはＥ；
（ｚ）位置４１７における、Ｒ；
（ａａ）位置４２１における、ＥまたはＳ；
（ｂｂ）位置４４１における、Ｎ；
（ｃｃ）位置４４３における、Ａ；
（ｄｄ）位置４８１における、ＡまたはＳ；
（ｅｅ）位置４８４における、Ｒ、Ｓ、Ａ、またはＭ；
（ｆｆ）位置４８５における、Ａ；
（ｇｇ）位置４８７における、ＳまたはＫ；
（ｈｈ）位置４８８における、Ａ；及び、
（ｉｉ）位置４９１における、Ａ、Ｓ、またはＥ；
のうちの１以上を含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項２８】
請求項２６に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、
配列番号６７の位置８４におけるＡの置換をさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項２９】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、
配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、
配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチド。

【請求項３０】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列であって、
前記ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡを含む、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列。

【請求項３１】
請求項３０に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列であって、
前記ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列は、
配列番号１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、もしくは１８３の配列を含むか、または、
配列番号１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、もしくは１８３に記載のヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列。

【請求項３２】
請求項３０に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

【請求項３３】
請求項３２に記載の発現ベクターを含む原核細胞または真核細胞であって、
前記真核細胞は、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、または哺乳類細胞を含む、原核細胞または真核細胞。

【請求項３４】
請求項２１に記載の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドを含む組成物。

【請求項３５】
請求項３４に記載の組成物であって、
アジュバントをさらに含む、組成物。

【請求項３６】

ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、
前記対象に対して請求項３４に記載の組成物を投与するステップを含み、
それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法。
【請求項３７】
請求項３６に記載の方法であって、
前記組成物は、経口、皮下、皮内、筋肉内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、静脈内、経皮、及びバイオリステック経路から選択される経路、または、吸入によって投与される、方法。
【請求項３８】
請求項３０に記載のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む組成物。
【請求項３９】
請求項３８に記載の組成物であって、
アジュバントをさらに含む、組成物。
【請求項４０】
ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、
前記対象に対して請求項３８に記載の組成物を投与するステップを含み、
それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法。
【請求項４１】
請求項４０に記載の方法であって、
前記組成物は、経口、皮下、皮内、筋肉内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、静脈内、経皮、及びバイオリステック経路から選択される経路、または、吸入によって投与される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（配列表に関する声明）
本出願は、ＸＭＬ形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。２０２２年７月２９日に作成されたこのＸＭＬコピーの名称は、「Ｐ－６０５３７６－ＰＣ＿ＳＬ．ｘｍｌ」であり、そのサイズは、４２１．４キロバイトである。
【０００２】
（技術分野）
本開示は、一般に、組換え低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１またはＡｒａｈ２、その製造方法、及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
現在知られている最も重度の食物アレルギーの１つはピーナッツアレルギーであり、アレルギー体質の人は、たとえ低濃度であってもピーナッツに暴露されると、軽度の局所的影響から生命を脅かす重篤な影響まで、様々な症状を呈する。ピーナッツは、米国における食物誘発性アナフィラキシーショックの死因の第１位であり（Finkelman, (2010) Current Opinion in Immunology, 22(6):783-788）、ピーナッツに対する何らかのアレルギー反応が米国の人口の約１％で報告されている（Sicherer SH, et al., (2010). J Allergy Clin Immunol. 125(6):1322-6）。
【０００４】
これまでに、ＩｇＥ媒介アレルギー反応をもたらすタンパク質として、１６種類のピーナッツタンパク質が確認されている（Palladino, C., & Breiteneder, H. (2018). Molecular immunology, 100:58-70）。これらのタンパク質のうち、種子貯蔵タンパク質Ａｒａｈ１、Ａｒａｈ２、Ａｒａｈ３、及びＡｒａｈ６が主要アレルゲンと考えら

れており、ＩｇＥ抗体を介した反応によって認識されると、より重篤な症状と相関する（Palladino, et al., 2018; ibid) (Bernard, et al., (2007) J Agric Food Chem. 55(23):9663-9）。１６種類のピーナッツアレルゲンのうち、Ａｒａｈ２は、３～６歳のアメリカ人の子供の血清ＩｇＥの約７５～８０％によって認識されることから、最も重要であると考えられている（Valcour, et. al., Ann Allergy Asthma Immunol 119 (2017)) (Koppelman et al., (2004). Clin Exp Allergy. 34(4):583-90）。Ａｒａｈ２は、１７ｋＤの単量体ポリペプチドであり、プロラミンタンパク質スーパーファミリーに属する２Ｓアルブミンファミリーの一員である（Lehmann K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Suhr M, Becker WM, et al. (2006) Biochem J. 395(3):463-72）。Ａｒａｈ２は、ピーナッツ抽出物中の総タンパク質の６～１０％を占める（Koppelman, S. J., et al. (2001) Allergy 56:2）。Ａｒａｈ２は、消化管を介して、感作を直接引き起こす。Ａｒａｈ２のコア構造は、ジスルフィド結合を形成するよく保存されたシステインから生成される高安定性構造に起因して、タンパク質分解に対する耐性が非常に高い。Ａｒａｈ２の折り畳まれたバージョンと折り畳まれていないバージョンとを比較したところ、ＩｇＥ抗体は、線状エピトープと立体配座エピトープとの両方を認識することが明らかになった。これらは、折り畳まれたタンパク質に対して試験した場合にのみ血清によって結合される（Bernard et al., (2015) J Allergy Clin Immunol. 135(5):1267-74.e1-8）。

【０００５】

Ａｒａｈ１は、６３ｋＤａのピーナッツ種子タンパク質であり、ピーナッツ抽出物中の総タンパク質の１２～１６％を占める。Ａｒａｈ１は、安定したホモ三量体を有する耐熱性の７Ｓビシリン様グロブリンを有する（Pomes et al. (2003) The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 111 (3): 640-5）。Ａｒａｈ１は、初めはプレプロタンパク質であり、２回の細胞内タンパク質分解性切断後に、ピーナッツに見られる成熟型になる。成熟型は、フレキシブル領域とコア領域とを有する。Ａｒａｈ１コアの結晶構造（残基１７０－５８６）（3S7I.pdb; 3SMH.pdb）は、アレルゲンの中心部分がビクピン折畳み（bicupin fold）を有することを示している。従来、ＩｇＥ結合線状エピトープがＡｒａｈ１にマッピングされており、エピトープごとに１つのアミノ酸を置換するだけで、ＩｇＥ結合が消失した（Burks et al. (1997). Eur J Biochem 1997; 245(2):334-9）。しかしながら、耐熱性三量体表面に対する立体配座エピトープについてはあまり研究されていなかった。

【０００６】

アレルゲンへの曝露を完全に回避すること以外に、それぞれのアレルゲンの量を増やしながら患者への曝露を制御する治療（すなわち免疫療法（ＩＴ））が行われてきた。免疫療法（ＩＴ）の焦点は、アレルギー反応を引き起こさないアレルゲンの量を増やすことで、アレルゲンの機会を効果的に減らしながら、アレルゲンに対処するための免疫システムを再教育することで、アレルゲンの誤飲によるアレルギー反応を潜在的に防ぐことである。現在、免疫療法は、外来診療所で行われている。近年、各社はピーナッツ抽出物を標準化した製品を開発し、より安全な、かつ家庭でも使用できる治療レジメンを提供している。

【０００７】

ピーナッツアレルゲンに対するアレルギーを有する患者における、標準化された免疫療法治療のための低アレルゲン性ピーナッツタンパク質及びその使用方法に対するニーズは依然として存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本明細書では、例えばＡｒａｈ１アレルゲン変異体またはＡｒａｈ２アレルゲン変異体の作製のために、生物物理的特性及び機能的特性を維持する低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンをデザインするためのいくつかのエピトープマッピング法について説明する。一

態様では、本開示によれば、抗Ａｒａｈ１抗体または抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される少なくとも１つのエピトープが欠失し、その結果、ピーナッツアレルゲン変異体への抗体結合が減少または消失した、低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１変異体またはＡｒａｈ２変異体が提供される。

【０００９】

一態様では、本開示によれば、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、配列番号３に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【００１０】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、

（ａ）位置１２における、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｄ、Ｔ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、Ｃ、Ｋ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＡ；

（ｂ）位置１５における、Ｒ、Ｅ、Ｋ、Ｙ、Ｗ、Ｆ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、またはＡ；

（ｃ）位置１６における、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｑ、Ｔ、Ｍ、Ｐ、Ｃ、Ｅ、またはＷ；

（ｄ）位置２２における、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｑ、Ｅ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｃ、Ｒ、またはＨ；

（ｅ）位置２４における、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｌ、Ｉ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｆ、Ｐ、Ａ、またはＧ；

（ｆ）位置４６における、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、Ａ、Ｇ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｒ、Ｐ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、またはＣ；

（ｇ）位置５３における、Ｔ、Ｓ、Ｑ、Ｖ、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｐ、Ｍ、Ｌ、Ｉ、Ｅ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｎ、またはＤ；

（ｈ）位置６５における、Ｔ、Ａ、Ｎ、Ｄ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｗ、Ｐ、Ｇ、Ｃ、またはＥ；

（ｉ）位置８０における、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｃ、Ｅ、Ｋ、Ｒ、またはＧ；

（ｊ）位置８３における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｉ、Ｐ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ、またはＱ；

（ｋ）位置８６における、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｒ、Ｅ、Ｃ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、またはＱ；

（ｌ）位置８７における、Ｆ、Ｙ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ａ、Ｓ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｎ、Ｅ、またはＰ；

（ｍ）位置９０における、Ｓ、Ｐ、Ｑ、またはＲ；

（ｎ）位置１０４における、Ｌ、Ｍ、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、またはＷ；

（ｏ）位置１１５における、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ａ、Ｉ、Ｗ、Ｆ、Ｙ、またはＨ；

（ｐ）位置１２３における、Ｉ、Ｑ、またはＡ；

（ｑ）位置１２７における、Ｈ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、Ｙ、Ｑ、またはＶ；または、

（ｒ）位置１４０における、Ｇ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、

Ｓ、またはＶ；
の置換の１以上を含む。
【００１１】
一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、配列番号４の位置２８、４４、４８、５１、５５、６３、６７、１０７、１０８、１０９、１２４、１２５、及び１４２のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、
（ａ）位置２８における、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｎ、Ａ、Ｐ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｅ、またはＤ；
（ｂ）位置４４における、Ｉ、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｋ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｍ、またはＲ；
（ｃ）位置４８における、Ｖ、Ｇ、Ｃ、Ｅ、Ｈ、Ｑ、Ｆ、Ｋ、Ｌ、Ｉ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、またはＤ；
（ｄ）位置５１における、Ｓ、Ｇ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｔ、Ｄ、またはＶ；
（ｅ）位置５５における、Ｇ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｑ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｒ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、またはＷ；
（ｆ）位置６３における、Ｐ、Ｃ、Ｆ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｑ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、またはＲ；
（ｇ）位置６７における、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｐ、またはＧ；
（ｈ）位置１０７における、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｑ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹ；
（ｉ）位置１０８における、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｇ、Ａ、Ｑ、またはＫ；
（ｊ）位置１０９における、Ｋ、Ｃ、Ｓ、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｙ、Ｗ、Ｌ、またはＩ；
（ｋ）位置１２４における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ、Ｌ、Ｅ、またはＱ；
（ｌ）位置１２５における、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、Ｙ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｔ、Ｖ、またはＡ；または、
（ｍ）位置１４２における、Ｍ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹ；
の置換の１以上を含む。
【００１２】
一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１３】
また、本開示によれば、上記の本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドのうちのいずれか１つをコードするヌクレオチド配列、そのヌクレオチド配列を含む発現ベクター、及び、その発現ベクターを含む細胞が提供される。また、本開示によれば、上記の発現ベクターを使用して、上記の本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドを製造する方法も提供される。
【００１４】
一実施形態では、本開示によれば、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、配列番号６５に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸

の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【００１５】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、

（ａ）位置１９４における、Ｄ；
（ｂ）位置１９４における、Ａ；
（ｃ）位置２１３における、Ｈ；
（ｄ）位置２１５における、Ｒ、Ｄ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、またはＡ；
（ｅ）位置２３１における、Ａ；
（ｆ）位置２３４における、Ｅ；
（ｇ）位置２４５における、Ｒ；
（ｈ）位置２６７における、Ｅ；
（ｉ）位置２８７における、Ｄ；
（ｊ）位置２９４における、Ｅ；
（ｋ）位置３１２における、ＡまたはＨ；
（ｌ）位置３３１における、Ｈ；
（ｍ）位置４１９における、Ｅ、Ｖ、またはＡ；
（ｎ）位置４２２における、ＲまたはＡ；
（ｏ）位置４４３における、Ａ；
（ｐ）位置４５５における、Ａ；
（ｑ）位置４６２における、Ａ、Ｋ、またはＴ；
（ｒ）位置４６３における、Ｓ；
（ｓ）位置４６４における、ＡまたはＳ；
（ｔ）位置４８０における、Ｑ；
（ｕ）位置４９４における、Ａ、Ｅ、またはＮ；または、
（ｖ）位置５００における、Ｋ；

の置換の１以上を含む。

【００１６】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６７の位置１２、２４、２７、３０、４２、５７、５８、７３、及び５２３のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、

（ａ）位置１２における、ＫまたはＡ；
（ｂ）位置２４における、ＶまたはＥ；
（ｃ）位置２７における、ＡまたはＨ；
（ｄ）位置３０における、ＥまたはＡ；
（ｅ）位置４２における、ＬまたはＫ；
（ｆ）位置５７における、ＤまたはＬ；
（ｇ）位置５８における、ＳまたはＲ；
（ｈ）位置７３における、ＡまたはＭ；または、
（ｉ）位置５２３における、ＡまたはＫ；

の置換の１以上を含む。

【００１７】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６７の位置８７、８８、９６、９９、１９６、１９７、２００、２０９、２３８、２４９、２６０、２６１、２６３、２６５、２６６、２７８、２８３、２８８、２９０、２９５、３１８、３２２、３３４、３３６、３７８、４１７、４２１、４４１、４４３、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、及び４９１のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、

（ａ）位置８７における、Ａ；
（ｂ）位置８８における、Ａ；
（ｃ）位置９６における、Ａ；
（ｄ）位置９９における、Ａ；
（ｅ）位置１９６における、Ｈ；
（ｆ）位置１９７における、Ａ；
（ｇ）位置２００における、Ｖ、Ａ、またはＱ；
（ｈ）位置２０９における、Ｓ；
（ｉ）位置２３８における、Ｑ；
（ｊ）位置２４９における、Ｎ；
（ｋ）位置２６０における、Ｋ；
（ｌ）位置２６１における、Ｒ；
（ｍ）位置２６３における、ＫまたはＬ；
（ｎ）位置２６５おける、Ｓ；
（ｏ）位置２６６における、ＲまたはＬ；
（ｐ）位置２７８における、Ｒ；
（ｑ）位置２８３における、Ｅ；
（ｒ）位置２８８における、Ｑ；
（ｓ）位置２９０における、Ｒ；
（ｔ）位置２９５における、Ａ；
（ｕ）位置３１８における、Ｈ；
（ｖ）位置３２２における、ＡまたはＫ；
（ｗ）位置３３４における、Ｄ、Ａ、またはＮ；
（ｘ）位置３３６における、ＲまたはＳ；
（ｙ）位置３７８における、ＫまたはＥ；
（ｚ）位置４１７における、Ｒ；
（ａａ）位置４２１における、ＥまたはＳ；
（ｂｂ）位置４４１における、Ｎ；
（ｃｃ）位置４４３における、Ａ；
（ｄｄ）位置４８１における、ＡまたはＳ；
（ｅｅ）位置４８４における、Ｒ、Ｓ、Ａ、またはＭ；
（ｆｆ）位置４８５における、Ａ；
（ｇｇ）位置４８７における、ＳまたはＫ；
（ｈｈ）位置４８８における、Ａ；または、
（ｉｉ）位置４９１における、Ａ、Ｓ、またはＥ；

の置換の１以上を含む。

【００１８】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６７の位置８４におけるＡの置換をさらに含む。

【００１９】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２０】

また、本開示によれば、上記の本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドのうちのいずれか１つをコードするヌクレオチド配列、そのヌクレオチド配列を含む発現ベクター、及び、その発現ベクターを含む細胞が提供される。また、本開示によれば、上記の発現ベクターを使用して、上記の本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドを製造する方法も提供される。

【００２１】

別の態様では、本開示によれば、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、前記対象に対して、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体、またはそれらの組み合わせを含む組成物を投与するステップを含み、それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法が提供される。

【００２２】

別の態様では、本開示によれば、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、前記対象に対して、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体をコードするヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体をコードするヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列、またはそれらの組み合わせを含む組成物を投与するステップを含み、それによって、前記対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する、方法が提供される。

【００２３】

別の態様では、本開示によれば、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体、またはそれらの組み合わせを発現する遺伝子組換えピーナッツ植物が提供される。

【００２４】

別の態様では、本開示によれば、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体、またはそれらの組み合わせを含む加工食品が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

免疫原性を維持しながらアレルゲン性を低減する、本明細書に記載の低アレルゲン性ポリペプチド変異体、及びその製造方法と見なされる主題は、本明細書の結論部分で特に指摘され、明確に主張されている。しかしながら、本発明のＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２ポリペプチド変異体及びその製造方法は、その構成及びその動作方法の両方に関して、また、その目的、特徴、及び利点と共に、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明を参照することによって最もよく理解されるであろう。

【００２６】

【図１】図１：Ａｒａｈ特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の発見パイプライン。図１は、ピーナッツアレルギー患者からのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の発見に基づくエピトープマッピング手順のフローチャートであり、患者サンプルからエピトープの残基レベルのマッピングまでを示す。示されているステップは、患者ＰＭＢＣの収集から、単一細胞選別（上側パネル）またはファージディスプレイパニング（下側パネル）によるｍＡｂの精製までである。

【図２】図２：Ａｒａｈ精製ｍＡｂのエピトープマッピングのための３つのアプローチ。アプローチ１では、単離された各Ａｒａｈ特異的ｍＡｂについて、Ａｒａｈ酵母ディスプ

レイ単一部位飽和変異ライブラリを結合について選別した。選別された高結合集団及び低結合集団をディープシークエンシングに送り、変異体エンリッチメント分析によりｍＡｂが結合したＡｒａｈ領域を同定した。アプローチ２では、ペプチドアレイを利用して、同定された結合部位を解析した。線状エピトープの結合を決定するために、野生型（ＷＴ）Ａｒａｈ配列を有するペプチドアレイと点変異を有する追加のペプチドアレイとの２種類のＣｅｌｌｕｓｐｏｔ（ＴＭ）ペプチドマイクロアレイに基づく免疫測定法を各ｍＡｂに対して実施した。アプローチ３では、変異パッチ解析を行った。表面曝露パッチ変異誘発の構造ベースのインシリコデザインに続いて、特異的ＡｒａｈｍＡｂに対するＡｒａｈ変異体の間接ＥＬＩＳＡスクリーニングを行った。突然変異体に対するｍＡｂ結合の減少または消失により、配列中のエピトープ位置が確認される。

【図３Ａ】図３Ａ及び図３Ｂ：Ａｒａｈ２の点変異体は、血清由来の抗Ａｒａｈ２モノクローナル抗体（ｍＡｂ）Ｂ７０１に対する結合の減少を示した。図３Ａは、Ａｒａｈ２変異体の発現（ｘ軸）及びｍＡｂＢ７０１ａに対する結合（ｙ軸）に基づくＡｒａｈ２飽和ライブラリのＦＡＣＳソーティングを示す。

【図３Ｂ】図３Ｂは、ｌｏｇ２（ｆＢ７０１＿Ｓ２＿ｌｏｗ／ｆｓ１）で表されるＳ２ｌｏｗ－Ｂ７０１結合集団におけるライブラリ点変異体の濃縮比を示す。ここで、ｆＢ７０１＿Ｓ２＿ｌｏｗは、ソートされたライブラリにおける所与の変異の割合であり、ｆｓ１は、Ｓ１ライブラリにおけるその割合である。色付けは、白色（枯渇）から青色（濃縮、点変異がｍＡｂ結合の減少をもたらすことを示す）までである。位置番号（Ｘ軸）は、配列番号１に基づく。

【図４Ａ】図４Ａ及び図４Ｂ：Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体は、それぞれ抗Ａｒａｈ１及び抗Ａｒａｈ２のｍＡｂ、Ｂ５３６、及びＢ８４３に対する結合の減少を示した。抗ＡｒａｈｍＡｂ濃度の増加による間接ＥＬＩＳＡ滴定を用いて、野生型（ＷＴ）Ａｒａｈ２または修飾Ａｒａｈ２変異体（図４Ａ）、及び、ＷＴＡｒａｈ１または修飾Ａｒａｈ１変異体（図４Ｂ）に対する結合を試験した。

【図４Ｂ】提示されたデータは、修飾Ａｒａｈ１変異体及び修飾Ａｒａｈ２変異体が、血清由来の抗Ａｒａｈ２　ｍＡｂ　Ｂ５３６（図４Ａ）または抗Ａｒａｈ１　ｍＡｂ　Ｂ８４３（図４Ｂ）に対する結合を劇的に減少させることを示す。ＥＬＩＳＡアッセイ分析法により、抗Ａｒａｈ２　Ｂ５３６ｍＡｂ（図４Ａ）または抗Ａｒａｈ１　Ｂ８４３（図４Ｂ）の濃度増加に対するＷＴＡｒａｈ２ポリペプチド（配列番号２）または修飾Ａｒａｈ２変異体ポリペプチドの結合を測定した。ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を陰性対照として用いた。

【図５Ａ】図５Ａ及び図５Ｂ：線形エピトープマッピング及び脱エピトープ化により、Ａｒａｈ２エピトープに対する結合を消失させる変異を明らかにした。図５Ａ：患者Ｐ７０の線形エピトープマッピングにより、Ａｒａｈ１、Ａｒａｈ２、Ａｒａｈ３、及びＡｒａｈ対するＩｇＥ結合を明らかにした。黒枠は、Ａｒａｈ２にマッピングされたエピトープＬ３（配列番号３の４２～５６位に由来するペプチド）を強調している。

【図５Ｂ】図５Ｂ：患者のＰ７０Ａｒａｈ２エピトープの線形脱エピトープ化。黒枠は、図５Ａと同じペプチドを強調している。ボックスは、点変異がＬ３に対する結合を劇的に減少させた箇所を強調している。

【図６Ａ】図６Ａ及び図６Ｂ：修飾されたＡｒａｈ２変異体及び飾Ａｒａｈ１変異体は、活性化能の低下を示す。図６Ａ及び図６Ｂは、修飾されたＡｒａｈ２変異体（図６Ａ）及びＡｒａｈ１変異体（図６Ｂ）が好塩基球の活性化の低下を示すデータを提示する。

【図６Ｂ】ラット好塩基球性白血病（ＲＢＬ）ＳＸ－３８細胞脱顆粒アッセイの代表的な結果であり、ＷＴ（黒色）または修飾（灰色）Ａｒａｈ２変異体のいずれかに対する血清ＩｇＥ媒介細胞応答を試験した。Ｓ７０、Ｓ１２９、Ａ１８２、Ｂ１９２、Ｗ１１、Ｓ９５、Ｓ１０１、及びＥ２８２の８つの患者血清の結果を示す。

【図７Ａ】図７Ａ及び図７Ｂ：修飾されたＡｒａｈ２変異体は、天然Ａｒａｈ２と比較して、ヒト好塩基球の活性化能を劇的に低下させる。図７Ａ及び図７Ｂは、修飾されたＡｒａｈ２変異体が好塩基球の活性化を劇的に低下させることを示す２つの異なるピーナッツ

アレルギー患者血液サンプルからのデータを提示する。
【図７Ｂ】好塩基球活性化試験（ＢＡＴ）の代表的結果であり、ＷＴ（ｎＡｒａｈ２及びｒＡｒａｈ２）、または、修飾された組換えＡｒａｈ２変異体Ｂ７６４（配列番号１１）及びＢ１００１（配列番号１０）のいずれかに対する血清ＩｇＥ媒介細胞応答を試験した。Ａｒａｈ２はピーナッツから抽出された天然Ａｒａｈ２、ｒＡｒａｈ２は組換えＡｒａｈ２。以下に記載されるＥＣ５０値は、３パラメータ関数により導出した（記載されていない場合、反応性が低すぎて値を導き出すことができなかった）。
【図８Ａ】図８Ａ及び図８Ｂ：組換えＷＴ及び修飾Ａｒａｈ２変異体によるアレルギー患者由来末梢血Ｔヘルパー細胞の活性化。図８Ａ及び図８Ｂは、ＷＴ及び代表的な修飾Ａｒａｈ２変異体（Ｂ７６４及びＢ１００１）によるアレルギー患者由来末梢血Ｔヘルパー細胞の活性化を示す（図８Ａは患者ＳＨ４０９、図８Ｂは患者Ｂ２９３）。代表的な結果を示した。
【図８Ｂ】細胞を「Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ」増殖色素で染色し、様々なアレルゲン（ＷＴまたは変異体）で活性化するか、または活性化しないままにし（未処理の）、７日間インキュベートした。細胞を採取し、生存及びＴヘルパー細胞マーカーについて染色し、生きている増殖Ｔヘルパー細胞を単離した（ＣＤ３＋、ＣＤ４＋、生存色素－、増殖色素－ｄｉｍ）。グラフは、投与ごとのＴヘルパー細胞の増殖％の平均及びＳＥを示す。
【図９Ａ】図９Ａ～図９Ｆ：修飾Ａｒａｈ２変異体は高い熱安定性を維持する。組換えＡｒａｈ２ＷＴ（Ａｒａｈ２＿Ｂ１２３）及び突然変異体（Ａｒａｈ２＿Ｂ７６４及びＡｒａｈ２＿Ｂ１００１）の円偏光二色性（ＣＤ）分析を示す。図９Ａ（ＷＴ）は、２５°ＣにおけるＷＴ及び変異体のＣＤスペクトルを示し、ＷＴと比較して変異体の類似した二次構造組成を示す。
【図９Ｂ】図９Ｂ（Ａｒａｈ２＿Ｂ７６４）は、２５°ＣにおけるＷＴ及び変異体のＣＤスペクトルを示し、ＷＴと比較して変異体の類似した二次構造組成を示す。
【図９Ｃ】図９Ｃ（Ａｒａｈ２＿Ｂ１００１）は、２５°ＣにおけるＷＴ及び変異体のＣＤスペクトルを示し、ＷＴと比較して変異体の類似した二次構造組成を示す。
【図９Ｄ】図９Ｄ（ＷＴ）は、２０～９０°Ｃの温度範囲におけるＡｒａｈ２ＷＴ及び変異体の安定性を示し、９０°Ｃを超える高い熱融解温度（ＴＭ）を示し、少なくともＷＴにおいて予想されるように、天然折り畳みからの有意な逸脱がないことを示唆している。
【図９Ｅ】図９Ｅ（Ａｒａｈ２＿Ｂ７６４）は、２０～９０°Ｃの温度範囲におけるＡｒａｈ２ＷＴ及び変異体の安定性を示し、９０°Ｃを超える高い熱融解温度（ＴＭ）を示し、少なくともＷＴにおいて予想されるように、天然折り畳みからの有意な逸脱がないことを示唆している。
【図９Ｆ】図９Ｆ（Ａｒａｈ２＿Ｂ１００１）は、２０～９０°Ｃの温度範囲におけるＡｒａｈ２ＷＴ及び変異体の安定性を示し、９０°Ｃを超える高い熱融解温度（ＴＭ）を示し、少なくともＷＴにおいて予想されるように、天然折り畳みからの有意な逸脱がないことを示唆している（Lehmann, K., et al., (2006). Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. The Biochemical journal, 395(3), 463-472）。
【図１０】図１０：トランスフェクト細胞からのアレルゲンの発現及び分泌。ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１の野生型または脱エピトープ化変異体をコードするベクターで、哺乳類細胞をトランスフェクトした。分泌されたアレルゲンタンパク質を精製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって特性化した。（パネルａ）野生型Ａｒａｈ２、（パネルｂ）野生型Ａｒａｈ１、（パネルｃ）脱エピトープＡｒａｈ２、（パネルｄ）Ａｒａｈ１の２つの脱エピトープ化変異体。
【図１１】図１１：アレルギー患者の血清中のＩｇＥに対する結合。Ａｒａｈ１をＨＥＫ２９３細胞から発現及び分泌させ、精製し、アレルギー患者血清または対照の非アレルギー血清に対して結合させた後、ＩｇＥに対する結合について分析した。結合を、天然Ａｒａｈ１（ｎＡｒａ１）、組換え大腸菌由来野生型Ａｒａｈ１（ｒＡｒａｈ１）、及び組換えＨＥＫ２９３細胞由来野生型Ａｒａｈ１（ＨＥＫＡｒａｈ１）と比較した。

【図１２】図１２：抗Ａｒａｈ２モノクローナル抗体に対する結合。ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ２をＨＥＫ２９３細胞から発現及び分泌させ、精製した。十分に特性化した抗Ａｒａｈ２モノクローナルＩｇＧ抗体に対する結合をアッセイし、組換えＡｒａｈ２（ｒＡｒａｈ２）とＨＥＫ由来Ａｒａｈ２（ＨＥＫＡｒａｈ２野生型）の間で比較した。６種類のＩｇＧ（ｍＡｂ１～６）を用いて結合特性を示した。ＨＥＫ２９３細胞培地を陰性対照として用いた。

【図１３】図１３は、トランスフェクトされた哺乳類細胞から発現させた精製Ａｒａｈ１のＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラムトレースを示し、正確な三量体状態を示している。

【図１４】図１４は、トランスフェクトされた哺乳類細胞から発現させたＡｒａｈ２の全質量測定を示し、１８９６６．８Ｄａの質量を示している。これは、酸化的に折り畳まれたＡｒａｈ２の４つのジスルフィド結合に対応する配列の予想質量：８Ｄａである。

【図１５】図１５は、アレルゲン脱エピトープ化のための患者サンプルに基づくパイプラインの概要を示す。

【図１６Ａ】図１６Ａ～１６Ｃは、Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１の生化学的特徴を示す。図１６Ａ：ウエスタンブロット法によるＡｒａｈ２Ｂ１００１の同定。タンパク質を無染色ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ローディング対照としてＵＶ（左側ペイン）で画像化した。次に、タンパク質をＰＶＤＦ膜に移し、市販のポリクローナル抗体抗Ａｒａｈ２を用いて検出した（右側ペイン）。レーン：１は天然Ａｒａｈ２；２は組換えＷＴＡｒａｈ２；３はＢ１００１Ａｒａｈ２変異体；４は組換えＡｒａｈ１（ピーナッツ陰性対照）；５はＢＳＡ（一般陰性対照）。

【図１６Ｂ】図１６Ｂ：サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）：分子サイズ及びオリゴマー状態の推定のためのＨＰＬＣ分析。精製した天然Ａｒａｈ２（上側ペイン）、組換えＷＴＡｒａｈ２（真ん中のペイン）、及びＡｒａｈ２変異体Ｂ１００１（下側ペイン）をＳＥＣ－ＨＰＬＣで分析し、クロマトグラムを示した。保持時間（ＲＴ）及び推定Ｍｗは、ペイン内に示した。

【図１６Ｃ】図１６Ｃ：ＷＴＡｒａｈ２及びＢ１００１変異体の円偏光二色性（ＣＤ）分析。左側パネルは、２５°ＣにおけるＷＴＡｒａｈ２及びＢ１００１のＣＤスペクトルを示す。右側ペインは、２０～９０°Ｃの温度範囲でのＣＤスペクトルを示し、二次構造の安定性が示されている（曲線°Ｃは凡例に記された色で示されている）。

【図１７】図１７は、Ｂ１００１に対する患者血漿の結合の減少が、ＩｇＥとＩｇＧとで異なることを示す。ＥＬＩＳＡアッセイを、Ａｒａｈ２またはＢ１００１でコーティングしたプレート上で実施した。２４人のピーナッツアレルギー患者からの血漿サンプルを連続希釈し、プレート上でインキュベートして、各アレルゲンに対する患者のＩｇＥまたはＩｇＧの結合を検出した。滴定曲線を導出し、曲線下面積（ＡＵＣ）値の算出に用いた。図１７（Ａ）：Ａｒａｈ２またはＢ１００１に対する患者のＩｇＥまたはＩｇＧの相対的結合を示す。この図は、ＡＵＣの中央値及び範囲を示す。ウィルコクソン順位和検定のＰ値を記した。図１７（Ｂ）：変異体の結合の減少を表すために、Ｂ１００１／Ａｒａｈ２のＡＵＣ比を計算した。この図は、個々のＡＵＣ比を示し、ＩｇＥとＩｇＧとの比は、患者ごとのペアを細い線で示し、グループの中央値を太い線で示した。ウィルコクソン順位和検定のＰ値を記した。

【図１８Ａ】図１８Ａ及び図１８Ｂは、Ｂ１００１のアレルゲン性が天然Ａｒａｈ２と比較して著しく低下したことを示す。図１８Ａ：ＲＢＬＳＸ－３８アッセイ。細胞を患者血漿と一晩インキュベートし、洗浄し、その後、Ｔｙｒｏｄｅ緩衝液中の濃度を増加させて注目のタンパク質とインキュベートした。次いで、緩衝液を別のプレートに移し、顆粒酵素β－ヘキソサミニダーゼの比色基質とインキュベートした。ＯＤを４５０ｎｍで測定し、未処理ウェルのＯＤを差し引き、溶解ウェルのＯＤで割ることにより、正味脱顆粒を計算した。反応は二連で行った。プロットは、２８人の患者の平均±Ｓ．Ｅを示す。

【図１８Ｂ】図１８Ｂ：ＢＡＴアッセイ。新鮮な患者血液を、利用可能な血液量に応じてアレルゲン濃度を変化させながら、１～１０，０００ｎｇ／ｍｌの範囲をカバーする少なくとも６つの濃度で誘導した。サンプルを３０分間インキュベートし、染色し、洗浄し、

固定し、フローサイトメトリーにより分析した。プロットは、ベースラインを差し引いた各濃度の平均値±Ｓ．Ｅを示し、１８～４４人の患者を表している。ＥＣ５０値は、得られた曲線を４パラメータロジスティック回帰モデルにフィッティングさせて導出した。

【図１９Ａ】図１９Ａ及び図１９Ｂは、Ｂ１００１がピーナッツアレルギー患者の末梢血Ｔ細胞に対する部分的な免疫原性を保持していることを示す。ピーナッツアレルギー患者の血液からＰＢＭＣを分離し、Ｃｅｌｌｔｒａｃｅバイオレット増殖染料で染色し、ＤＭＳＯ単独、あるいは、Ａｒａｈ２またはＢ１００１（４～８複製／処理、２～２．５×10^5個の細胞／ウェル）の全配列をカバーするＤＭＳＯ溶解ペプチドプールと７日間インキュベートした。その後、培地を除去し、サイトカイン分泌分析のために保存するとともに、細胞をＴｈ同定のために染色し、増殖を検出するためにフローサイトメトリーにより分析した。ＩＬ－５、ＩＬ－１３、及びＩＦＮ－γ分泌を検出するために、培地をサンドイッチＥＬＩＳＡにより分析した。データは、［Ｓ．Ｉ＞２＋Ｍ．Ｗｐ値＜０．１］のＷＴＡｒａｈ２応答を有する試験からのみ収集した。図１９Ａ：平均値±Ｓ．Ｅを示すグラフであり、左上はサンプル数を示し、バーの上に、ウィルコクソン順位和検定による一対比較のｐ値を示す。

【図１９Ｂ】図１９Ｂ：Ｂ１００１全体の反応性の推定値を示す。少なくとも１回の試験でＭ．Ｗｐ値＜０．１の反応を示した場合、そのサンプルはＢ１００１反応性と見なした。４つの試験のうちの少なくとも３つでの試験で反応性が認められ、大部分の試験でＢ１００１対Ａｒａｈ２のＭ．Ｗｐ値が＞０．２であった場合、そのサンプルはＢ１００１及びＡｒａｈ２に対して同等の反応性を有すると推定した。

【図２０Ａ】図２０Ａ及び図２０Ｂは、Ｂ１００１がＡｒａｈ２と比較して安全性が著しく改善され、マウスアレルギーモデルにおいてピーナッツ抽出物と同等の免疫治療効果を有すること示す。Ｃ３Ｈ／ＨｅＪマウスをピーナッツ抽出物（ＰＥ）及びコレラ毒素を用いて経口感作した。図２０Ａ：マウスに、３０μｇの天然Ａｒａｈ２またはＢ１００１を腹腔内投与した。翌日、前日にＢ１００１を投与したマウスを２つのサブグループに無作為に分け、Ａｒａｈ２またはＢ１００１を２倍の高用量で再投与した（最大で２４０μｇ）。上側ペイン：投与から１２０分後のアナフィラキシースコア。グラフは、グラフは、個々の値及び平均値±Ｓ．Ｅ．を示し、マン・ホイットニー検定の有意性は上記の通りである。下側ペイン：投与後、記載の各時間に体温を測定した。平均値±標準偏差を示す。

【図２０Ｂ】図２０Ｂ：感作マウスに対して、ピーナッツ粉抽出物（ＰＥ）、Ｂ１００１、またはＰＢＳ（シャム）による経口免疫療法を実施した。上側ペイン：３５μｇの天然Ａｒａｈ２の投与から１２０分後のアナフィラキシースコア。グラフは、グラフは、個々の値及び平均値±Ｓ．Ｅ．を示し、マン・ホイットニー検定の有意性は上記の通りである。下側ペイン：各マウスから腸間膜リンパ節細胞を単離し、９６ウェルに播種し、２００μｇ／ｍｌの天然Ａｒａｈ２と共に７２時間インキュベートした。培地中のサイトカインレベルは、ＰｒｏｃａｒｔａＰｌｅｘ　Ｌｕｍｉｎｅｘパネルアッセイを用いて測定した。平均値±Ｓ．Ｅを示し、マン・ホイットニー検定の有意性は上記の通りである（ｎ：対照は３例、シャムは４例、ＰＥは６例、Ｂ１００は１５例）。

【図２１】図２１は、Ａｒａｈ１ＷＴ及びＰＬＰ５９５（Ｃ１５９）（配列番号１５６）のＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析を示す。天然Ａｒａｈ１、組換えＷＴＡｒａ１、及びＡｒａｈ１ＰＬＰ５９５のクロマトグラムを示す。保持時間及び推定Ｍ．Ｗ．を示した。すべてのタンパク質が同様の保持時間、及び、三量体の折畳みに適合する約２００ｋＤａの推定Ｍ．Ｗ．を有する。

【図２２Ａ】図２２Ａ及び図２２Ｂは、Ａｒａｈ１及びＰＬＰ５９５（Ｃ１５９）変異体の円二色性（ＣＤ）を用いた二次構造の評価を示す。図２２Ａ：ＷＴＡｒａｈ１（破線）及びＰＬＰ５９５Ａｒａ１（実線）の正規化ＣＤスペクトルは、両方とも２°Ｃで同様のＣＤシグネチャを示した。

【図２２Ｂ】図２２Ｂ：組換えＷＴ（円形）及びＰＬＰ５９５（三角形）の２０～９０°Ｃにおける２０５ｎｍの楕円率を正規化したＣＤ信号を示す。両方のＡｒａｈ１変異体は、８５°Ｃ超で二次構造安定性を示す。

【図２３】図２３は、質量測光法を用いた、Ａｒａｈ１及びＰＬＰ５９５（Ｃ１５９）変異体の分子量分析の結果を示す。組換えＡｒａｈ１ＷＴ及びＰＬＰ５９５（Ｃ１５９）タンパク質の正規化カウント測定値のオーバーレイヒストグラムである。この結果は、三量体折り畳みの形成を支持する（各単量体の予想質量は６３ｋＤａ）。

【図２４Ａ】図２４Ａ及び図２４Ｂは、ＲＢＬＳＸ－３８脱顆粒アッセイを用いた３つの異なるＡｒａｈ１変異体のアレルゲン性の比較を示す。ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、アレルギー患者の血漿または血清で１８時間感作した。その後、細胞を、野生型（ＷＴ）Ａｒａｈ１、Ｃｏｍｂｏ５７（ＰＬＰ２４３）、Ｃｏｍｂｏ６８（Ｂ１３０５）、またはＣｏｍｂｏ１５９（ＰＬＰ５９５）で、５μｇ／ｍｌ～０．５ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で１時間処理した。β－ヘキソサミニダーゼ活性アッセイを用いて、脱顆粒を測定した。個々の患者について、曲線下面積（ＡＵＣ）値を抽出した（それぞれドットで表す）。図２４Ａ：Ａｒａｈ１反応患者１３例の反応性を、Ｃｏｍｂｏ５７及びＣｏｍｂｏ６８と比較した。

【図２４Ｂ】図２４Ｂ：Ａｒａｈ１反応性患者４７例の反応性を、Ｃｏｍｂｏ５７及びＣｏｍｂｏ１５９と比較した。Ｃｏｍｂｏ１５９は、Ｃｏｍｂｏ５７及びＣｏｍｂｏ６８と比較してアレルゲン性が低下し、７０％以上の患者が反応性を示さなかった。Ｃｏｍｂｏ１５９のＡＵＣの中央値（１．７）は、ＷＴＡｒａｈ１（５６．３）と比較して９７％低下した。

【図２５Ａ】図２５Ａ及び図２５Ｂは、ＲＢＬＳＸ－３８脱顆粒アッセイを用いた、様々なＡｒａｈ１変異体のアレルゲン性の評価を示す。ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、アレルギー患者の血漿または血清で１８時間感作した。その後、細胞を、野生型（ＷＴ）Ａｒａｈ１、ＫＬＨ（陰性対照として）、Ｃｏｍｂｏ５１（Ｂ１２９１）、Ｃｏｍｂｏ５２（Ｂ１２９２）、Ｃｏｍｂｏ７４（Ｂ１３０９）、Ｃｏｍｂｏ７５（Ｂ１３０４）、またはＣｏｍｂｏ１１６（ＰＬＰ４９９）で、５μｇ／ｍｌ～０．０５ｎｇ／ｍｌまたは０．５ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で１時間処理した。β－ヘキソサミニダーゼ活性アッセイを用いて、脱顆粒を測定した。図２５Ａ：Ｃｏｍｂｏ５１及びＣｏｍｂｏ５２で試験した２つの血清の例。

【図２５Ｂ】図２５Ｂ：Ｃｏｍｂｏ７４で試験した２つの血清の例。

【図２６Ａ】図２６Ａ及び図２６Ｂは、ＲＢＬＳＸ－３８脱顆粒アッセイを用いた、様々なＡｒａｈ１変異体のアレルゲン性の評価を示す。ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、アレルギー患者の血漿または血清で１８時間感作した。その後、細胞を、野生型（ＷＴ）Ａｒａｈ１、ＫＬＨ（陰性対照として）、Ｃｏｍｂｏ５１、Ｃｏｍｂｏ５２、Ｃｏｍｂｏ７４、Ｃｏｍｂｏ７５、またはＣｏｍｂｏ１１６で、５μｇ／ｍｌ～０．０５ｎｇ／ｍｌまたは０．５ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で１時間処理した。β－ヘキソサミニダーゼ活性アッセイを用いて、脱顆粒を測定した。図２６Ａ：Ｃｏｍｂｏ７５で試験した２つの血清の例。

【図２６Ｂ】図２６Ｂ：Ｃｏｍｂｏ１１６で試験した２つの血清の例。

【図２７】図２７は、Ｃ１５９（ＰＬＰ５９５）のアレルゲン性が、天然Ａｒａｈ１と比較して著しく低下したことを示す。結果は、ＢＡＴアッセイから得られた。新鮮な患者血液を、６，６００～０．０６ｎｇ／ｍｌの範囲の１１種類のアレルゲン濃度で誘導した（ｌｏｇ３段階希釈）。その後、サンプルを３０分間インキュベートし、染色し、洗浄し、固定し、フローサイトメトリーにより分析した。プロットは、ベースラインを差し引いた各濃度の平均値及びＳ．Ｅ．を示し、１９人の患者を表している。得られた曲線を４パラメータロジスティック回帰モデルにフィッティングさせて得られたＥＣ５０値は、Ｃ１５９は、集団レベルで１０００倍以上反応性が低下したことを示唆する。

【図２８】図２８は、ＨＥＫ２９３細胞で発現したＤＥＡｒａｈ２１００１のバック・トゥ・コンセンサス変異体の例を示す。変異体１～２３を２連でトランスフェクトした。培地上清を、還元または非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した（それぞれ左側パネルまたは右側パネル）。黒色の矢印は、Ａｒａｈ２ダブルバンドを示す。発現レベルを、発現の乏しいＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１と比較した（すべてのゲルで右端のレーン）。高発現変異体をアレルゲン性について分析し、次の最適化ラウンドのために選択した。この場合、番号２及び番号４として示される変異体である（配列番号２０８及び配列番号２０９

）。

【図２９】図２９は、各アッセイの曲線下面積を示すＲＢＬ活性化アッセイ（ｎ＝１８）の要約を示す。アッセイでは、１分子あたり２つのアレルゲンを提示する二量体を説明するために、０．１ｎｇ／ｍｌ～１０μｇ／ｍｌで測定したＦｃ融合を除き、０．０５ｎｇ／ｍｌ～５μｇ／ｍｌで様々なタンパク質に対する反応性を測定した。天然Ａｒａｈ２（ｎＡｒａｈ２）、脱エピトープ化Ａｒａｈｈ２１００１［配列番号１６８］、Ａｒａｈ２＿ｃｏｎｂｏ３１［配列番号２４７］、及び１００１－ＦｃＩｇＧ４融合［配列番号２０７］（ＤＥ　Ａｒａｈ　２１００１、ＤＥ　Ａｒａｈ２　ｖａｒ.３１、ＤＥ　Ａｒａｈ２－Ｆｃ　ＩｇＧ４と表記）を比較した結果を示す。左側パネルは、操作されたＡｒａｈ２構築物間の微妙な違いを強調するために、同じ結果を拡大して示す。すべての脱エピトープ化バージョンは、ｎＡｒａｈ２と比較して著しく減少したものの、試験した１つの血清（Ｒ５６７）に対してわずかな反応を示した。

【図３０】図３０は、脱エピトープ化Ａｒａｈ２－１００１［配列番号１６８］と脱エピトープ化Ａｒａｈ２－Ｆｃ融合体［配列番号２０２］との、ＨＥＫ２９３発現レベルの比較を示す。構築物を、ＨＥＫ２９３細胞に二連でトランスフェクトし、培地上清を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（左側）及びウエスタンブロットによって分析し、抗ＤＥＡｒａｈ２抗体（右側）によって検出した。各サンプルを、還元しなかった、または、β－メルカプトエタノール（β－ＭＥ）で還元した。Ｆｃへの融合は、脱エピトープ化Ａｒａｈ２－１００１の分泌レベルを劇的に増加させた。サンプルの還元は、ウエスタンブロットによる検出を妨げた。

【図３１】図３１は、分泌された脱エピトープ化Ａｒａｈ２－１００１と比較した、脱エピトープ化Ａｒａｈ２の膜貫通融合の発現を示す。ＨＥＫ２９３細胞を、分泌された脱エピトープ化１００１－ＴＭ　Ａｒａｈ２［配列番号２４８］、または、１００１構築物のグリコシル化欠損変異体（ＧＭ１００１－ＴＭ）［配列番号２４９］のいずれかでトランスフェクトし、両方ともＨＬＡ－ＡのＴＭドメインに融合させた。細胞を溶解し、遠心分離によって、可溶性画分と膜画分とに分離した。分離した画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（左図）によって、非還元条件下、または、β－メルカプトエタノール（β－ＭＥ）を添加した還元条件下で分析した。同じゲルのウエスタンブロット（右側パネル）を用いて、脱エピトープ化Ａｒａｈ２の存在及び細胞部位を検出した。膜画分シグナルは、可溶性画分と比較して約４倍高かった。脱エピトープ化Ａｒａｈ２に対応する信号を、黒色の矢印で示す。１００１の部分的なグリコシル化（上矢印で示した約３０ｋＤａのバンド）は、このタンパク質の分泌バージョンで観察され、抗原が細胞外空間に配向して起こると予想される。脱エピトープ化抗原の存在と、それが細胞外表面上に配向していることが、免疫組織化学によって確認された（図示せず）。

【図３２】図３２は、ＤＮＡ送達後にモニターされた様々な構築物に対するＢ細胞応答を示す。ナイーブ（未処置）マウスに対して、様々な潜在的ｍＲＮＡ治療構築物をコードする発現プラスミドを注射した。マウスに週３回注射し、初回投与から２１日目に出血させた（各群ｎ＝５）。アレルゲン特異的抗体を、ＥＬＩＳＡにより検出した。ここに示した値は、ＫＬＨ陰性対照から差し引いたものである。０時点（初回ＤＮＡ注入前）では、抗体は検出されなかった。上側パネル：野生型及び脱エピトープ化Ａｒａｈ１構築物の平均ＩｇＧ力価。下側パネル：野生型及び脱エピトープ化Ａｒａｈ２の平均ＩｇＧ力価。Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ１由来の構築物は、脱エピトープ化Ａｒａｈ２構築物と比較して顕著に免疫原性が高かった。野生型Ａｒａｈ２及びＤＥＡｒａｈ２－１００１をコードする構築物に応答して抗体は検出されず、１００１は追加のタンパク質ドメインに融合されなかった（図示せず）。

【図３３】図３３は、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム上での塩勾配によるピーナッツ抽出物の分離を示す。クロマトグラムは、移動相体積（ｍＬ）に対して２８０ｎｍ（左軸）で吸光度単位（ＡＵ）として表される様々なピーナッツタンパク質の溶出パターンを示す。直線は、分離に使用される塩リザーバーの割合を示す。クロマトグラム上の黒色の縦線で区切られた領域は、Ａｒａｈタンパク質が溶出した画分である（各領域の上に示されてい

る）。
【図３４】図３４は、図３３の溶出画分のクマシー染色を用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。異なるＡｒａｈタンパク質は矢印で示し、分子量は左側に示した。図３３のクロマトグラムと図３４のゲルとの間に引かれた点線は、４つの主要なピーナッツアレルゲン（Ａｒａｈ１、Ａｒａｈ２、Ａｒａｈ３、Ａｒａｈ６）のそれぞれが溶出した領域を表す。
【図３５】図３５は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ＳＥＣカラム上のｎＡｒａｈ２の典型的な溶出パターンを示す。
【図３６】図３６は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ＳＥＣカラム上のｎＡｒａｈ２のＳＤＳ－ＰＡＧＥパターンを示す。Ａｒａｈ２はデュプレット（duplet）として溶出した。
【図３７】図３７は、５μｇのピーナッツタンパク質（ＳＬＩＴ５μｇ）または５０μｇのピーナッツタンパク質（ＳＬＩＴ５０μｇ）を舌下投与したマウス、または、５００μｇのピーナッツタンパク質（ＯＩＴ５００μｇ）を経口投与したマウスにおける体温低下により測定した過敏反応を示す。ＳＬ／ＯＩＴ処置なしは、ピーナッツタンパク質を舌下投与または経口投与しなかったマウスを示す。
【図３８Ａ】図３８Ａ及び図３８Ｂは、Ｔ細胞活性化アッセイによって検出された、Ａｒａｈ１変異体Ｃ１５９（配列番号１５６）がピーナッツアレルギー患者由来の末梢血Ｔ細胞に対する部分的な免疫原性を保持していることを示している。ＰＢＭＣは、ピーナッツアレルギー患者の血液から単離し、Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ増殖色素で染色し、ＰＢＳ、組換えＷＴＡｒａｈ１またはＡｒａｈ１変異体Ｃ１５９（４～８複製／処理、２～２．５×１０５細胞／ウェル）のいずれかで７日間インキュベートした。培地を除去し、後の分析のために保存し、細胞をＴｈ同定のために染色し、増殖を検出するためにフローサイトメトリーにより分析した。培地をサンドイッチＥＬＩＳＡで分析し、ＩＬ－５、ＩＬ－１３、及びＩＦＮ－γの分泌を検出した。データは、ＷＴＡｒａｈ１応答が［Ｓ．Ｉ＞２　＋　マン・ホイットニーｐ値＜０．１］であった試験からのみ収集した。図３８Ａ：平均値±Ｓ．Ｅを示すグラフであり、左上はサンプル数を示し、バーの上に、ウィルコクソン順位和検定による一対比較のｐ値を示す。
【図３８Ｂ】図３８Ｂ：Ｃ１５９全体の反応性の推定値を示す。少なくとも１回の試験でＭ．Ｗｐ値＜０．１の反応を示した場合、そのサンプルはＣ１５９反応性と見なした。４つの試験のうちの少なくとも３つでの反応性が認められ、大部分の試験でＣ１５９対Ａｒａｈ１のＭ．Ｗｐ値が＞０．２であった場合、そのサンプルはＣ１５９及びＡｒａｈ１に対して同等の反応性を有すると推定した。
【図３９Ａ】図３９Ａ及び図３９Ｂは、Ｃ１５９に対する患者血漿の結合の減少が、ＩｇＥとＩｇＧとで異なることを示す。ＥＬＩＳＡアッセイを、Ａｒａｈ１またはＡｒａｈ１変異体Ｃ１５９でコーティングしたプレート上で実施した。２４人のピーナッツアレルギー患者からの血漿サンプルを連続希釈し、プレート上でインキュベートして、各アレルゲンに対する患者のＩｇＥまたはＩｇＧ結合を検出した。滴定曲線を導出し、曲線下面積（ＡＵＣ）値の算出に用いた。図３９Ａ：Ａｒａｈ１またはＣ１５９に対する患者ＩｇＥまたはＩｇＧの相対的結合を示す。この図は、ＡＵＣの中央値と範囲を示す。ウィルコクソン順位和検定のＰ値をバーの上に記し、Ａｒａｈ１／Ｃ１５９の中央値の比を各グラフの下に記した。
【図３９Ｂ】図３９Ｂ：変異体の結合の低下を表すために、Ｃ１５９／Ａｒａｈ１のＡＵＣ比を計算した。この図は、個々のＡＵＣ比を示し、ＩｇＥとＩｇＧとの比は、患者ごとのペアを細い線で示し、グループの中央値を太い線で示した。ウィルコクソン順位和検定のＰ値を記した。
【００２７】
図示の簡略化及び明確化のために、図示されている要素は必ずしも一定の縮尺で描かれていないことを理解されたい。例えば、いくつかの要素の寸法は、明確化のために、他の要素と比較して誇張されている場合がある。さらに、適切と考えられる場合には、対応する要素または類似する要素を示すために、参照番号が図面間で繰り返し使用される。
【発明を実施するための形態】

【００２８】
以下の詳細な説明では、本開示の組換えＡｒａｈ１アレルゲン変異体及び組換えＡｒａｈ２アレルゲン変異体、並びにその使用を完全に理解するために、多数の具体的な詳細が記載されている。しかしながら、本開示の組換えＡｒａｈ１アレルゲン変異体及び組換えＡｒａｈ２アレルゲン変異体、並びにそれらの使用は、以下に記載された具体的な詳細がなくても実施ができることは、当業者には理解されるであろう。他の例では、よく知られた方法、手順、及び構成要素は、本開示の組換えＡｒａｈ１アレルゲン変異体及び組換えＡｒａｈ２アレルゲン変異体、並びにそれらの使用を不明瞭にしないように、詳細には記載されていない。

【００２９】
いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体及び組換えＡｒａｈ２変異体は、エピトープマッピングプロセス中に収集されたデータに基づいて変異させた。変異部位は、その変異単独で、または追加の変異と組み合わされて、抗Ａｒａｈ１抗体または抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される１以上のエピトープを変化または破壊する可能性に基づいて選択された。Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体のアレルゲン性を、ピーナッツアレルギー患者サンプルを用いたラット好塩基球白血病（ＲＢＬ）または好塩基球活性化試験（ＢＡＴ）細胞ベースの免疫学的アッセイによって評価した。所望の免疫原性、すなわち、遺伝子組換えＡｒａｈ１またはＡｒａｈ２が、マスト細胞／好塩基球媒介アレルギー反応を誘発することなく免疫系の応答を誘発する能力を、Ｔ細胞活性化アッセイによって測定した。

【００３０】
当業者であれば、「エピトープ」という用語は、すべて同じ意味及び性質を有する「抗原決定基」という用語と互換的に使用することができ、免疫グロブリンまたは抗体（あるいはその抗原結合断片）が特異的に結合する抗原上の部位を包含することを理解するであろう。エピトープは、タンパク質の三次折畳みによって並置される連続アミノ酸及び非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープ（線状エピトープ）は通常、変性溶媒に曝露しても保持されるが、三次折畳みによって形成されたエピトープ（立体配座エピトープ）は通常、変性溶媒で処理すると消失する。エピトープは、一般的には、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個のアミノ酸を固有の空間立体配座で含む。いくつかの実施形態では、エピトープは、免疫原性を維持しながら、可能な限り小さい。免疫原性は、本明細書に記載されるように、免疫応答を誘発する能力、例えば、ＭＨＣクラスＩＩ分子と結合してＴ細胞応答を誘導する能力によって示され、例えば、Ｔ細胞サイトカイン産生を測定することによって示される。

【００３１】
本明細書で使用するとき、「脱エピトープ化ポリペプチドＸ」とは、抗ポリペプチドＸ抗体によって認識される１以上のエピトープにおける変異により、（それに対応する野生型に対する抗体結合と比較して）抗ポリペプチドＸ抗体との結合が減少または消失した修飾ポリペプチドＸを指す。

【００３２】
本明細書で使用するとき、「脱エピトープ化Ａｒａｈ１アレルゲン」とは、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される１以上のエピトープでの変異により、（それに対応する野生型Ａｒａｈ１に対する抗体結合と比較して）抗Ａｒａｈ１抗体との結合が減少または消失した修飾Ａｒａｈ１アレルゲンを指す。一実施形態では、脱エピトープ化Ａｒａｈ１アレルゲンは、それの野生型対応物と比較してアレルゲン性が低下する。

【００３３】
本明細書で使用するとき、「脱エピトープ化Ａｒａｈ２アレルゲン」とは、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される１以上のエピトープでの変異により、（それに対応する野生型Ａｒａｈ２に対する抗体結合と比較して）抗Ａｒａｈ２抗体との結合が減少または消失した修飾Ａｒａｈ２アレルゲンを指す。一実施形態では、脱エピトープ化Ａｒａｈ２アレル

ゲンは、それの野生型対応物と比較して、アレルゲン性が低下する。

【００３４】

本明細書で使用するとき、「エピトープ」とは、抗体またはその抗原結合断片によって結合される高分子の部分を指す（例えば、Ａｒａｈ１アレルゲンまたは Ａｒａｈ２アレルゲン）。タンパク質配列には、抗体が結合するアミノ酸の直鎖配列である連続エピトープと、タンパク質が特定の立体配座に折り畳まれたときにのみ存在する不連続エピトープとがある。

【００３５】

本明細書で使用するとき、「アレルゲン」とは、アレルギーまたは特異的過敏症を誘発する可能性のある物質、タンパク質、または非タンパク質を指す。

【００３６】

本明細書で使用するとき、「アレルゲン性」または「アレルギー性」とは、抗原またはアレルゲンが、過剰反応であり、防御／予防効果をもたらさず、その代わりに生理学的機能障害または組織損傷を引き起こすという点で正常な免疫反応とは異なる、異常な免疫反応を誘導する能力を指す。

【００３７】

本明細書で使用するとき、「低アレルゲン性」とは、アレルギー反応を引き起こす可能性が少ないかまたはほとんどない物質を指す。

【００３８】

いくつかの実施形態では、本開示は、抗ピーナッツアレルゲン抗体によって結合される１以上のエピトープを減少または消失させるように変異されたピーナッツアレルゲン（例えば、Ａｒａｈ１、Ａｒａｈ２）変異体を提供する。一実施形態では、変異は、ピーナッツアレルゲンの生物物理的特性及び／または機能的特性に対して影響を与えない。一態様における変異は、置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。例えば、欠失は、抗体結合に重要な単一のアミノ酸の除去、または、マッピングされたエピトープ領域全体の除去を含む。

【００３９】

アミノ酸の側鎖は６種類に分類されている：クラスＩ（Ｃｙｓ）；クラスＩＩ（Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｌａ、Ｇｌｙ）；クラスＩＩＩ（Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ）；クラスＩＶ（Ｈｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ）；クラスＶ（Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ）；及び、クラスＶＩ（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ）。加えて、変異構造体におけるＰｒｏを置換してもよい。保存的アミノ酸置換とは、或るクラスのアミノ酸を同じクラスのアミノ酸で置換することを指す。例えば、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕなどの別のクラスＩＩＩ残基に対するＡｓｐの置換は、保存的置換である。非保存的アミノ酸置換とは、或るクラスのアミノ酸を別のクラスのアミノ酸で置換することを指す；例えば、クラスＩＩ残基であるＡｌａを、Ａｓｐ、Ａｓｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎなどのクラスの残基で置換することである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列レベルでの置換変異の方法は、当技術分野でよく知られている。

【００４０】

本明細書で使用するとき、「修飾」または「組換え」という用語は、抗体またはその抗原結合部分における１以上のアミノ酸を変化させることを指す。この変化は、１以上の位置でアミノ酸を付加、置換、または欠失することによってもたらすことができる。また、この変化は、ＰＣＲ変異誘発などの既知の技術を用いてもたらすことができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法を用いて同定された抗体またはその抗原結合部分を修飾することによって、ピーナッツアレルゲンに対する抗体またはその抗原結合部分の結合親和性を修飾することができる。

【００４１】

Ａｒａｈ１変異体

【００４２】

一実施形態では、本開示によれば、配列番号６５に記載の配列に対して少なくとも５０

％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【００４３】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。一実施形態では、置換変異は、位置１９４における、Ｄである。一実施形態では、置換変異は、位置１９５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２１３における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置２１５における、Ｒ、Ｄ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置２３１における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２３４における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置２４５における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２６７における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置２８７における、Ｄである。一実施形態では、置換変異は、位置２９４における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置３１２における、ＡまたはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置３３１における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置４１９における、Ｅ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置４２２における、ＲまたはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置４４３における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４５５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４６２における、Ａ、Ｋ、またはＴである。一実施形態では、置換変異は、位置４６３における、Ｓである。一実施形態では、置換変異は、位置４６４における、ＡまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置４８０における、Ｑである。一実施形態では、置換変異は、位置４９４における、Ａ、Ｅ、またはＮである。一実施形態では、置換変異は、位置５００における、Ｋである。

【００４４】

当業者であれば、同一性のパーセント（％）が、クエリー配列が標的配列にどれだけ類似しているか（すなわち、各配列中に同一のアミノ酸がいくつあるか）を示す数値を提供することを理解するであろう。同一性のパーセントが高いほど、一致度は高くなる。

【００４５】

ポリペプチド（またはタンパク質）配列に関連して使用する場合、「同一性」という用語は、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）配列またはその断片間の同一性の程度を指す。一般的に、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）配列間の類似度は、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）の２以上のアミノ酸の組成、順序、または配列の類似度を指す。

【００４６】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、デフォルトパラメータを使用してアメリカ国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定したときに、本開示のポリペプチドまたはその一部に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、または少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００４７】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、欠失、挿入、またはアミノ酸置換変異を包含し得る。一実施形態では、変異体ポリペプチドは、保

存的置換、または本明細書に記載された目的のポリペプチドの三次元構造を著しく変化させない欠失、挿入、または置換を含む。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、本開示の目的のポリペプチドの機能を変化させない。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、免疫系の応答を誘導してピーナッツアレルゲンに対する減感作を生じさせる能力を変化させない。

【００４８】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、または２２個の置換変異を含む。

【００４９】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置１２、２４、２７、３０、４２、５７、５８、７３、及び５２３のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、置換変異は、位置１２における、ＫまたはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置２４における、ＶまたはＥである。一実施形態では、置換変異は、位置２７における、ＡまたはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置３０における、ＥまたはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置４２における、ＬまたはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置５７における、ＤまたはＬである。一実施形態では、置換変異は、位置５８における、ＳまたはＲである。一実施形態では、置換変異は、位置７３における、ＡまたはＭである。一実施形態では、置換変異は、位置５２３における、ＡまたはＫである。上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置８７、８８、９６、９９、１９６、１９７、２００、２０９、２３８、２４９、２６０、２６１、２６３、２６５、２６６、２７８、２８３、２８８、２９０、２９５、３１８、３２２、３３４、３３６、３７８、４１７、４２１、４４１、４４３、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、及び４９１のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、置換変異は、位置８７における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置８８における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置９６における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置９９における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置１９６における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置１９７における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２００における、Ｖ、Ａ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置２０９における、Ｓである。一実施形態では、置換変異は、位置２３８における、Ｑである。一実施形態では、置換変異は、位置２４９における、Ｎである。一実施形態では、置換変異は、位置２６０における、Ｋである。一実施形態では、置換変異は、位置２６１における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２６３における、ＫまたはＬである。一実施形態では、置換変異は、位置２６５における、Ｓである。一実施形態では、置換変異は、位置２６６における、ＲまたはＬである。一実施形態では、置換変異は、位置２７８における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２８３における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置２８８における、Ｑである。一実施形態では、置換変異は、位置２９０における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２９５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置３１８における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置３２２における、ＡまたはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置３３４における、Ｄ、Ａ、またはＮである。一実施形態では、置換変異は、位置３３６における、ＲまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置３７

８における、ＫまたはＥである。一実施形態では、置換変異は、位置４１７における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置４２１における、ＥまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置４４１における、Ｎである。一実施形態では、置換変異は、位置４４３における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４８１における、ＡまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置４８４における、Ｒ、Ｓ、Ａ、またはＭである。一実施形態では、置換変異は、位置４８５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４８７における、ＳまたはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置４８８における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４９１における、Ａ、Ｓ、またはＥである。

【００５０】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置８４において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、置換変異をさらに含む。一実施形態では、置換変異は、位置８４におけるＡである。

【００５１】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置１２、２４、２７、３０、４２、５２、５７、５８、７３、８４、８７、８８、９６、９９、１９４、１９５、１９６、１９７、２００、２０９、２１３、２１５、２３１、２３４、２３８、２４５、２４９、２６０、２６１、２６３、２６５、２６６、２６７、２７８、２８３、２８７、２８８、２９０、２９４、２９５、３１２、３１８、３２２、３３１、３３４、３３６、３７８、４１７、４１９、４２１、４２２、４４１、４４３、４４５、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、４９１、４９４、５００、及び５２３のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、または６８個の置換変異を含む。

【００５２】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６５に記載の配列に対して、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、または９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００５３】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６７の位置１２、２４、２７、３０、４２、５２、５７、５８、７３、８４、８７、８８、９６、９９、１９４－１９７、２００、２０９、２１３、２１５、２３１、２３４、２３８、２４５、２４９、２６０、２６１、２６３、２６５、２６６、２６７、２７８、２８３、２８７、２８８、２９０、２９４、２９５、３１２、３１８、３２２、３３１、３３４、３３６、３７８、４１７、４１９、４２１、４２２、４４１、４４３、４４５、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、４９１、４９４、５００、及び５２３のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。

【００５４】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％

の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００５５】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、変異体によって誘導される好塩基球脱顆粒放出は、Ａｒａｈ１野生型ポリペプチドによって誘導される場合と比較して、少なくとも３倍低い。

【００５６】

上記の組換えＡｒａｈ１変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ１変異体は、Ａｒａｈ１野生型ポリペプチドと比較して、結合ＥＣ５０またはＫＤが５０％以上減少する。

【００５７】

Ａｒａｈ２変異体

【００５８】

一実施形態では、本開示によれば、配列番号３に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【００５９】

一実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む。一実施形態では、置換変異は、位置１２における、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｄ、Ｔ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、Ｃ、Ｋ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１５における、Ｒ、Ｅ、Ｋ、Ｙ、Ｗ、Ｆ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１６における、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｑ、Ｔ、Ｍ、Ｐ、Ｃ、Ｅ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置２２における、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｑ、Ｅ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｃ、Ｒ、またはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置２４における、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｌ、Ｉ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｆ、Ｐ、Ａ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置４６における、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、Ａ、Ｇ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｒ、Ｐ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、またはＣである。一実施形態では、置換変異は、位置５３における、Ｔ、Ｓ、Ｑ、Ｖ、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｐ、Ｍ、Ｌ、Ｉ、Ｅ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｎ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置６５における、Ｔ、Ａ、Ｎ、Ｄ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｗ、Ｐ、Ｇ、Ｃ、またはＥである。一実施形態では、置換変異は、位置８０における、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｃ、Ｅ、Ｋ、Ｒ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置８３における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｉ、Ｐ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置８６における、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｒ、Ｅ、Ｃ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置８７における、Ｆ、Ｙ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ａ、Ｓ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｎ、Ｅ、またはＰである。一実施形態では、置換変異は、位置９０における、Ｓ、Ｐ、Ｑ、またはＲである。一実施形態では、置換変異は、位置１０４における、Ｌ、Ｍ、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置１１５における、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ａ、Ｉ、Ｗ、Ｆ、Ｙ、またはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置１２３における、Ｉ、Ｑ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１２７における、Ｈ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、Ｙ、Ｑ、またはＶである。一実施形態では、置換変異は、位置１４０における、Ｇ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、またはＶであ

る。
【００６０】
いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、デフォルトパラメータを使用してアメリカ国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定したときに、本開示のポリペプチドまたはその一部に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、または少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００６１】
いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、欠失、挿入、またはアミノ酸置換変異を包含し得る。一実施形態では、変異体ポリペプチドは、保存的置換、または本明細書に記載された目的のポリペプチドの三次元構造を著しく変化させない欠失、挿入、または置換を含む。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、本開示の目的のポリペプチドの機能を変化させない。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、免疫系の応答を誘導してピーナッツアレルゲンに対する減感作を生じさせる能力を変化させない。
【００６２】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個の置換変異を含む。
【００６３】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、配列番号４の位置１２～１６におけるアミノ酸は、配列番号５に記載の配列を含む。
【００６４】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、配列番号４の位置４４～６５におけるアミノ酸は、配列番号６に記載の配列を含む。
【００６５】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、配列番号４の位置４４～６７におけるアミノ酸は、配列番号９に記載の配列を含む。
【００６６】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、配列番号４の位置１１～９０におけるアミノ酸は、配列番号７または配列番号８に記載の配列を含む。
【００６７】
上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号４の位置２８、４４、４８、５１、５５、６３、６７、１０７、１０８、１０９、１２４、１２５、及び１４２のうちの１以上において、配列番号における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、置換変異は、位置２８における、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｎ、Ａ、Ｐ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｅ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置４４における、Ｉ、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｋ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｍ、または、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置４８における、Ｖ、Ｇ、Ｃ、Ｅ、Ｈ、Ｑ、Ｆ、Ｋ、Ｌ、Ｉ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置５１における、Ｓ、Ｇ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｔ、Ｄ、またはＶである。一実施形態では、置換変異は、位置５５における、Ｇ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｑ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｒ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置６３における、Ｐ、Ｃ、Ｆ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｑ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、またはＲである。一実施形態では、置換変異は、位

置６７における、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｐ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置１０７における、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｑ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹである。一実施形態では、置換変異は、位置１０８における、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｇ、Ａ、Ｑ、またはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置１０９における、Ｋ、Ｃ、Ｓ、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｙ、Ｗ、Ｌ、またはＩである。一実施形態では、置換変異は、位置１２４における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ、Ｌ、Ｅ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置１２５における、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、Ｙ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｔ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１４２における、Ｍ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹである。

【００６８】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、２８、４４、４６、４８、５１、５３、５５、６３、６５、６７、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１０７、１０８、１０９、１１５、１２３、１２４、１２５、１２７、１４０、または１４２のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、または３１個の置換変異を含む。

【００６９】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体の一実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含み、配列番号４の位置４４、４８、５１、５５、６３、及び６７のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換変異を含む。

【００７０】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号３に記載の配列に対して、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、または９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００７１】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号４の位置６、１１－２８、３２、３９、４４－５６、５８、６０、６３、６９、８０－８７、８９－９０、９２、９６－９７、９９、１００、１０２－１０５、１０７－１１９、１２３、１２５、１２７－１３１、１３３、１３４、１３６－１４４、１４６、及び１４８－１５３のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。

【００７２】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００７３】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、変異体によって誘導される好塩基球脱顆粒放出は、Ａｒａｈ２野生型ポリペプチドによって誘導される場合と比較して、少なくとも１０倍低い。

【００７４】

上記の組換えＡｒａｈ２変異体のいくつかの実施形態では、組換えＡｒａｈ２変異体は、Ａｒａｈ２野生型ポリペプチドと比較して、結合ＥＣ５０またはＫＤが５０％以上減少する。

【００７５】
ヌクレオチド、ベクター、宿主細胞
【００７６】
本明細書で使用するとき、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、または「核酸分子」という用語は、ＤＮＡ分子及びＲＮＡ分子または修飾ＲＮＡ分子を含むことを意図している。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、ｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、修飾ｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、修飾ｍＲＮＡを含み、修飾ｍＲＮＡは、５´キャップされたｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、修飾ｍＲＮＡは、ヌクレオシドの一部が天然に修飾ヌクレオシドまたは合成ヌクレオシドのいずれかによって置換された分子を含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、修飾ｍＲＮＡを含み、修飾ｍＲＮＡは、５´キャップされたｍＲＮＡを含み、ヌクレオシドの一部が天然修飾ヌクレオシドまたは合成ヌクレオシドのいずれかによって置換されている。
【００７７】
本明細書で使用するとき、「単離されたヌクレオチド」または「単離された核酸分子」という用語は、本開示のピーナッツアレルゲン変異体（例えば、Ａｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体）をコードする核酸であって、ヌクレオチド配列が、ゲノムＤＮＡ中の核酸に自然に隣接する他のゲノムヌクレオチド配列を本質的に含まない核酸を指す。
【００７８】
本開示の一態様は、本開示のピーナッツアレルゲン変異体（例えば、Ａｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体）をコードするヌクレオチドまたは核酸配列である。
【００７９】
本明細書で使用するとき、「ベクター」という用語は、発現または複製のために細胞に異種核酸を導入するのに使用される個別の要素を指す。発現ベクターは、そのような核酸の発現に影響を及ぼすことができるプロモーター領域などの調節配列と作動可能に連結された核酸を発現することができるベクターを含む。したがって、発現ベクターは、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、または適切な宿主細胞に導入されると核酸の発現をもたらす他のベクターなどのＤＮＡまたはＲＮＡ構築物を指すことがある。適切な発現ベクターは、当業者にはよく知られており、例えば、原核細胞及び／または真核細胞で複製可能なもの、エピソームのままであるもの、または宿主細胞ゲノムに組み込まれるものを含む。
【００８０】
本開示の一態様は、本開示のピーナッツアレルゲン変異体（例えば、Ａｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体）をコードする核酸構築物を含む発現ベクターである。
【００８１】
本明細書で使用するとき、「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、組換え発現ベクターが導入された細胞を指す。この用語は、或る特定の細胞だけでなく、その細胞の子孫を指すことを意図していることを理解されたい。突然変異または環境の影響のいずれかに起因して、或る種の改変が後代で起こる可能性があるため、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。
【００８２】
本開示の一態様は、本開示のピーナッツアレルゲン変異体（例えば、Ａｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体）をコードする核酸構築物を担持する発現ベクターを含む宿主細胞である。一実施形態では、細胞または宿主細胞は、原核細胞または真核細胞である。一実施形態では、真核細胞は、酵母細胞、菌類細胞、藻類細胞、植物細胞、または哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、ピーナッツアレルゲン変異体は、大腸菌などの細菌において産生され得る。他のいくつかの実施形態では、ピーナッツアレルゲン変異体は、酵母または菌類、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae

）、アスペルギルス（Aspergillus）、トリコデルマ（Trichoderma）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）において産生され得る。

【００８３】

Ａｒａｈ１変異体をコードする核酸

【００８４】

一実施形態では、本開示は、配列番号６５に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする核酸または修飾核酸分子であって、組換えＡｒａｈ１変異体が、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、核酸または修飾核酸分子を提供する。

【００８５】

別の実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６５に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。

【００８６】

当業者であれば、同一性のパーセント（％）が、クエリー配列が標的配列にどれだけ類似しているか（すなわち、各配列中に同一のアミノ酸がいくつあるか）を示す数値を提供することを理解するであろう。同一性のパーセントが高いほど、一致度は高くなる。

【００８７】

ポリペプチド（またはタンパク質）配列に関連して使用する場合、「同一性」という用語は、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）配列またはその断片間の同一性の程度を指す。一般的に、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）配列間の類似度は、２以上のポリペプチド（またはタンパク質）の２以上のアミノ酸の組成、順序、または配列の類似度を指す。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、デフォルトパラメータを使用してアメリカ国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定したときに、本開示のポリペプチドまたはその一部に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、または少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドは、欠失、挿入、またはアミノ酸置換変異を包含し得る。一実施形態では、変異体ポリペプチドは、保存的置換、または本明細書に記載された目的のポリペプチドの三次元構造を著しく変化させない欠失、挿入、または置換を含む。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、本開示の目的のポリペプチドの機能を変化させない。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、免疫系の応答を誘導してピーナッツアレルゲンに対する減感作を生じさせる能力を変化させない。

【００９０】

一実施形態では、核酸または修飾核酸は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡである。一実施形態では、ｍＲＮＡは、ＵＴＲ、リーダー配列、または、ＵＴＲ及びリーダー配列の両方を含む。一実施形態では、ＵＴＲは、天然のＵＴＲ配列よりも優れており、全体的により高いタンパク質発現を促進することができるキメラまたは新規配列を含む。

【００９１】

一実施形態では、ｍＲＮＡは、（ｉ）配列番号１６２または１６３に記載の配列を有するＵＴＲ、及び、（ｉｉ）配列番号１８５、１８７、１８９、または１９１に記載の配列を有するリーダー配列を含む。

【００９２】
一実施形態では、ｍＲＮＡは、最適化された配列を含む。本明細書で使用するとき、「最適化された配列」は、インビトロ転写（ＩＶＴ）及び酵素的キャッピングのための好ましい特性を維持しながら、非改変配列と比較して、ヒト細胞においてより高い発現レベルを促進する、コンピュータ的に改変されたヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡ配列を包含する。
【００９３】
一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体、または、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。
【００９４】
一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１７３に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１７５に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１７７に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１７９に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１８１に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１８３に記載のヌクレオチド配列を含む。
【００９５】
一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドであって、配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、組換えＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする。一実施形態では、置換変異は、位置１９４における、Ｄである。一実施形態では、置換変異は、位置１９５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２１３における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置２１５における、Ｒ、Ｄ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置２３１における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２３４における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置２４５における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２６７における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置２８７における、Ｄである。一実施形態では、置換変異は、位置２９４における、Ｅである。一実施形態では、置換変異は、位置３１２における、ＡまたはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置３３１における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置４１９における、Ｅ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置４２２における、ＲまたはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置４４３における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４５５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４６２における、Ａ、Ｋ、またはＴである。一実施形態では、置換変異は、位置４６３における、Ｓである。一実施形態では、置換変異は、位置４６４における、ＡまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置４８０における、Ｑである。一実施形態では、置換変異は、位置４９４における、Ａ、Ｅ、またはＮである。一実施形態では、置換変異は、位置５００における、Ｋである。
【００９６】
一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、配列番号６７の位置１９４、１９５、２１３、２１５、２３１、２３４、２４５、２６７、２８７、２９４、３１２、３３１、４１

９、４２２、４４３、４５５、４６２、４６３、４６４、４８０、４９４、及び５００のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、または２２個の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。

【００９７】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、上記の置換変異に加えて、配列番号６７の位置２４、２７、及び３０のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。一実施形態では、置換変異は、位置２４における、Ｖである。一実施形態では、置換変異は、位置２７における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置３０における、Ｅである。

【００９８】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、上記の置換変異に加えて、配列番号６７の位置８７、８８、９６、９９、１９６、１９７、２０９、２８８、２９０、２９５、３２２、３３４、３３６、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、及び４９１のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換変異をさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。一実施形態では、置換変異は、位置８７における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置８８における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置９６における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置９９における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置１９６における、Ｈである。一実施形態では、置換変異は、位置１９７における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置２０９における、Ｓである。一実施形態では、置換変異は、位置２８８における、Ｑである。一実施形態では、置換変異は、位置２９０における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置２９５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置３２２における、ＡまたはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置３３４における、ＤまたはＮである。一実施形態では、置換変異は、位置３３６における、Ｒである。一実施形態では、置換変異は、位置４８１における、ＡまたはＳである。一実施形態では、置換変異は、位置４８４における、Ｒ、Ｓ、Ａ、またはＭである。一実施形態では、置換変異は、位置４８５における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４８７における、ＳまたはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置４８８における、Ａである。一実施形態では、置換変異は、位置４９１における、ＡまたはＥである。

【００９９】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、上記の置換変異に加えて、配列番号６７の位置８４において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換変異をさらに含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。一実施形態では、置換変異は、位置８４におけるＡである。

【０１００】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、配列番号６７の位置２４、２７、３０、８４、８７、８８、９６、９９、１９４、１９５、１９６、１９７、２０９、２１３、２１５、２８７、２８８、２９０、２９４、２９５、３２２、３３１、３３４、３３６、４１９、４２２、４５５、４６２、４６４、４８０、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、４９１、及び４９４のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、

２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、または４５個の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。

【０１０１】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６５に記載の配列に対して、少なくとも７０％、７５％、または８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。

【０１０２】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ１変異体であって、配列番号６７の位置２４、２７、３０、８４、８７、８８、９６、９９、１９４－１９７、２００、２０９、２１３、２１５、２６３、２６７、２７１、２８７、２８８、２９０、２９４、２９５、３２２、３３１、３３４、３３６、３７８、４１７、４１９、４２１、４２２、４３９、４５５、４６２－４６４、４６８、４８０、４８１、４８４、４８５、４８７、４８８、４９１、４９４、５００、及び５０２のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ１変異体をコードする。

【０１０３】

Ａｒａｈ２変異体をコードする核酸

【０１０４】

一実施形態では、本開示は、配列番号３に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする核酸または修飾核酸分子であって、組換えＡｒａｈ２変異体が、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上の置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む、核酸または修飾核酸分子を提供する。

【０１０５】

別の実施形態では、核酸または修飾核酸分子は、配列番号３に記載の配列に対して少なくとも５０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される少なくとも２つのエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含む組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１０６】

当業者であれば、上記のような同一性のパーセント（％）は容易に理解できるであろう。いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、デフォルトパラメータを使用してアメリカ国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定したときに、本開示のポリペプチドまたはその一部に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、または少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドは、欠失、挿入、またはアミノ酸置換変異を包含し得る。一実施形態では、変異体ポリペプチドは、保存的置換、または本明細書に記載された目的のポリペプチドの三次元構造を著しく変化させない欠失、挿入、または置換を含む。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、本開示の目的のポリペプチドの機能を変化させない。いくつかの実施形態では、欠失、挿入、または置換は、免疫系の応答を誘導してピーナッツアレルゲンに対する減感作を生じさせる能力を変化させない。

【０１０８】

一実施形態では、核酸または修飾核酸は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡである。一実施形態では、ｍＲＮＡは、ＵＴＲ、リーダー配列、または、ＵＴＲ及びリーダー配列の両方を含む。一実施形態では、ＵＴＲは、天然のＵＴＲ配列よりも優れており、全体的により高いタ

ンパク質発現を促進することができるキメラまたは新規配列を含む。
【０１０９】
一実施形態では、ｍＲＮＡは、（ｉ）配列番号１６２または１６３に記載の配列を有するＵＴＲ、及び、（ｉｉ）配列番号１８５、１８７、１８９、または１９１に記載の配列を有するリーダー配列を含む。
【０１１０】
一実施形態では、ｍＲＮＡは、最適化された配列を含む。本明細書で使用するとき、「最適化された配列」は、インビトロ転写（ＩＶＴ）及び酵素的キャッピングのための好ましい特性を維持しながら、非改変配列と比較して、ヒト細胞においてより高い発現レベルを促進する、コンピュータ的に改変されたヌクレオチド配列を含むｍＲＮＡ配列を包含する。
【０１１１】
一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体、または、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。
【０１１２】
一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１６７に記載のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸は、配列番号１６９に記載のヌクレオチド配列を含む。
【０１１３】
一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、置換変異を含む組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。一実施形態では、置換変異は、位置１２における、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｄ、Ｔ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、Ｃ、Ｋ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１５における、Ｒ、Ｅ、Ｋ、Ｙ、Ｗ、Ｆ、Ｍ、Ｉ、Ｖ、Ｃ、Ｄ、Ｇ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１６における、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｑ、Ｔ、Ｍ、Ｐ、Ｃ、Ｅ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置２２における、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｑ、Ｅ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｃ、Ｒ、またはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置２４における、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｌ、Ｉ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｆ、Ｐ、Ａ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置４６における、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、Ａ、Ｇ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｒ、Ｐ、Ｍ、Ｉ、Ｌ、またはＣである。一実施形態では、置換変異は、位置５３における、Ｔ、Ｓ、Ｑ、Ｖ、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｐ、Ｍ、Ｌ、Ｉ、Ｅ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｎ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置６５における、Ｔ、Ａ、Ｎ、Ｄ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｗ、Ｐ、Ｇ、Ｃ、またはＥである。一実施形態では、置換変異は、位置８０における、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｃ、Ｅ、Ｋ、Ｒ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置８３における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｉ、Ｐ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、Ｙ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置８６における、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｒ、Ｅ、Ｃ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置８７における、Ｆ、Ｙ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｖ、Ａ、Ｓ、Ｑ、Ｒ、Ｋ、Ｄ、Ｎ、Ｅ、またはＰである。一実施形態では、置換変異は、位置９０における、Ｓ、Ｐ、Ｑ、またはＲである。一実施形態では、置換変異は、位置１０４における、Ｌ、Ｍ、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置１１５における、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｌ、Ｋ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ａ、Ｉ、Ｗ、Ｆ、Ｙ、またはＨである。一実施形態では、置換変異は、位置１２３における、Ｉ、

Ｑ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１２７における、Ｈ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｗ、Ｙ、Ｑ、またはＶである。一実施形態では、置換変異は、位置１４０における、Ｇ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、またはＶである。

【０１１４】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、配列番号４の位置１２、１５、１６、２２、２４、４６、５３、６５、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１１５、１２３、１２７、及び１４０のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする。

【０１１５】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、配列番号４の位置１２～１６のアミノ酸が配列番号５に記載の配列を含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１１６】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、配列番号４の位置４４～６５のアミノ酸が配列番号６に記載の配列を含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１１７】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、配列番号４の位置４４～６７のアミノ酸が配列番号９に記載の配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１１８】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、配列番号４の位置１１～９０のアミノ酸が配列番号７または配列番号８に記載の配列を含む、Ａｒａｈ２変異体をコードする。

【０１１９】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、上記の置換変異に加えて、配列番号４の位置２８、４４、４８、５１、５５、６３、６７、１０７、１０８、１０９、１２４、１２５、及び１４２のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、追加の置換変異をさらに含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。一実施形態では、置換変異は、位置２８における、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｎ、Ａ、Ｐ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｒ、Ｋ、Ｅ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置４４における、Ｉ、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｈ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｋ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｍ、またはＲである。一実施形態では、置換変異は、位置４８における、Ｖ、Ｇ、Ｃ、Ｅ、Ｈ、Ｑ、Ｆ、Ｋ、Ｌ、Ｉ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ａ、またはＤである。一実施形態では、置換変異は、位置５１における、Ｓ、Ｇ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｅ、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｔ、Ｄ、またはＶである。一実施形態では、置換変異は、位置５５における、Ｇ、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｙ、Ｈ、Ｑ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｒ、Ｋ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、またはＷである。一実施形態では、置換変異は、位置６３における、Ｐ、Ｃ、Ｆ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、Ｙ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｑ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、またはＲである。一実施形態では、置換変異は、位置６７における、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｆ、Ｗ、Ｍ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、Ｓ、Ａ、Ｐ、またはＧである。一実施形態では、置換変異は、位置１０７における、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｑ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹである。一実施形態では、置換変異は、位置１０８における、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｈ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｇ、Ａ、Ｑ、またはＫである。一実施形態では、置換変異は、位置１０９における、Ｋ、Ｃ、Ｓ、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｙ、Ｗ、Ｌ、またはＩである。一実施形態では、置換変異は、位置１２４における、Ｄ、Ａ、Ｃ、Ｆ、Ｇ、Ｈ

、Ｉ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ、Ｌ、Ｅ、またはＱである。一実施形態では、置換変異は、位置１２５における、Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、Ｙ、Ｇ、Ｋ、Ｎ、Ｔ、Ｖ、またはＡである。一実施形態では、置換変異は、位置１４２における、Ｍ、Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹである。

【０１２０】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、配列番号４の１２、１５、１６、２２、２４、２８、４４、４６、４８、５１、５３、５５、６３、６５、６７、８０、８３、８６、８７、９０、１０４、１０７、１０８、１０９、１１５、１２３、１２４、１２５、１２７、１４０、及び１４２のうちの１以上において、配列番号６５における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、または３１個の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１２１】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体であって、配列番号４の位置４４、４８、５１、５５、６３、及び６７のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１２２】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号３に記載の配列に対して、少なくとも７０％、７５％、または８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１２３】

一実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む組換えＡｒａｈ２変異体ポリペプチドであって、配列番号４の位置６、１１－２８、３２、３９、４４－５６、５８、６０、６３、６９、８０－８７、８９－９０、９２、９６－９７、９９、１００、１０２－１０５、１０７－１１９、１２３、１２５、１２７－１３１、１３３、１３４、１３６－１４４、１４６、及び１４８－１５３のうちの１以上において、配列番号３における同じ位置のアミノ酸残基と比較して、１以上の置換変異を含む、組換えＡｒａｈ２変異体をコードする。

【０１２４】

製造方法

【０１２５】

いくつかの実施形態では、本開示の変異体ポリペプチドは、例えば、当技術分野でよく知られている、例えば、これに限定しないが、「Dondapati et al. (2020) BioDrugs 34(3):327-348」にレビューされた方法などの、無細胞のインビトロ翻訳系を用いて製造することができる。一実施形態では、本開示は、本開示のＡｒａｈ１変異体を含む低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンを製造する方法であって、上記の発現ベクターを含む細胞を、Ａｒａｈ１変異体を発現する条件下で培養するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、細胞は、原核細胞または真核細胞である。一実施形態では、真核生物細胞は、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、または哺乳類細胞である。

【０１２６】

一実施形態では、本開示は、本開示のＡｒａｈ２変異体を含む低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンを製造する方法であって、上記の発現ベクターを含む細胞を、Ａｒａｈ２変異体を発現する条件下で培養するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、細胞は、原核細胞または真核細胞である。一実施形態では、真核細胞は、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、または哺乳類細胞である。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、本開示の核酸または修飾核酸分子は、インビトロ転写系（Ｉ

ＶＴ）で転写され、転写された核酸または修飾核酸は、その後、遺伝子送達による免疫療法のために使用することができる。ＲＮＡの投与は、ピーナッツアレルゲンまたはピーナッツアレルゲン変異体のインビボ生産をもたらす。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、野生型（ＷＴ）ピーナッツアレルゲンをコードする。いくつかの実施形態では、核酸分子は、アレルゲンに対する抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含むピーナッツアレルゲン変異体をコードする。

【０１２９】

本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、ＷＴＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、ＷＴＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１７１または１７２に記載の配列から選択される。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、ＷＴＡｒａｈ２ポリペプチドをコードする。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、ＷＴＡｒａｈ２ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１６４または１６５に記載の配列から選択される。

【０１３０】

本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸変異を含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする修飾核酸を含む。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、Ａｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、または１８３のいずれかに記載の配列を含む。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、または２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする。

【０１３１】

本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一のエピトープ内に位置する１以上のアミノ酸変異を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする修飾核酸を含む。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、Ａｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１６７または１６９のいずれかに記載の配列を含む。本開示の製造方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、または２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする。

【０１３２】

化学合成、または、バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼなどの酵素的プロセスによるＲＮＡ分子の合成及びキャッピングは、ｍＲＮＡ生産のための当技術分野で確立された方法であり、例えば、「Elain T. Schenborn Methods in Molecular Biology, Vol. 37: In Vitro Transcript/on and Translation Protocols pages 1-12 DOI: 10.1385/0-89603-288-4:1」に記載されている。

【０１３３】

当業者であれば、他の既知のＩＶＴ系を用いて、本明細書に記載された核酸または修飾核酸分子を転写できることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ分子は、ＩＶＴ系を用いてインビトロで転写される。

【０１３４】

ピーナッツアレルゲン変異体、Ａｒａｈ１変異体、及びＡｒａ２変異体の生産は、転写されたｍＲＮＡが対象（患者）に投与されるインビボ翻訳を含み得る。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、本開示の核酸分子または修飾核酸分子は、ピーナッツアレルゲン変異体ポリペプチドをインビボで製造するために使用することができ、対象（患者）へのウイルス、非ウイルス、または物理的手段、例えば、リポソーム、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたはハイブリッド脂質ポリマー系、レトロウイルスまたはＤＮＡウイルス送達（例えば、レンチウイルス、フォアミウイルス、アデノウイルスなど）、超音波送達、エレクトロポレーション、流体力学的送達などによる、核酸または修飾核酸分子の投与を含む。いくつかの実施形態では、本開示の核酸分子は、ピーナッツアレルゲンＷＴポリペプチドをインビボで製造するために使用することができ、対象（患者）へのウイルス、非ウイルス、または物理的手段、例えば、リポソーム、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたはハイブリッド脂質ポリマー系、レトロウイルスまたはＤＮＡウイルス送達（例えば、レンチウイルス、フォアミウイルス、アデノウイルスなど）、超音波送達、エレクトロポレーション、流体力学的送達などによる、核酸分子の投与を含む。核酸分子、例えば、Ａｒａｈ１変異体またはＡｒａｈ２変異体をコードする本開示のｍＲＮＡ分子のインビボ投与方法は、当技術分野でよく知られており、これに限定しないが、例えば、「Jones et al., Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future. Mol. Pharmaceutics 2013, 10, 11, 4082-4098; Kamimura et al. Advances in Gene Delivery Systems. Pharmaceut Med. 25(5):293-306; and Nayerossadat et al., Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Adv Biomed Res 2012;1:27」に記載されている（この文献は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる）。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒト対象を含む。特定の実施形態では、ヒト対象は、赤ん坊、子供、青年、若年成人、または成熟した成人を含む。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、赤ん坊を含む。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、対象は、ピーナッツに対する減感作を誘導する必要がある対象を含む。いくつかの実施形態では、対象は、ピーナッツに対するアレルギーを有する。いくつかの実施形態では、対象は、他の食物アレルギーに罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーを発症する傾向がある。

【０１３８】

使用方法

【０１３９】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４０】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４１】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体の組み合わせを含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、アジュバントの使用を含む。本発明によれば、「アジュバント」とは、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。また、アジュバントは、抗原をゆっくりと放出する組織デポとしても機能し得る。アジュバントの例としては、これに限定しないが、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ－Ａ）、微結晶チロシン（ＭＣＴ）、リン酸カルシウム、完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバント、サポニン、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、レバミソール、ＣｐＧ－ＤＮＡ、油または炭化水素エマルジョン、及び、ＢＣＧ（カルメット－ゲラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルバムなどの潜在的に有用なアジュバントが挙げられる。いくつかの実施形態では、Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体は、ＭＣＴに吸着され、ＭＰＬ－Ａと共にまたはＭＰＬ－Ａなしで投与される。ＭＣＴ及びＭＰＬ－Ａは両方とも、アレルギー免疫療法の有効性を改善し、併用すると相乗効果を発揮すると考えられる。具体的には、アジュバントの投与により、必要な注射の数が低減し、用量が低減し、保護ＩｇＧ抗体の産生が促進される。加えて、ＭＣＴ吸着は、デポ効果、及び、タンパク質の徐放性放出に起因して、製品の安全性を向上させる。

【０１４３】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体をコードするヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体をコードするヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体の組み合わせをコードするヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド配列を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、上記の組成物は、ヌクレオチド配列を有する細菌を含む。一実施形態では、ヌクレオチド配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡの形態である。

【０１４４】

一実施形態では、上記の方法における組成物は、経口投与される。別の実施形態では、上記の方法における組成物は、皮下、筋肉内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、及び吸入から選択される経路によって投与される。一実施形態では、上記の方法おける対象は、幼児である。一実施形態では、上記の方法における組成物は、粉ミルク（ベビーミルク）またはベビーフードを含む。

【０１４５】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、組換えＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする核酸分子を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。いくつかの実施形態では、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法において使用される核酸分子は、ＷＴ組換えＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法において使用される核酸分子は、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含む変異組換えＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする核酸分子または修飾核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法において使用される核酸分子は、ＷＴ組換えＡｒａｈ２

ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法において使用される核酸分子は、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含む変異組換えＡｒａｈ２ポリペプチドをコードする核酸分子または修飾核酸分子を含む。

【０１４６】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体をコードする核酸または修飾核酸分子を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４７】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ２変異体をコードする核酸または修飾核酸分子を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４８】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、本開示の組換え低アレルゲン性Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異体の組み合わせをコードする核酸または修飾核酸分子を含む組成物を対象に投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。

【０１４９】

一実施形態では、上記の方法における組成物は、本開示の核酸または修飾核酸分子を有する細菌を含む。一実施形態では、核酸または修飾核酸分子は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡである。ＤＮＡまたはｍＲＮＡの例は上述したとおりである。

【０１５０】

ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、ＷＴＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、ＷＴＡｒａｈ１ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１７１または１７２のいずれかに記載の配列を含む。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、ＷＴＡｒａｈ２ポリペプチドをコードする。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、ＷＴＡｒａｈ２ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１６４または１６５のいずれかに記載の配列を含む。

【０１５１】

ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、抗Ａｒａｈ１抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする修飾核酸を含む。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、Ａｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１７３、１７５、１７７、１７９、１８１、または１８３のいずれかに記載の配列を含む。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８

４、１９３、１９４、または２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＡｒａｈ１変異体ポリペプチドをコードする。

【０１５２】

ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、抗Ａｒａｈ２抗体によって認識される単一エピトープ内に位置する１以上のアミノ酸置換変異を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする修飾核酸を含む。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、Ａｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号１６７または１６９のいずれかに記載の配列を含む。ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法のいくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、または２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＡｒａｈ２変異体ポリペプチドをコードする。

【０１５３】

一実施形態では、上記の方法における組成物は、経口投与される。別の実施形態では、上記の方法における組成物は、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内、舌下、局所、直腸、及び吸入から選択される経路によって投与される。一実施形態では、上記の方法おける対象は、幼児である。

【０１５４】

ピーナッツアレルゲンを用いた舌下免疫療法

【０１５５】

アレルギーの治療には、大きく分けて２つのアプローチがある。第１のアプローチは、薬物療法及び／または生物学的製剤によるアレルギー性炎症の軽減に基づくものである。第２のアプローチは、アレルゲン特異的な介入形態、すなわちアレルゲン特異的免疫療法（ＡＩＴ）に基づくものである。ＡＩＴの主な利点は、治療費が比較的安価であること、高品質のアレルゲンで実施すれば効果が高いこと、治療を２年以上実施すれば治療中止後も治療効果が長期間持続すること、及び、ＡＩＴには軽度から重度への症状の進行を防ぐ疾患修飾効果があることである。

【０１５６】

免疫療法では、アレルギーの原因となる物質を少量ずつ投与することにより、アレルゲンに対する「免疫力」すなわち耐性を高め、アレルギー症状を軽減することができる。下免疫療法（ＳＬＩＴ）は、アレルゲン抽出物の液滴または錠剤を、舌の下に置く免疫療法の一種である。多くの人は、この方法を「アレルギードロップ」と呼んでおり、アレルギー注射の代わりになる。ＳＬＩＴは、ヨーロッパでは長年用いられており、最近では米国でも関心が高まっている。

【０１５７】

米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されているアレルギードロップは数種類しかない。２０１４年には、イネ科植物またはブタクサアレルギーの治療薬として、錠剤の形をした３種類のＳＬＩＴ製品がＦＤＡによって承認された。さらに最近では、イエダニによるアレルギー性鼻炎及び結膜炎を治療するためのＳＬＩＴ製品がＦＤＡによって承認された。ＳＬＩＴは、ピーナッツアレルギーの潜在的治療法として研究されている。ＳＬＩＴにピーナッツ抽出物（ＰＥ）を使用することの主な欠点は、減感作を達成する上で経口免疫療法（ＯＩＴ）ほど効果がないことである。ＯＩＴで使用されるタンパク質の量は、ＳＬＩＴで使用されるタンパク質の量（１錠あたり２～４ｍｇの制限）と比べて、約１００～５００倍多い（１日あたり３００～１０００ｍｇ）。このような用量の差が、ピーナッツアレルギーの減感作を達成する上でＳＬＩＴが経口免疫療法ほど有効でない理由だと考えられる。

【０１５８】

分子アレルゲン特異的免疫療法（ＡＩＴ）には、次の（ｉ）～（ｉｖ）などのいくつかの形態がある。（ｉ）対応する天然アレルゲンのすべての特性に類似する野生型組換えアレルゲンの産生、（ｉｉ）ＩｇＥ反応性のないアレルゲン由来Ｔ細胞エピトープを含むペプチドの合成、（ｉｉｉ）アレルゲンをコードする核酸の使用、及び、（ｉｖ）大幅に低下したＩｇＥ結合能及びアレルゲン活性を示すが、それと同時に、アレルゲン特異的Ｔ細胞エピトープ（例えば、長鎖合成ペプチド、組換え低アレルゲン性アレルゲン誘導体）を含むか、または、アレルゲン特異的Ｔ細胞エピトープの代わりに、Ｔ細胞を助けるキャリア要素（例えば、ペプチドキャリアーに基づくＢ細胞エピトープ）を含む、組換え及び合成低アレルゲン性。

【０１５９】

本明細書で使用するとき、「アレルゲン性」または「アレルギー性」とは、抗原またはアレルゲンが、過剰反応であり、防御／予防効果をもたらさず、その代わりに生理学的機能障害または組織損傷を引き起こすという点で正常な免疫反応とは異なる、異常な免疫反応を誘導する能力を指す。

【０１６０】

ピーナッツ抽出物を用いたＳＬＩＴ法と、本開示のＳＬＩＴ法との重要な違いは、理論的に患者に与えることができるタンパク質の量である。舌下経路による免疫療法に適用されるタンパク質の量は、経口経路の場合のタンパク質の量よりも大幅に少ない（１０～１００倍少ない）ことがよく知られている。ピーナッツ抽出物は、脂質、炭水化物、及び様々なタンパク質から構成されており、これらは、ピーナッツ抽出物の正味重量の約２５％を占めるに過ぎない。したがって、ピーナッツ抽出物中の単一タンパク質の量は少ない（例えば、Ａｒａｈ２は、全タンパク質の６～９％しか占めない）。したがって、２～４ｍｇのピーナッツ抽出物のＳＬＩＴ錠は、Ａｒａｈ２を約６０μｇしか含まない。対照的に、３００ｍｇ～１０００ｍｇの範囲の経口投与されたピーナッツ抽出物には、Ａｒａｈ２は約４～１２ｍｇ含まれている。その結果、天然ピーナッツ抽出物を使用しても、十分な量（約０．１～１ｍｇ）のＡｒａｈ２を接種することはできない。

【０１６１】

本開示の方法は、組換え型の純粋タンパク質を使用することにより、この障害を回避する。一実施形態では、本開示の方法は、最大４ｍｇのピーナッツアレルゲン（例えば、ＱＤまたはＢＩＤレジメンにおけるＡｒａｈ１、Ａｒａｈ２、またはそれらの変形体）を送達することができ、それにより、ＳＬＩＴ錠剤中の特定のタンパク質の量を大幅に増加させ、独特の投与経路による安全性の問題がなく、はるかに優れた有効性を得ることができる。ピーナッツアレルゲンの量を増やせば効果が向上するという理解は些細なことではなく、今までに誰も試したことのない革新的なステップであると考えられる。一実施形態では、Ａｒａｈ１のためのＳＬＩＴの用量は、約０．２ｍｇから約４ｍｇである。一実施形態では、Ａｒａｈ２のためのＳＬＩＴの用量は、約０．１ｍｇから約４ｍｇである。

【０１６２】

ＳＬＩＴとＯＩＴ（経口免疫療法）とを比較した本明細書に記載のデータは、ＳＬＩＴはＯＩＴと同様の臨床アレルギー減感作効果を示すが、ピーナッツタンパク質が１０倍少ないことを示した。非感作マウスは、ピーナッツチャレンジに反応して強いアナフィラキシー体温低下を示すが、５００μｇのＡｒａｈ２を用いたＯＩＴ、または、５０μｇのＡｒａｈ２を用いたＳＬＩＴでは、このアナフィラキシー事象は防止された。

【０１６３】

本開示は、一例として、Ａｒａｈ２を用いた実験を提示する。当業者であれば、本明細書に記載された方法が、Ａｒａｈ１などの他のピーナッツアレルゲンにも同様に適用可能であることを容易に認識するであろう。

【０１６４】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１を含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象のピーナッツに対

する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーである。別の実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーのリスクがある。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、Ａｒａｈ１変異体は、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列、または、配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、もしくは２１１－２４６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は、錠剤である。一実施形態では、錠剤は、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１を含む。

【０１６５】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象のピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーである。別の実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーのリスクがある。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、Ａｒａｈ２変異体は、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、もしくは２４７－２４９のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも８０％同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は、錠剤である。一実施形態では、錠剤は、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む。

【０１６６】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１及び約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２の組み合わせを含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象のピーナッツに対する減感作を誘導する方法を提供する。一実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーである。別の実施形態では、対象は、ピーナッツアレルギーのリスクがある。一実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は錠剤である。一実施形態では、錠剤は、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む。

【０１６７】

一実施形態では、本開示は、ピーナッツに対してアレルギーを有する対象においてピーナッツに対する減感作を誘導する方法であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１を含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減する方法を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は、錠剤である。一実施形態では、錠剤は

、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１を含む。
【０１６８】
一実施形態では、本開示は、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減する方法であって、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減する方法を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は、錠剤である。一実施形態では、錠剤は、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む。
【０１６９】
一実施形態では、本開示は、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減する方法であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１及び約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２の組み合わせを含む組成物を対象に舌下投与するステップを含み、それによって、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減する方法を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、舌下投与される組成物は、錠剤である。一実施形態では、錠剤は、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む。
【０１７０】
別の実施形態では、本開示は、ピーナッツアレルギーの舌下免疫療法のための錠剤であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１を含む錠剤を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。
【０１７１】
別の実施形態では、本開示は、ピーナッツアレルギーの舌下免疫療法のための錠剤であって、約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２を含む錠剤を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。
【０１７２】
別の実施形態では、本開示は、ピーナッツアレルギーの舌下免疫療法のための錠剤であって、約０．２ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ１及び約０．１ｍｇ～約４ｍｇのＡｒａｈ２の組み合わせを含む錠剤を提供する。一実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている方法に従ってピーナッツから精製される。別の実施形態では、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２は、当技術分野で一般に知られている組換え技術によって製造される。一実施形態では、Ａｒａｈ１は、配列番号６４～６７のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、Ａｒａｈ２は、配列番号１～４のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む。
【０１７３】
一実施形態では、本開示は、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導するための上記の錠剤を提供する。一実施形態では、対象は、ピーナッツに対するアレルギーを有する。別の実施形態では、対象は。ピーナッツアレルギーのリスクがある。

【０１７４】
一実施形態では、本開示は、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減させるための上記した錠剤を提供する。
【０１７５】
別の実施形態では、本開示の組成物は、対象におけるピーナッツに対する減感作を誘導するため、または、対象におけるピーナッツに対するアレルギー反応を低減させるための核酸ワクチン組成物に配合することができる。
【０１７６】
本明細書で使用するとき、「核酸ワクチン」とは、アレルゲンまたはその誘導体（例えば、Ａｒａｈ１及び／またはＡｒａｈ２タンパク質またはポリペプチドの変異体）をコードする核酸または核酸分子（例えば、ポリヌクレオチド）を含むワクチンまたはワクチン組成物を指す。例示的な実施形態では、核酸ワクチンは、リボ核酸（「ＲＮＡ」）ポリヌクレオチド、リボ核酸（「ＲＮＡ」）、またはリボ核酸（「ＲＮＡ」）分子を含む。このような実施形態は、リボ核酸（「ＲＮＡ」）ワクチンと称することができる。いくつかの実施形態では、核酸ワクチンは、本明細書に記載されるようなメッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）ポリヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）、またはメッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）分子を含む。このような実施形態は、メッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）ワクチンと称することができる。このようなワクチンは、それが患者に投与される際に必要とされる、または有利な他の物質及び分子（例えば、医薬品賦形剤）を含んでいてもよい。
【０１７７】
一実施形態では、ＲＮＡワクチンは、アレルゲンをコードするＲＮＡ配列を含む。このＲＮＡ配列は、アレルゲンの配列であってもよいし、または、そのコドン使用に関して適合するものであってもよい。コドンの使用に適合させることにより、ＲＮＡの翻訳効果及び半減期を増加させることができる。一実施形態では、少なくとも３０個のアデノシン残基を含むポリＡテールが、ＲＮＡの半減期を増加させるために、ＲＮＡの３′末端に取り付けられる。一実施形態では、ＲＮＡの５′末端は、構造体ｍ７Ｇ（５′）ｐｐｐ（５′）Ｎ（キャップ０構造体）またはその誘導体を有する修飾リボヌクレオチドでキャップされ、これは、ＲＮＡ合成中に組み込むことができるか、または、Ｎ７－モノメチル化キャップ０構造体の構築を触媒するワクシニアウイルスキャッピング酵素（ＶＣＥ；ｍＲＮＡトリホスファターゼ、グアニル酸トランスフェラーゼ及びグアニン－７－メチルトランスフェラーゼからなる）を使用してＲＮＡ転写後に酵素的に操作することができる。Ｃａｐ０構造体は、ＲＮＡワクチンの安定性及び翻訳効果を維持する上で重要な役割を果たす。ＲＮＡワクチンの５′キャップは、２′－Ｏ－メチルトランスフェラーゼによってさらに修飾することができ、それにより、キャップ１構造体（ｍ７Ｇｐｐｐ［ｍ２′－Ｏ］Ｎ）が生成され、翻訳効率がさらに高まる。本発明によるワクチンまたはワクチン製剤は、アジュバントをさらに含むことができる。
【０１７８】
植物及び製品
【０１７９】
一実施形態では、本開示は、遺伝子組換えピーナッツ植物であって、本開示のＡｒａｈ１変異体を発現するピーナッツを含む、遺伝子組換えピーナッツ植物を提供する。
【０１８０】
一実施形態では、本開示は、遺伝子組換えピーナッツ植物であって、本開示のＡｒａｈ２変異体を発現するピーナッツを含む、遺伝子組換えピーナッツ植物を提供する。
【０１８１】
一実施形態では、遺伝子組換えピーナッツ植物であって、本開示の低アレルゲン性Ａｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体の組み合わせを発現するピーナッツを含む、遺伝子組換えピーナッツ植物を提供する。
【０１８２】

一実施形態では、上記の遺伝子組換えピーナッツ植物で発現されるＡｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体、またはそれらの組み合わせは、異種核酸から発現される。

【０１８３】

一実施形態では、上記の遺伝子組換えピーナッツ植物で発現されるＡｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体、またはそれらの組み合わせは、遺伝子組換え染色体から内在的に発現される。

【０１８４】

上記の遺伝子組換えピーナッツ植物のいくつかの実施形態では、内因性野生型Ａｒａｈ１アレルゲン、内因性野生型Ａｒａｈ２アレルゲン、またはそれらの組み合わせの発現は、非遺伝子組換えピーナッツ植物と比較して減少する。

【０１８５】

上記の遺伝子組換えピーナッツ植物のいくつかの実施形態では、遺伝子組換え植物は、（ｉ）内因性Ａｒａｈ１アレルゲン、内因性Ａｒａｈ２アレルゲン、またはそれらの組み合わせの発現を減少させる、及び、（ｉｉ）Ａｒａｈ１変異体、Ａｒａｈ２変異体、またはそれらの組み合わせの発現を減少させない、少なくとも１つのＲＮＡサイレンシング分子をさらに発現する。

【０１８６】

上記の遺伝子組換えピーナッツ植物のいくつかの実施形態では、遺伝子組換え植物は、内因性Ａｒａｈ１アレルゲン、内因性Ａｒａｈ２アレルゲン、またはそれらの組み合わせの発現を減少させることを目的とするＤＮＡ編集系をさらに発現する。

【０１８７】

一実施形態では、本開示は、本開示のＡｒａｈ１変異体を含む加工食品製品を提供する。

【０１８８】

一実施形態では、本開示は、本開示のＡｒａｈ２変異体を含む加工食品製品を提供する。

【０１８９】

一実施形態では、本開示は、本開示のＡｒａｈ１変異体及びＡｒａｈ２変異体の組み合わせを含む加工食品製品を提供する。

【０１９０】

一実施形態では、上記の加工食品は、少量の内因性ピーナッツＡｒａｈ１アレルゲン、内因性Ａｒａｈ２アレルゲン、またはそれらの組み合わせを含む。

【０１９１】

一実施形態では、上記の加工食品は、上記の遺伝子組換え植物から収穫したピーナッツを含む。

【０１９２】

本明細書で使用するとき、単数形の「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、「その（ｔｈｅ）」は、文脈が他の意味を明確に示さない限り、その指示対象の複数形も含むものとする。例えば、「１つの化合物」または「少なくとも１つの化合物」という用語は、それらの組み合わせを含む、複数の化合物を含み得る。

【０１９３】

本明細書で使用するとき、「約」という用語は、言及された値からの、最大で１％、より具体的には最大で５％、より具体的には最大で１０％、より具体的には最大で１５％、場合によっては最大で２０％の逸脱を示し、逸脱の範囲は、整数値、及び該当する場合には非整数値も含み、連続的な範囲を構成する。

【０１９４】

本出願の全体を通じて、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異体の様々な実施形態、並びにそれらの変異位置及び／またはエピトープ位置を、範囲形式で示すことがある。範囲形式での記載は単に利便性及び簡潔性のためのであり、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異体の様々な実施形態、並びにそれらの変異位置及び／またはエピトープ位置に対する柔軟性のない

限定と解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲に関する記載は、その範囲内に含まれる個々の数値だけでなく、その範囲内に含まれる可能なすべての部分的な範囲を具体的に開示したものと見なされるべきである。例えば、１から６までという範囲の記載は、１から３まで、１から４まで、１から５まで、２から４まで、２から６まで、３から６まで、・・・、という部分的な範囲、並びに、その範囲内に含まれる個々の数値（例えば、１、２、３、４、５、及び６）を具体的に開示したものと見なされるべきである。このことは、範囲の幅に関係なく適用される。

【０１９５】

本明細書において数値範囲を指定している場合は常に、指定された数値範囲内に含まれるすべての数値（分数または整数）を含むことを意味する。第１の指定数と第２の指定数と「の間の範囲」という表現、及び第１の指定数「から」第２の指定数「までの範囲」という表現は、本明細書では相互交換的に使用されており、第１の指定数及び第２の指定数、並びにこれらの間のすべての分数及び整数を含むことを意味する。

【０１９６】

実施例

【０１９７】

実施例１：材料及び方法

【０１９８】

ペプチドマイクロアレイアッセイ

【０１９９】

抗Ａｒａｈ１エピトープ及び抗Ａｒａｈ２エピトープを決定するために、Ｃｅｌｌｕｓｐｏｔ（ＴＭ）ペプチドマイクロアレイベースの免疫測定法（Intavis, Cologne, Germany）を実施した（Winkler, Dirk FH, Peptide microarrays. Humana Press, 2009）。ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１（ＵｎｉＰｒｏｔエントリＰ４３２３８、位置２５－６２６；配列番号６４）、Ａｒａｈ２（ＵｎｉＰｒｏｔエントリＱ６ＰＳＵ２；配列番号１）、Ａｒａｈ３（ＵｎｉＰｒｏｔエントリＯ８２５８０）、Ａｒａｈ６（ＵｎｉＰｒｏｔエントリＡ５Ｚ１Ｒ０）、及びＡｒａｈ８（ＵｎｉＰｒｏｔエントリＱ６ＶＴ８３）の一次配列に由来する、長さ１５アミノ酸と４アミノ酸のオフセットからなるペプチドを合成し、マイクロアレイ上にスポットした（二連で行った）。スライドを、ブロッキング緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．０５％のＴｗｅｅｎ、２．５％のスキムミルク、５０ｍＭのトリスｐＨ７．５）で、４°Ｃで一晩洗浄した。その後、スライドを洗浄し、ブロッキング緩衝液中で、３ｍｌの６．２μｇ／ｍｌの単鎖可変領域断片（ｓｃＦｖ）と共に、ローテータ上で４°Ｃで４時間インキュベートした。検出のために、スライドを３ｍｌのホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識ヤギ抗ヒトＩｇＥ（abcam, Cambridge, United Kingdom）とインキュベートし、ブロッキング緩衝液で１：１０，０００に希釈し、ローテータ上で２５°Ｃで２時間インキュベートした。洗浄後、フェムトグラムＨＲＰ基質キット（Azure Biosystem, Dublin, California）を添加し、化学発光をＣｈｅｍｉＤｏｃ（BioRad, Hercules, CA）で読み取った。ペプチドアレイ画像を、ペプチドスポットを検出し、その強度を正規化し、スライド平均からの２つの標準偏差よりも高い平均信号を複製全体に示す少なくとも２つの重複するスポットのシリーズを報告するｉｎ－ｈｏｕｓｅ　ｐｙｔｈｏｎスクリプトによって、処理した。

【０２００】

ヒトｓｃＦｖファージ提示ライブラリの作製

【０２０１】

ピーナッツアレルギーと臨床的に診断された患者から、ヘパリンまたはＥＤＴＡ処理チューブ（ＢＤ）を使用して、５～２０ｍｌの全血サンプルを採取した。末梢血単核球（ＰＢＭＣ）は、製造業者の指示に従ってＳｅｐｍａｔｅチューブ（STEMCELL）を使用して、血液サンプルから抽出した。ＲＮＡは、ＲＮＡｅａｓｙ抽出キット（Qiagen; Hilden, Germany）を使用して、５～１５×１０^{6}個のＰＢＭＣから精製した。ｃＤＮＡは、（得られたＲＮＡ量に応じて）１～５μｇのＲＮＡから作製した。

【０２０２】
ｃＤＮＡ反応全体をＰＣＲ反応に分け、各患者の可変遺伝子の抗体超可変ドメインを増幅した。軽鎖は、構造化されていない非特異的なオーバーハング及びそれに続くＮｏｔＩ制限部位を有する遺伝子サブファミリー特異的なフォワードプライマーと、構造化されていないリンカーの５´部分と相同性を有するＩＧＬＫ及びＩＧＬＬアイソタイプに特異的なリバースプライマーとを用いて増幅した。重鎖は、構造化されていないリンカーの３´部分と相同性を有する遺伝子サブファミリー特異的フォワードプライマーと、構造化されていない非特異的なオーバーハング及びそれに続くＮｏｔＩ制限部位を有するＩＧＨＧ及びＩＧＨＥ遺伝子に特異的なリバースプライマーとを用いて増幅した。プライマーは、「Phage display: Methods and Protocols'' (2018) Hust M and List T eds. Springer Protocols.」に記載されている。ＰＣＲの５０μｌの反応は、ＰｈｕｓｉｏｎホットスタートＴａｑポリメラーゼキット（２００μＭのｄＮＰＴ、２％のＤＭＳＯ、１．２５Ｍのベタイン、１～５μｇのｃＤＮＡ、及び、０．５μＭの各プライマー）を用いて行った。反応は、以下のＰＣＲプログラムを用いて行った：９８°Ｃで３分間、９８°Ｃで２０秒間＋６０°Ｃで６０秒間＋７２°Ｃで４５秒間を３０サイクル、及び、７２°Ｃで１０分間の最終伸長段階。

【０２０３】
各ファミリー（ＶＨγ、ＶＨκ、ＶＬκ、及び、ＶＬλ）のＰＣＲ産物を組み合わせ、各プールをエタノール沈殿で濃縮し、１％アガロースゲル上に加え、ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて抽出し、Ａｍｉｃｏｎ超３０Ｋ遠心フィルタ（Sigma-Aldrich Merck, Israel）を用いて洗浄した。増幅させたＶ遺伝子セグメントのＤＮＡ混合物を、４５％のＶγ、５％のＶε、２５％のＶκ、及び２５％のＶλの割合で作製した。コンビナトリアル軽重量ｓｃＦｖライブラリの作製は、最初のＰＣＲと同じ試薬を用いたＰＣＲ反応によって行ったが、１反応当たり１００μｌ、１００ｎｇのＶ遺伝子混合物を、「プルスルー」プライマー（最初のＰＣＲからの各生成物の制限部位に隣接するオーバーハングに相補的）と共に、２５０ｎＭの濃度で行った。プライマーなしで多重組換え反応物（１８－２４）を作製し、ＰＣＲを以下のプログラムを用いて行った：９８°Ｃで３分間、９８°Ｃで２０秒＋６０°Ｃで６０秒＋７２°Ｃで６０秒を５サイクル。次に、プライマーを添加し、以下のプログラムを用いて反応を実施した：９８°Ｃで１分間、９８°Ｃで２０秒間＋６７°Ｃで６０秒間＋７２°Ｃで４５秒間を３０サイクル、及び、７２°Ｃで３分間の最終伸長段階。

【０２０４】
ＰＣＲ産物をエタノール沈殿によって濃縮し、１％アガロースゲル上に加え、ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて抽出し、Ａｍｉｃｏｎ超３０Ｋ遠心フィルタ（Sigma-Aldrich Merck, Israel）を用いて洗浄した。ｐＬｉｂＧＤベクター（後述）及び精製ｓｃＦｖＤＮＡ（少なくとも、４μｇのベクター及び２μｍのｓｃＦｖ）を、製造業者の指示に従って、高忠実度ＮｃｏＩ及びＮｏｔＩ酵素（NEB; MA, USA）を用いて制限した。ベクターを、製造業者の指示に従ってＱｕｉｃｋＣＩＰ（NEB）でさらに処理した。制限されたベクターを、前述のステップと同様に、１％アガロースゲルからの抽出及び遠心フィルタによって洗浄した。制限ｓｃＦｖは、ＰＣＲ浄化カラム（Qiagen）を用いて精製した。

【０２０５】
１３０ｎｇのベクターと７０ｎｇのインサートとを用いて（３：１の比率で）、製造業者の指示に従って２０μｌの連結反応を設定し、１０°Ｃで一晩実施した。少なくとも合計３μｇのＤＮＡの連結反応を行った。

【０２０６】
連結反応ライブラリを、製造業者の指示に従ってＳＳ３２０エレクトロコンピテント細菌（Lucigen; WI, USA）に形質転換した。各ライブラリを２つの形質転換に分け、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリンと２％のグルコースとを含む、３つの１５ｃｍの２ＹＴ－寒天皿に播種した。寒天皿を３０°Ｃで一晩インキュベートした。形質転換の連続希釈

液を別々のカナマイシン及びアンピシリンの皿に播種し、形質転換効率を推定した。１０７＜のライブラリを十分な品質と見なし、さらに使用した。

【０２０７】

翌日、ＳＳ３２０を６ｍｌの２ＹＴを用いて寒天皿から掻き取り、１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン及び２％のグルコースを添加した６０ｍｌの２ＹＴ中でＯ．Ｄ＝０．１に希釈し、ＯＤ＝０．５まで増殖させ、１：１０００に希釈したＫＯ７ヘルパーファージ（ＮＥＢ）に３７°Ｃで３０分間感染させた。次いで、細菌を３０００ｇで１０分間遠心分離し、２００ｍｌの２ＹＴ＋１００μｇ／ｍｌのカルベニシリン＋２５μｇ／ｍｌのカナマイシンに再懸濁し、バッフル付きフラスコ内で２５０ＲＰＭで振とうしながら３０℃で少なくとも一晩、または最長２４時間培養し、ｓｃＦｖ提示ファージを産生した。

【０２０８】

翌日、菌体を１８，０００ｇ、１６，０００ｇで１０分間遠心分離した。上清を未使用のチューブに移し、ＰＥＧ／ＮａＣｌストック（２０％のＰＥＧ－８０００、２．５ＭのＮａＣｌ）を最終濃度が２０％になるように加えて（ＰＥＧ－ＮａＣｌストックと上清の比は１：４）、ファージを沈殿させた。サンプルを氷上で２０分間インキュベートし、４°Ｃ、１８，０００ｇで３０分間遠心分離した。上清を捨て、ペレットを再び２分間遠心分離し、残りの上清を除去した。ペレットを１０ｍｌのＰＢＳ／１００ｍｌ培養液で再懸濁し、１８，０００ｇで１０分間遠心分離し、残存する細菌細胞残渣を除去した。次に、サンプルを、２回目の同じＰＥＧ－ＮａＣｌ沈殿に供し、４ｍｌのＰＢＳ／１００ｍｌの培養液で再懸濁した。サンプルを２０，０００ｇで１５分間遠心分離して残存する残渣を除去し、精製したファージに５０％のグリセロール及び２ｍＭのＥＤＴＡを添加し、使用するまで－８０℃で保存した。

【０２０９】

アレルゲン特異的ｓｃＦｖに対するファージ提示ライブラリのスクリーニング

【０２１０】

アレルゲン特異的ｓｃＦｖの単離は、天然の精製アレルゲン、または、疑わしいエピトープを改変した組換えアレルゲン変異体のいずれかを用いてファージライブラリをパニングすることにより行った。Ｍａｘｉｓｏｒｐ高結合９６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）を、１００μｌの５μｇ／ｍｌアレルゲン溶液（ＰＢＳ中）または２％ＢＳＡ溶液（ＰＢＳ中）で被覆した（１ライブラリあたり８ウェル）。ＯｍｎｉＭＡＸ（ＴＭ）細菌（Thermo Fisher Scientific; MA, USA）を２ＹＴ＋テトラサイクリン（５μｇ／ｍｌ）中に播種し、２５０ＲＰＭで振とうしながら３７°Ｃで一晩培養した。

【０２１１】

翌日、ＯｍｎｉＭＡＸ（ＴＭ）細菌を２ＹＴ＋テトラサイクリン中で０．１Ｏ．Ｄに希釈し、２５０ＲＰＭで振とうしながら、３７°Ｃで、Ｏ．Ｄ＝０．６～０．８まで増殖させ、その後、使用するまで氷上に保存した。ファージストック（２～４ｍｌ）を解凍し、ＰＥＧ－ＮａＣｌ精製によって精製し（上記と同様に）、１ｍｌのＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ）で再懸濁した。パニングされていないファージストックのサンプルを、インプット測定用に取っておく。陰性選択を行う場合、マキシソーププレートを２００μｌ／ウェルのＰＢＳＴ×３で洗浄し、次いで、ファージ溶液をＢＳＡ被覆ウェル中で１００μｌ／ウェルで穏やかに振とうしながらインキュベートして非特異的結合剤を除去した。次に、ファージ溶液をアレルゲン被覆ウェルに移し、穏やかに振とうしながら４°Ｃで１時間インキュベートした。陰性選択を行わない場合、ファージ－ＰＢＳＴ溶液をアレルゲン被覆ウェルに直接添加した。次いで、プレートを２００μｌ／ウェルＰＢＳＴで２回洗浄し、非結合ファージを除去した。結合したファージは、１００μｌ／ウェルの１００ｍＭのＨＣｌと共に、穏やかに振とうしながら室温で５分間インキュベートすることによって溶出させた。溶出反応は、ｐＨ１１のトリス１Ｍの１２．５μｌ／ウェルで停止させた。

【０２１２】

溶出したサンプルを、５ｍｌのＯｍｎｉＭＡＸ（ＴＭ）に必要なＯ．Ｄで添加し、２５

０ＲＰＭで振とうしながら３７°Ｃで３０分間インキュベートした。パニング出力滴定は、感染株のサンプルで連続１０倍希釈を行い、カルベニシリン、カナマイシン、またはテトラサイクリンを添加したＬＢ寒天皿に５μｌ滴を三連で播種することによって評価した。残りの出力は、１：１００のＫＯ７ヘルパーストックに１：１０００で重複感染させ、２５０ＲＰＭで振とうしながら３７°Ｃで４５分間インキュベートすることにより増殖させた。重複感染細菌株を、カルベニシリン及びカナマイシンを添加した５０ｍｌの２ＹＴに継代し、次のパニングのためのファージを生産するために、２５０ＲＰＭで振とうしながら３７°Ｃで一晩増殖させた。パニングの入力滴定は、入力サンプルの１０倍希釈を連続的に行い、ＯｍｎｉＭＡＸ（ＴＭ）細菌に感染させ、２５０ＲＰＭで振とうしながら３７°Ｃで３０分間インキュベートした後、カルベニシリン及びカナマイシンＬＢ寒天皿に三連で播種することによって評価した。

【０２１３】

その後のパニングラウンドは、一晩の出力増殖のＰＥＧ－ＮａＣｌ沈殿を１回行い、それを入力として使用することによって行った。１回のパニングラウンドから次のパニングラウンドまで、洗浄サイクル数を増やし、パニングェル数を減らすことにより、パニングの厳密性を高めた（ライブラリあたり３～４回のパニングサイクル）。

【０２１４】

個々のアレルゲン特異的ｓｃＦｖを単離するために、選択したラウンドの出力連続希釈液をＬＢ－寒天－カルベニシリン皿に播種し、３７°Ｃで一晩培養した。翌日、個々のコロニーを、３００μｌの２ＹＴ＋カルベニシリン＋１：１０００のＫＯ７を含むミニチューブに接種し、２５０ＲＰＭで振とうしながら３７℃で一晩培養した。翌日、ミニチューブからの上清を、アレルゲンまたはＢＳＡで被覆したプレートを用いてＥＬＩＳＡによって分析した。アレルゲンに特異的に結合し、ＢＳＡには結合しない上清のｓｃＦｖを、ｐＬｉｂＧＤプラスミドのｓｃＦｖ領域に隣接するプライマーを用いたＰＣＲによって増幅した。全長ｓｃＦｖと一致するＰＣＲ産物を、ＥｘｏＩ及びｒＳＡＰ制限酵素（ＮＥＢ）による標準的なＰＣＲ洗浄に供し、標準的なサンガー反応（Ｈｙｌａｂｓ）によって配列決定した。精製ｓｃＦｖの作製には、ユニークな全長モノクローンを用いた。

【０２１５】

ｓｃＦｖ精製

【０２１６】

モノクローナル抗体の可変領域を、細菌発現系で容易に発現可能なｓｃＦｖポリペプチド鎖に導入した。ｓｃＦｖ発現のために、ＳｃＦｖを、Ｎ´末端でペリプラズム分泌シグナル及びＦｌａｇ標識をコードするＬｉｂＧプラスミドに、ｓｃＦｖをクローン化し、Ｔａｃプロモーターの転写制御下でＨｉｓ標識をＣ´末端（ＳＴ２分泌シグナル－ｓｃＦｖ－Ｈｉｓ標識）にクローン化した。この構築物を３７°Ｃで増殖させ、細胞が０．８～１．０のＯＤに達したときに１ｍＭのＩＰＴＧを添加して誘導を２０°Ｃで一晩行った。細胞を採取し（４８００ｇ、２０分間）、細胞ペレットをＰＢＳ溶解緩衝液（１％ｖ／ｖのトリトンＸ－１００、２５０Ｕのベンゾナーゼ、０．２ｍＭのＰＭＳＦ、１ｍｇ／ｍｌのリゾチーム、１０ｍＭのイミダゾール）で再懸濁した。細胞を４°Ｃで１時間振とうして溶解させた。その後、溶解物を、遠心分離（１５０００ｇ、３０分間）によって分離した。上清を、予洗浄したＮｉ－ＮＴＡビーズ（１０ｍＭイミダゾール含有ＰＢＳ）にロードし、４℃で１時間インキュベートした。ビーズを、イミダゾール濃度を高めたＰＢＳで洗浄した（最大２５０ｍＭ）。ＳｎａｋｅＳｋｉｎ透析チューブ３．５ｋＤａ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、４°Ｃで一晩透析し、緩衝液をＰＢＳに交換した。ＳｃＦｖを３ｋＤａセントリコーン（Ａｍｉｃｏｎ, Ｍｅｒｃｕｒｙ）で濃縮し、その濃度を２８０ｎｍでの吸光度で測定した。

【０２１７】

アレルゲン特異的Ｂ細胞の単一細胞ソーティング

【０２１８】

ピーナッツアレルギー患者ＰＢＭＣを、メーカーの指示に従って解凍し、ＰＢＳで洗浄

し、生存率分析のために染色した（ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ近赤外線キット（Thermo-Fisher））。次に、細胞を、アレルゲンの種類に応じて様々な濃度の標的アレルゲンと共に、氷上で１時間インキュベートした。使用したアレルゲンは、アレクサ－フロールタンパク質標識キット（製造業者の指示に従って２種類の蛍光体で標識されたアレルゲンの混合物である（Thermo-Fisher））で蛍光標識した天然精製アレルゲン、Ｃ末端またはＮ末端のいずれかをＨＡ標識したＯＲｗｔ組換えアレルゲン、または、ビオチン－アビジン標識ｗｔ組換えアレルゲン（２つの異なる蛍光団で標識したアレルゲンの混合物）のいずれかであった。次いで、細胞を洗浄し、以下のマーカー：ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＩｇＧ１について蛍光色素結合抗体で染色した。ＨＡ標識アレルゲンを用いる場合は、異なる蛍光色素結合を有する２種類の抗ＨＡ抗体も加えた。その後、細胞を洗浄し、ＡＲＩＡ－ＩＩＩソーティングフローサイトメトリーで選別した。単一アレルゲン特異的Ｂ細胞（ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤｄｉｍＣＤ１４－ＣＤ１６－ＩｇＤ－ＩｇＭ－ＣＤ３－ＣＤ１９＋ＩｇＧ１＋アレルゲン蛍光色素二重陽性）を、４μｌ／ウェルの氷冷溶解緩衝液（ＰＢＳ×０．５、１０ｍＭのＤＴＴ、８ＵのＲＮａｓｅ阻害剤）を含む９６ウェルプレートにソーティングした。ＰＣＲ陰性対照として、各プレートのいくつかのウェルを空にしておいた。

【０２１９】

選別細胞からの抗体遺伝子の単離及び抗体発現

【０２２０】

単一選別アレルゲン特異的Ｂ細胞溶解物を直接逆転写した（ＳＳＩＶ、Invitrogen、製造業者の指示に従って）。既知の抗体遺伝子対立遺伝子の大部分をカバーするプライマーの混合物を用いて、重鎖遺伝子（ホットスタートＴＡＫポリメラーゼ、ＮＥＢ）及び軽鎖遺伝子（ＫａｐａホットスタートＰＣＲＦミックス）を増幅するために、２回の逐次ＰＣＲ反応（2nd PCR nested）を実施した。ＰＣＲ産物の塩基配列を決定し、ゲノムにアライメントした。細胞が重鎖と軽鎖との両方について信頼できる配列を有する場合、その配列を哺乳類発現プラスミド（ｐＳＦ）にクローニングし、ＨＥＫ－２９３ｔ細胞で発現させた。

【０２２１】

酵母表面提示変異体飽和ライブラリの作製及びフローサイトメトリー細胞ソーティング

【０２２２】

各残基に単一変異を有するＡｒａｈ２変異体からなるライブラリをＴＷＩＳＴ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（CA, USA）から取り寄せ、ＹＳＤベクター（ｐＥＴＣＯＮ）にクローニングした。Ａｒａｈ２ライブラリをＳ１と表される酵母の表面に提示するために、ライブラリをＳＤＣＡＡ選択培地（２％のブドウ糖、０．６７％のディフコ酵母窒素塩基、０．５％のバクトカサアミノ酸、０．５２％のNa_2HPO_4、０．８５６％の$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$）で培養し、確立されたプロトコルに従ってガラクトース培地（ＳＤＣＡＡについては、ブドウ糖の代わりにガラクトース２％を使用した）で発現誘導した（Chao, G., Lau, W., Hackel, B. et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc 1, 755-768 (2006)）。Ａｒａｈ２の発現は、ＦＩＴＣに結合した抗Ｍｙｃ抗体により検出され（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）、抗Ａｒａｈ２ｓｃＦｖ結合はＡＰＣに結合した二次抗ＦＬＡＧ抗体により検出された（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）。ペアワイズ選択スクリーニングのために、約１×１０^{6}個の酵母細胞を結合緩衝液（１００ｍＭのトリス、ｐＨ＝８．０、１ｍＭの$CaCl_2$、１％ＢＳＡ）中で異なる抗Ａｒａｈ２ｓｃＦｖと共に室温で１時間インキュベートした。次いで、細胞を結合緩衝液で洗浄し、抗Ｍｙｃ－ＦＩＴＣ抗体及び抗ＦＬＡＧ－ＡＰＣ抗体と共に３０分間インキュベートした。次に、細胞を結合緩衝液で再度洗浄し、ＦＡＣＳＡｒｉａを用いていくつかの独立したソーティングを行うことにより、高選択性変異体及び低選択性変異体を選別した。抗Ａｒａｈ２ｓｃＦｖに対して高い結合親和性または低い結合親和性を示すＡｒａｈ２変異体、すなわち、全集団の最低１％まで及び最高１％までの変異体を選択し、ｍＡ

ｂ＿Ｓ２＿ｌｏｗ及びｍＡｂ＿Ｓ２＿ｈｉｇｈと表した。

【０２２３】

ハイスループットシーケンシングライブラリの作製

【０２２４】

Ａｒａｈ２遺伝子を含むＹＳＤベクター（ｐＥＴＣＯＮ）を、ナイーブライブラリ及び選別ライブラリから、製造業者のプロトコルに従って、Ｚｙｍｏｐｒｅｐ酵母プラスミドＭｉｎｉｐｒｅｐＩＩ（Zymo research, Irvine, CA）を用いて単離した。このキットを使用して、各酵母ライブラリから約２００ｎｇのｐＥＴＣＯＮを単離した。抽出したｐＥＴＣＯＮを、Ｈｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社（Hylabs, Rehovot, Israel）のＮＧＳ研究所に送り、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ　Ａｃｃｅｓｓ　Ａｒｒａｙプライマーを用いて、２０サイクル及び８サイクルの一次ＰＣＲ及び二次ＰＣＲを行い、アダプタ及びバーコードを追加した。次に、ＤＮＡライブラリサンプルをＡｍｐｕｒｅＸＰビーズ（Beckman Coulter, Brea, CA）で精製し、サンプルの濃度を、ＤＮＡ高感度アッセイを用いてＱｕｂｉｔで測定した。サンプルをプールし、ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ（Agilent, Santa Clara, CA）上に加え、ＰＣＲ産物のサイズを確認した。最終的な品質試験として、プールをｑＲＴ－ＰＣＲに供し、塩基配列を決定できるＤＮＡの濃度を決定した。その後、６００ｖ２キットを使用して、プールをＩｌｌｕｍｉｎａＭｉｓｅｑでシーケンシングするためにロードした。

【０２２５】

ディープシーケンシングリード解析

【０２２６】

ペアエンドリードを解析し、ｆａｓｔｐコマンドライン前処理ツールを使用して品質についてフィルタリングした（Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics (Oxford, England), 34(17), i884-i890）。全ライブラリの品質に応じて、配列の１０％または２０％以上が、Ｐｈｒｅｄ品質スコアが２０未満のすべての配列は、その後の解析から除外した。その後、ｐａｎｄａｓｅｑアセンブラに実装されている重複領域の確率モデルに基づいてリードをアライメントした（Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M. et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. BMC Bioinformatics 13, 31 (2012)）。

翻訳配列を、予想される変異（配列ごとの単一変異、すなわち変異ごとの単一変異）の出現についてフィルタリングし、配列濃縮について分析した。

【０２２７】

【数１】

$$\text{Enrich } Xi = \left(\frac{fS_1 aa_i}{fS_0 aa_i}\right)$$

【０２２８】

式中、aa_iは位置ｉにおける特定のアミノ酸であり、fS_1はソートされたライブラリにおける位置ｉにおける所与のアミノ酸の読み取りの割合であり、fS_0は入力ライブラリにおける同じ割合である。この計算により、各特異的Ａｒａｈ２点変異体の濃縮が得られる。

【０２２９】

便宜上、以下は、位置ｉにおける特定のアミノ酸の増加指数としても表すことができる。

【０２３０】

【数２】

$$IN\ aa_i = \frac{fS_1 aa_i}{fS_0 aa_i}$$

【０２３１】
各位置のシャノンエントロピーを計算することによって、所与の位置のすべての変異についての情報の統合が行われる。
【０２３２】
【数３】

$$\mathrm{Ent_i} = \sum_{z=1}^{20} \frac{\mathrm{INaa_z}}{\sum_{j=1}^{20} \mathrm{INaa_j}} \ln \sum_{z=1}^{20} \frac{\mathrm{INaa_z}}{\mathrm{INaa_j}}$$

【０２３３】
式中、ｉは所与の位置であり、ＩＮａａｚは所与のアミノ酸の増加指数を表し、すべてのアミノ酸の増加指数によって正規化される。
【０２３４】
Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２の精製
【０２３５】
Ａｒａｈ２及びＡｒａｈ１変異体の精製のために、Ａｒａｈ２ＷＴ（配列番号２）及びその変異体を、Ａｒａｈ１ＷＴ（配列番号６５）及びその変異体と同様に、ｐＥＴ２８プラスミドにクローニングした。Ａｒａｈ２は、Ｈｉｓ標識Ｔｒｘ及びＴＥＶプロテアーゼ切断配列をコードするＤＮＡに融合した（Ｔｒｘ－Ｈｉｓ＊６－ＴＥＶ部位－Ａｒａｈ２）。Ａｒａｈ１変異体のＤＮＡについては、Ｍｅｔ－ＴＥＶ－Ｈｉｓ＊６標識のＤＮＡ配列をＮ末端に加え、いくつかの変異体については、Ｎ末端の開始コドンとしてＭｅｔを加え、Ｃ末端のＨｉｓ＊６を加えた。制限クローニングのために、必要に応じて、追加の制限部位を組み入れた。すべての変異体は、Ｔ７プロモーターの転写制御下で発現した。細胞をＯＤが０．５～０．８に達するまで３７°Ｃで培養し、１ｍＭのＩＰＴＧを２０°Ｃで一晩添加するか、または３７°Ｃで３時間添加することによって、誘導を実施した。細胞を採取し（４８００ｇ、３０分間）、細胞ペレットを溶解緩衝液（５０ｍＭのトリスｐＨ８．０、３５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％ｖ／ｖのグリセロール、０．２％のトリトンＸ－１００、２５０Ｕのベンゾナーゼ、０．２ｍＭのＰＭＳＦ、及び、１ｍｇ／ｍｌのリゾチーム）で再懸濁し、超音波処理（３５％振幅、１０秒間オン、３０秒間オフ、２分間）によって溶解した。溶解液を遠心分離（１５０００ｇ、４５分）し、上清を、結合緩衝液（５０ｍＭのトリスｐＨ８．０、３５０ｍＭのＮａＣｌ、及び、１０％ｖ／ｖのグリセロール）で事前洗浄したＮｉ－ＮＴＡビーズ上にロードし、４°Ｃで１時間インキュベートした。ビーズを、イミダゾール濃度を高めた結合緩衝液で洗浄した。Ａｒａｈ２精製のために、Ｔｒｘ－Ａｒａｈ２タンパク質を含むサンプルにＴＥＶプロテアーゼを添加し、ＳｎａｋｅＳｋｉｎ透析チューブ３．５ｋＤａ（Thermo Fisher scientific）を使用して４°Ｃで一晩透析することによって、緩衝液をＰＢＳに交換した。ＴＥＶ切断後、溶液をＮｉ－ＮＴＡカラムにロードすることによって、Ｔｒｘ－Ｈｉｓ標識部分及びＴＥＶプロテアーゼ（Ｈｉｓ標識も含む）を除去した。Ａｒａｈ２を含むフロースルーを収集し、３ｋＤａセントリコーン（Amicon, Mercury）によって濃縮し、タンパク質濃度を２８０ｎｍの吸光度で測定した。Ａｒａｈ１の精製のために、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００での追加のゲルろ過ステップを実施した。
【０２３６】
ＥＬＩＳＡによる、モノクローナル抗体に対する結合の分析
【０２３７】
ＷＴ－Ａｒａｈ及びＡｒａｈ変異体（ＥＣ５０）に対する最大結合の５０％を与えるのに必要なＡｎｔｉ－Ａｒａｈ１及びＡｎｔｉ－Ａｒａｈ２ｓｃＦｖの濃度をＥＬＩＳＡに

より測定した。簡単に説明すると、９６ウェルマイクロタイタープレート（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）のウェルを、２００ｎｇのＡｒａｈ２またはＡｒａｈ１で、４°Ｃで一晩被覆した。プレートを、ＰＢＳ（２００μｌ／ウェル）中の０．５％ＢＳＡで、室温で１時間ブロックした。抗ＡｒａｈｓｃＦｖ変異体を、４μＭの開始濃度でＰＢＳ中での連続希釈によって作製し、Ａｒａｈで被覆したウェルに添加し、３７°Ｃで１時間インキュベートした。洗浄後、ＨＲＰポリクローナル抗体（Abcam, Cambridge, United Kingdom）と結合させたヤギ抗ＦＬＡＧ及びＴＭＢ基質とのインキュベーションによって、結合したｓｃＦｖ量を検出した。

【０２３８】

すべてのインキュベーションステップは、０．５％のＢＳＡ及び０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ中で実施した。Ａｎｔｉ－Ａｒａｈ　ｓｃＦｖの最高濃度は飽和しており、Ａｒａｈ１またはＡｒａｈ２への結合量は、この濃度で最大に達する。

【０２３９】

複数部位に変異を有する変異体の計算デザイン

【０２４０】

ｍＡｂ及び／または患者血清への結合を減少させる点変異を同定した実験結果に基づき、Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ　Ｍａｅｓｔｒｏソフトウェアスイート（Schrodinger, L. L. C. "The Maestro suite of programs: A powerful, all-purpose molecular modeling environment." New York: Schroedinger LLC (2005)）を用いて、それらの安定性を維持すると予測される変異の組み合わせを有する変異体を作製した。Ａｒａｈ２（PDB accession 3ob4）の解決した結晶構造を、分析のために作製した（Ａｒａｈ２に融合したＭＢＰタンパク質に属する残基を除去し、タンパク質作製ウィザードを用いて水分を除去し、水素結合を最適化し、タンパク質バックボーンを最小化した）。次に、残基走査ツールを用いて、エピトープレベルで変異が結合している場合には最大５個の同時変異のモンテカルロサンプリングを行い、タンパク質レベルで変異が結合している場合には最大２５の同時変異のモンテカルロサンプリングを行い、側鎖変異時のバックボーンの最小化及び２５０個の構造体の作製を可能にした。変異は、変異時のタンパク質の自由エネルギーの変化であるΔＧによって評価した。ほぼ同一のタンパク質配列の実験的試験を排除するために、配列をΔＧによってランク付けし、ΔＧ＞１０の構造を排除し、配列多様性によりランク付けした。

【０２４１】

ＲＢＬ　ＳＸ－３８細胞の脱顆粒アッセイ

【０２４２】

ＲＢＬ　ＳＸ－３８細胞は、ボストンのＢＩＤＭＣの許可を得て、カリフォルニア大学デンバー校のＳｔｅｐｈｅｎ　Ｄｒｅｓｋｉｎ教授から受け取った。細胞を、Ｌ－グルタミン、ペニシリン－ストレプトマイシン、及びＧ４１８を１ｍｇ／ｍｌで添加した、８０％のＭＥＭ、２０％のＲＰＭＩ－１６４０、５％のＦＣＳ（非熱不活性化）を含有する維持培地中で、３７°Ｃ、５％CO_2で培養した（すべて、Gibco-Thermo fisher, USAから入手）。アッセイの少なくとも４８時間前に、細胞を分割し、アッセイ培地で培養した（ＲＰＭＩと及びＧ４１８を含まない維持培地）。アッセイ当日、０．０５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Gibco）を用いて細胞を分離し、３００ｇで１０分間遠心分離し、５～１０％の臨床サンプル（ピーナッツアレルギー患者の血漿／血清、希釈率はサンプルごとに異なる）を添加したアッセイ培地中に3×10^6個の細胞／ｍｌの最終濃度まで再懸濁した。血漿がヘパリン以外の抗凝固剤で産生された場合は、サンプルに３０Ｕ／ｍｌのヘパリン（Sodium-Heparin, Sigma）を添加し、細胞に添加する前に、室温で１０分間インキュベートした。その後、細胞を９６ウェル平底組織培養プレート（Greiner bio-one, Austria）に５０μｌ／ウェル（最終的には１５０，０００個の細胞／ウェル）で播種し、一晩培養した。翌日、活性化溶液は、アレルゲンまたは無関係なタンパク質陰性対照を、Ｔｙｒｏｄｅ緩衝液中の様々な濃度で希釈することによって作製した。翌日、アレルゲンまたは非関連タンパク質陰性対照を、濃度を変えてチロデ緩衝液（１３７ｍＭの

ＮａＣｌ、２．７ｍＭのＫＣｌ、０．４ｍＭのNaH_2PO_4、０．５ｍＭの$MgCl_2$、１．４ｍＭの$CaCl_2$、１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．３、５．６ｍＭのグルコース、０．１％のＢＳＡ、ｐＨは７．４に調整、８０％ｄｄｗの水組成及び２０％Ｄ２Ｏ重水、Merck-Sigma Aldrich, Israel）で希釈することによって、活性化溶液を作製した。その後、細胞をｄｄｗのみで作製したＴｙｒｏｄｅ緩衝液で３回洗浄し、１００μｌのアレルゲン活性化溶液を適切なウェルに添加した（二連で行った）。各アレルゲンに対して、１０倍希釈で５～６の濃度を用いた。各臨床サンプルを、ＷＴアレルゲン、変異体アレルゲン、及び、陰性対照としての無関係なタンパク質（KLH, Sigma）について検査した。また、総脱顆粒を測定するために、溶解緩衝液（１％Ｔｒｉｔｏｎｘ－１００を含有するＴｙｒｏｄｅ緩衝液、Fisher Scientific）と、バックグラウンド脱顆粒を測定するためのＴｙｒｏｄｅ緩衝液のみを用いて、二連ウェルを作製した。その後、細胞を、３７℃、５％CO_2で１時間インキュベートした。インキュベーション直後に、３０μｌの各ウェルを、透明な非結合性９６ウェルプレート（Greiner Bio-one）中の対応するウェルに移し、５０μｌのＰＮＡＧ比色基質（０．１Ｍクエン酸から最終濃度まで１．３６８ｍｇ／ｍｌｐＨ４．５で作製した４－ニトロフェニルＮ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミニド）を添加した。反応物を、暗所で穏やかに振とうしながら３７°Ｃで１時間インキュベートした後、１００μｌの停止液（０．２Ｍのグリシン、ｐＨ１０．７）を加えて反応を停止させ、発色させた。ＳｙｎｅｒｇｙＬＸマイクロプレート分光光度計リーダ（Biotek, Vermont）を用いて、信号については４０５ｎｍで、バックグラウンド吸光度については６３０ｎｍで光学密度を読み取った。バックグラウンド吸光度を差し引いた後、各細胞のＯＤをそれに対応する溶解緩衝液ウェルのＯＤで割り（総脱顆粒）、緩衝液のみのウェルのＯＤ（バックグラウンド脱顆粒）を差し引くことによって、正味の脱顆粒を算出した。ＥＣ５０値はアレルゲンごとに計算し、各アレルゲン変異体の相対的アレルゲン誘発性は、そのＥＣ５０をＷＴアレルゲンのＥＣ５０で割ることによって算出した。低信号に起因してＥＣ５０が導出できなかったところでは、定性分析を行った。

【０２４３】

ＢＡＴアッセイ

【０２４４】

ヘパリン処理したチューブ（Biological Industries）に新鮮全血サンプルを１００μｌずつ分注した。アレルゲン及び対照を、ＲＰＭＩ－１６４０（Biological Industries）で希釈して２倍株とし、チューブに１：１で加えて（最終量は２００μｌ）、３７°Ｃ、５％CO_2の加湿インキュベーター中で３０分間インキュベートした。各アレルゲンに用いた用量範囲は、１～１００００ｎｇ／ｍｌであった。粗ピーナッツ抽出物（ＣＰＥ）、ｆＭＬＰ、及び抗ヒトＩｇＥ抗体を、陽性対照として用いた。陰性対照として、ＫＬＨタンパク質を用いた。氷上で５分間インキュベートして反応を停止させた。蛍光色素結合抗体のカクテルをサンプルに直接添加し、以下のマーカーを検出した：ＣＤ２０３ｃ、ＣＤ６３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ４５、ＣＤ１２３。細胞を氷上で３０分間インキュベートした。製造業者の指示に従って、キット（ＢＤ　ＦＡＣＳ溶解液）で赤血球溶解を行い、細胞を洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。好塩基球検出のために細胞をゲーティングし、活性化率（％ＣＤ６３陽性好塩基球）を測定した。チューブあたり少なくとも５００個の好塩基球を分析した。アレルゲンごとにＥＣ５０値を算出し、各アレルゲン変異体の相対的アレルゲン活性は、そのＥＣ５０をＷＴアレルゲンのＥＣ５０で割ることによって算出した。

【０２４５】

Ｔ細胞活性化アッセイ

【０２４６】

ヘパリン処理したピーナッツアレルギー患者血液サンプルからＰＢＭＣを単離した。細胞をＰＢＳで洗浄し、製造業者の指示に従ってＣｅｌｌｔｒａｃｅ　ｖｉｏｌｅｔ（Thermo-Fisher）で染色し、５％ヒトＡＢ血清（Biotag）及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液（Biological industries）を添加したＸ－ｖｉｖｏ１５培地中で、９

６ウェルの丸底プレートに０．２～０．５×１０^{6}個の細胞／ウェル（精製及び染色後の利用可能な細胞数による）で播種した。組換えＷＴ及び変異アレルゲンをＲａｐｉｄ　Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ　Ｒｅｍｏｖａｌ　Ｋｉｔ（Abcam）で精製し、残留エンドトキシン汚染を検査し（LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Pierce）、細胞と同じ培地で希釈し、０．２２μＭろ過で滅菌し、最終濃度が５０μｇ／ｍｌになるように１ウェルあたり２００μｌで細胞に添加した。未活性化ウェル（ベースライン、培地のみ）と各アレルゲンを、患者ごとに３つ以上の複製ウェルで試験した。各アッセイには、アッセイ品質保証のための陰性対照として、患者と共に健康なドナーサンプルが含まれていた。すべてのアレルゲンのウェルの最終エンドトキシン濃度は０．５ＥＵ未満であった。細胞を、３７°Ｃ、５％CO_2の加湿インキュベーター中で、７日間インキュベートした。培養期間中にいずれかのウェルの培地が黄色に変化した場合、すべてのウェルについて培地の半分を新しい培地に交換した。７日後、細胞を採取し、生存率について染色し（ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色、Thermo-Fisher）、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ４の蛍光色素結合抗体（Biolegend; USA）で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。生Ｔヘルパー細胞をゲートし（ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤｌｏｗＣＤ４＋ＣＤ３＋）、増殖細胞の割合（Ｃｅｌｌｔｒａｃｅｄｉｍ／総Ｔヘルパー細胞）を測定した。陽性結果（アレルゲンが患者Ｔ細胞の活性化を引き起こす）は、アレルゲン刺激ウェルの平均が非刺激ウェルの平均＋３ｘＳＤより大きい場合に決定された。

【０２４７】

円偏光二色性分光法は、ごく少量のタンパク質を用いて、溶液中のタンパク質の二次構造や折畳み特性を分析するのに有用な手法である。これは、発色団による左右の円偏光の吸光度の差に基づいている。タンパク質のＣＤ分析は、遠紫外線領域（２４０ｎｍ以下）のアミド発色団及び芳香族側鎖（２６０～３２０ｎｍ）からの情報に基づいている。例えば、α－ヘリカルタンパク質は２２２ｎｍ及び２０８ｎｍに負のバンドを持ち、１９３ｎｍに正のバンドを持つが、明確に定義された逆平行のβ－プリーツシート（βシート）を持つタンパク質は２１８ｎｍに負のバンドを有し、１９５ｎｍに正のバンドを有する。

【０２４８】

組換えＡｒａｈタンパク質の円偏光二色性スペクトルをバル＝イラン大学のＣｈｉｒａｓｃａｎＣＤスペクトロメータ（Applied Photophysics）で測定した。波長２００～２６０ｎｍの遠ＵＶＣＤスペクトルを、１０ｍｍの経路長キュベットにより取得した。Ａｒａｈ組換えＷＴ及び変異体をＰＢＳ緩衝液中で測定し、濃度を２８０ｎｍで測定した。安定性を評価するため、２５℃及び２０～９０℃の高温でスペクトルを取得した。

【０２４９】

菌株、プラスミド、及び増殖条件

【０２５０】

大腸菌安定株（New England Biolabs）をすべてのクローニング手順にルーチンで使用し、大腸菌ＯｍｎｉＭＡＸ（ＴＭ）（Thermo Fisher scientific）をファージ提示ライブラリのスクリーニングに使用し、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞をｓｃＦｖ精製に使用し、大腸菌ＯｒｉｇａｍｉまたはＢＬ２１Ｄｅ３（Novagen）をＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１の精製に使用した。すべての菌株を、２ＹＴブロス及びＬＢ寒天プレート上で、３７℃で培養した。ファージミドを、ピーナッツアレルギー患者由来のｓｃＦｖｓファージ提示ライブラリ及びｓｃＦｖ精製に使用した。ｔＰＣＲを使用して、健康なドナーに由来し、非構造化ＧＧＧＳｘ４リンカーを用いてデザインされた非特異的ｓｃＦｖを挿入し、ｓｃＦｖセグメントのいずれかの末端に制限部位（５′末端にＮｃｏＩ、３′末端にＮｏｔＩ）を追加した（修飾プラスミドは内部でＬｉｂＧＤとマークされた）。プラスミドｐＥＴ２８（Invitrogen）を、Ａｒａｈ２、Ａｒａｈ１、及び変異体の組換え精製に使用した。ｓｃＦｖ提示のための形質転換は、ＳＳ３２０エレクトロコンピテント大腸菌（Lucigen）を使用して行った。

【０２５１】

実施例２：Ａｒａｈ１ポリペプチド及びＡｒａｈ２ポリペプチドのエピトープマッピン

グ及び脱エピトープ化

【０２５２】

目的：全体的な目的は、安定した、かつ、Ｔ細胞活性化活性を保持するが、ＩｇＥアレルゲン抗体に対する結合を低減させる、アレルゲン性ポリペプチドの定義された標的変異の基礎を築くことである。免疫療法の目的のために、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異ポリペプチドの機能性には、例えばＴ細胞を活性化する能力によって免疫原性を維持することが含まれる。この一連の実験は、ピーナッツアレルギー患者サンプルからの特異的モノクローナル抗体の結合に基づいて、ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２上の立体配座エピトープ及び線状エピトープを同定し、マッピングするために実施した。また、この一連の実験は、Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２ｍＡｂ結合エピトープ内のアミノ酸残基のうち、結合に寄与し、変異した場合にタンパク質を不安定化することが予測されないアミノ酸残基を同定するために実施した。

【０２５３】

結果

【０２５４】

ピーナッツのアレルゲンであるＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１の単一エピトープマッピング及び脱エピトープ化のためのパイプラインには、（１）ＥＬＩＳＡアッセイ及びペプチドアレイによって測定されたＡｒａｈ１またはＡｒａｈ２に対して特異的ＩｇＥ結合を示すピーナッツアレルギー患者サンプルからのＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の発見（図１）と、（２）各抗体が結合するエピトープのマッピング（図２）との２段階が含まれる。第１段階であるｍＡｂ発見は、可変遺伝子の増幅とｐＩＩＩタンパク質に融合しファージ上に示されるｓｃＦｖの構築による、または、Ａｒａｈ特異的Ｂ細胞単細胞選別によるｓｃＦｖファージ提示ライブラリを用いて行われ、その後、可変領域の配列決定と組換えｍＡｂの産生が行われた。図１は、Ａｒａｈ２抗体を同定するプロセスの概略図である。同様の方法でＡｒａｈ１抗体を同定した。

【０２５５】

簡単に説明すると、３７人のピーナッツアレルギー患者のＰＢＭＣからｓｃＦｖファージ提示ライブラリを、実施例１に記載されているように作製し、これらのライブラリのパニングプロセスの後、３５個のＡｒａｈ１特異的ｍＡｂｓ及び４２個のＡｒａｈ２特異的ｍＡｂｓを同定した。ｓｃＦｖｍＡｂｓを大腸菌で発現させ、精製した。後述する図２に示すエピトープマッピング手順を、１９個のＡｒａｈ１及び１０個のＡｒａｈ２ｓｃＦＶｍＡｂに対して実施した。１人の患者ＰＢＭＣの単一細胞ソーティング分析から、１４個のＡｒａｈ２特異的ｍＡｂが同定され、ＩｇＧとしてＨＥＫ２９３細胞で発現させ、そのエピトープをＡｒａｈ２にマッピングした。

【０２５６】

第２段階では、抗Ａｒａｈ１または抗Ａｒａｈ２特異的精製ｍＡｂを３つの相補的アプローチでエピトープマッピングに用いた。

【０２５７】

アプローチＡ：酵母表面提示ＹＳＤによるサイト飽和変異誘発（Siloto and Weselake (2012) Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 1(3):181-189) (Cherf GM, Cochran JR. (2015) Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. Methods Mol Biol. 1319:155-75）。

【０２５８】

Ａｒａｈ２ＹＳＤ変異誘発ライブラリを用いたエピトープマッピング：エピトープマッピングの目的のために、２段階の手順を実施した。まず、Ａｒａｈ２点変異体ライブラリを発現のみのためにソートし、ＹＳＤに成功した変異体を収集し、Ｓ１と呼ばれるソートされたライブラリを得た。発現の閾値は、無染色細胞（バックグラウンド）よりも高い蛍光値と定義した。バックグラウンドよりも高い蛍光シグナルを有する各細胞を収集した（Ｓ１　ｌｉｂ）。次に、５６個のｍＡｂに対するＳ１ライブラリの結合を評価した。Ａｒ

ａｈ２変異体を示し、集団の下位１％及び上位１％においてｍＡｂ結合シグナル（ＡＰＣ）を示したＡｒａｈ２酵母細胞をソートした（ライブラリは、Ｓ２－ｍＡｂ－ｌｏｗまたはＳ２－ｍＡｂ－ｈｉｇｈとして割り当てられた）。図３Ａのソート例を参照のこと。ここで、網掛け領域Ｒ８及びＲ９は、発現及び結合レベルに基づいて収集するＡｒａｈ２発現酵母細胞を定義するＦＡＣＳゲートである（Ｒ９：高いＡｒａｈ２結合を示すＡｒａｈ２点変異体、Ｒ８：高い発現を示すが低いＡｒａｈ２結合を示す変異体）。いくつかの実施形態では、低いＡｒａｈ２結合を示す変異体は、関心のある技術的特徴を含む。

【０２５９】

特定のｍＡｂとの結合に影響する位置を同定するために、各Ｓ２－ｍＡｂに対して詳細な配列決定を行った。ライブラリは、発現と低いｍＡｂ結合のための選択を受けたので、配列決定結果を濃縮計算によって分析した。点変異体をコードする各々のユニークなＤＮＡ配列をカウントし、その相対存在量の倍率変化を計算し、ｍＡｂ結合の変化を間接的に推定した。マッピング例の代表的な結果を図３Ｂに示す。

【０２６０】

高親和性Ａｒａｈ２点変異体の集団を低親和性変異体の集団と比較し、高結合集団ではなく低結合集団で濃縮される変異の同定を可能にした。

【０２６１】

評価した５６個のｍＡｂのうち、２２個のｍＡｂのみがマッピングに成功した。ＹＳＤを用いた同様のアプローチを、Ａｒａｈ１変異体とｍＡｂに対して実施した。

【０２６２】

アプローチＢ：表面に露出したパッチ変異誘発の構造に基づくインシリコデザイン（パッチ法を、Ａｒａｈ２ではなくＡｒａｈ１に用いた）。Ａｒａｈ１（配列番号６６；配列番号６５のアミノ酸８７－５０３）のコアドメインは明確に定義された三量体構造を有する。表面露出に関するデータ（溶媒にアクセス可能な表面積計算のためのオープンソースＣライブラリであるＦｒｅｅＳＡＳＡソフトウェア（Simon Mitternacht (2016)）によって計算した）を進化的保存と組み合わせて、三量体構造を破壊することなく表面露出位置を変異させた。作製された各変異体について、構造的に近い４～７個の表面位置のセットを選択し、多重配列アライメントにおいて進化的保存性が低い位置であればアラニンに、進化的保存性が高いアミノ酸であればホモログ間で同定されたアミノ酸に変異させた。保存は、デフォルトパラメータを用いたＢＬＡＳＴによるＡｒａｈ１の同族体の収集（Altschul, Stephen F., et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic acids research 25.17 (1997): 3389-3402）と、クラスターオメガを用いた多重配列アライメントの生成（Sievers, Fabian, et al. "Fast, scalable generation of high‐quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Molecular systems biology 7.1 (2011): 539）によって評価した。この表面パッチ変異誘発法を用いて、Ａｒａｈ１の立体配座エピトープをマッピングした。すべてのパッチを変異させ、組換え変異体を、ＥＬＩＳＡによって、Ａｒａｈ１ｍＡｂｓとの結合について検査した。

【０２６３】

立体配座エピトープ

【０２６４】

Ａｒａｈ１における、下記の少なくとも５つの立体配座エピトープを同定した。Ｃ４：配列番号６５の少なくとも残基８４、８７、８８、９６、９９、４１９、及び４２２を含む。Ｃ３：配列番号６５の少なくとも残基３２２、３３４、４５５、及び４６４を含む。Ｃ１：配列番号６５の少なくとも残基４６２、４８４、４８５、４８８、４９１、及び４９４を含む。Ｌ１：配列番号６５の少なくとも残基１９４－１９７を含む。Ｌ２：配列番号６５の少なくとも残基２８７－２９５を含む。

【０２６５】

Ａｒａｈ２における、下記の少なくとも５つの立体配座エピトープを同定した。Ｃ３：

配列番号３の少なくとも残基１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２４、２５、２７、２８、８０、９７、９９、１００、１０２、１０３、１０４、１０５、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、及び１１３を含む。Ｃ１：配列番号３の少なくとも残基８２、８３、８６、８７、９０、及び９２を含む。Ｃ２：配列番号３の少なくとも残基９７、９９、１００、１０２、１０３、１０４、１０５、１０７、１０８、１２７、１２８、１２９、１３０、１３４、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、及び１４３を含む。Ｃ４：配列番号３の少なくとも残基１２３、１２４、１２５、１２７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、及び１４４を含む。Ｌ４：配列番号３の少なくとも残基１０９－１１５を含む。

【０２６６】

アプローチＣ：ペプチドマイクロアレイアッセイを、精製ｍＡｂ（ｓｃＦｖまたはＩｇＧ）を用いて実施例１に記載したように実施し、アレルゲンＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２上の連続エピトープのいくつかをマッピングした（図２）。この方法は、線状エピトープに対するＹＳＤ飽和法またはパッチ法からのデータを検証するためにも使用した。Ａｒａｈ２では、２つの線状エピトープが同定され（配列番号３のＬ１残基１２－２０及び配列番号３のＬ３残基４４－６９）、ペプチドアレイで分析した１４個のｍＡｂで確認された。Ａｒａｈ１では、６つの線状エピトープが同定され（Ｌ７：配列番号６５の残基２４－３０、Ｌ６：配列番号６５の残基２０９～２１５、Ｌ３：配列番号６５の残基３３１－３３６、Ｌ４：配列番号６５の残基４１－４２２、Ｌ５：配列番号６５の残基４８０～４８７、及び、Ｌ８：配列番号６５の残基２６０－２６７）、すべてがペプチドマイクロアレイを用いて分析した１３個のｍＡｂで確認された。追加のＡｒａｈ特異点変異ペプチドアレイを用いて、ｍＡｂ結合に重要な１５ｍｅｒペプチドのホットスポットを見つけた。

【０２６７】

アレルギー患者の血清に基づくＡｒａｈ１のＩｇＥエピトープマッピング及び脱エピトープ化（実施例３参照）。１６個のエピトープにおける臨界位置Ｘを、アプローチＣのプロセスと同様に、ペプチドマイクロアレイを用いて同定した。しかしながら、単離されたモノクローナル抗体をマッピングする代わりに、実施例３に記載したように、アレルギー患者血清からのＩｇＥレパートリーを使用した。同定された線状エピトープには、次のものが含まれる。Ｌａ９：配列番号６５の少なくとも残基１２を含む。Ｌａ１６：配列番号６５の少なくとも残基４２を含む。Ｌａ２３：配列番号６５の少なくとも残基５２を含む。Ｌａ１３：配列番号６５の少なくとも残基５７及び５８を含む。Ｌａ１７：配列番号６５の少なくとも残基７３を含む。Ｌａ１０：配列番号６５の少なくとも残基２３１、２３４、２３８、及び２４９を含む。Ｌａ１１：配列番号６５の少なくとも残基２４５を含む。Ｌａ２１：配列番号６５の少なくとも残基２７８及び２８３を含む。Ｌａ１２：配列番号６５の少なくとも残基３１２及び３１８を含む。Ｌａ２２：配列番号６５の少なくとも残基３７８を含む。Ｌａ２４：配列番号６５の少なくとも残基４４１を含む。Ｌａ１８：配列番号５８の少なくとも残基４４３を含む。Ｌａ１４：配列番号７３の少なくとも残基４４５を含む。Ｌａ１９：配列番号６５の少なくとも残基４６３を含む。Ｌａ１５：配列番号６５の少なくとも残基５００を含む。Ｌａ２０：配列番号６５の少なくとも残基５２３を含む。

【０２６８】

要約

【０２６９】

表１は、ＷＴＡｒａｈ１、アミノ酸変異、及びそれらのエピトープに対する位置に変異を有するＡｒａｈ１変異体の実施形態を要約する。左端の列及び変異の列の太字はプライマリホットスポットを示し、イタリック体の文字はセカンダリホットスポットを示す。表１に示す変異／エピトープの詳細は、実施例２及び実施例３の結果から照合した。

【０２７０】

【表１－１】

表1：Arah1変異体

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
R	1		
S	2		
P	3		
P	4		
G	5		
E	6		La9
R	7		La9
T	8		La9
R	9		La9
G	10		La9

【０２７１】

【表１－２】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
R	11		La9
Q	12	K,A	La9
P	13		La9
G	14		La9
D	15		La9
Y	16		La9
D	17		La9
D	18		
D	19		
R	20		L7
R	21		L7
Q	22		L7
P	23		L7
R	24	V,E	L7
R	25		L7
E	26		L7
E	27	A,H	L7
G	28		L7
G	29		L7
R	30	E,A	L7
W	31		L7
G	32		L7
P	33		
A	34		
G	35		
P	36		
R	37		
E	38		
R	39		
E	40		
R	41		La16
E	42	L,K	La16
E	43		La16
D	44		La16
W	45		La16
R	46		La16
Q	47		La16
P	48		La16
R	49		La16
E	50		La16
D	51		La16
W	52	T,L	La16
R	53		La16
R	54		

【０２７２】

【表１－３】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
P	55		La13
S	56		La13
H	57	D,L	La13
Q	58	S,R	La13
Q	59		La13
P	60		La13
R	61		La13
K	62		
I	63		
R	64		
P	65		
E	66		
G	67		
R	68		
E	69		La17
G	70		La17
E	71		La17
Q	72		La17
E	73	A,M	La17
W	74		La17
G	75		La17
T	76		La17
P	77		La17
G	78		La17
S	79		
H	80		
V	81		
R	82		
E	83		
E	84	A	C4
T	85		
S	86		
R	87	A	C4
N	88	A	C4
N	89		
P	90		
F	91		
Y	92		
F	93		
P	94		
S	95		
R	96	A	C4
R	97		
F	98		
S	99	A	C4
T	100		
R	101		

【０２７３】

【表１－４】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
Y	102		
G	103		
N	104		
Q	105		
N	106		
G	107		
R	108		
I	109		
R	110		
V	111		
L	112		
Q	113		
R	114		
F	115		
D	116		
Q	117		
R	118		
S	119		
R	120		
Q	121		
F	122		
Q	123		
N	124		
L	125		
Q	126		
N	127		
H	128		
R	129		
I	130		
V	131		
Q	132		
I	133		
E	134		
A	135		
K	136		
P	137		
N	138		
T	139		
L	140		
V	141		
L	142		
P	143		
K	144		
H	145		
A	146		
D	147		
A	148		

【０２７４】

【表１－５】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
D	149		
N	150		
I	151		
L	152		
V	153		
I	154		
Q	155		
Q	156		
G	157		
Q	158		
A	159		
T	160		
V	161		
T	162		
V	163		
A	164		
N	165		
G	166		
N	167	R,D	
N	168		
R	169		
K	170		
S	171		
F	172		
N	173		
L	174		
D	175		
E	176		
G	177		
H	178		
A	179		
L	180		
R	181		
I	182		
P	183		
S	184		
G	185		
F	186		
I	187		
S	188		
Y	189		
I	190		
L	191		
N	192		
R	193		
H	194	D	L1
D	195	A	L1

【０２７５】

【表１－６】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
N	196	H	L1
Q	197	A	L1
N	198		L1
L	199		
R	200	V,A,Q	C2
V	201		
A	202		
K	203		
I	204		
S	205		
M	206		
P	207		
V	208		
N	209	S	L6
T	210		L6
P	211		L6
G	212		L6
Q	213	H	L6
F	214		L6
E	215	R,D,L,I,F,A	L6
D	216		L6
F	217		L6
F	218	H,L	L6
P	219		L6
A	220		L6
S	221		L6
S	222		L6
R	223	A,D,Q,E	L6
D	224		
Q	225		
S	226		La10
S	227		La10
Y	228		La10
L	229		La10
Q	230		La10
G	231	A	La10
F	232		La10
S	233		La10
R	234	E,Q,K	La10
N	235		La10
T	236		La10
L	237		La10
E	238	Q	La10
A	239		
A	240		
F	241		La11

【０２７６】

【表１－７】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
N	242		La11
A	243		La11
E	244		La11
F	245	R,Y,A,M	La11
N	246		La11
E	247		La11
I	248		La11
R	249	N	La11
R	250		La11
V	251		La11
L	252		La11
L	253		
E	254		
E	255		
N	256		
A	257		L8
G	258		L8
G	259		L8
E	260	K	L8
Q	261	R	L8
E	262		L8
E	263	K,L	L8
R	264		L8
G	265	S	L8
Q	266	R,L	L8
R	267	E	L8
R	268		L8
W	269		L8
S	270		
T	271		
R	272		
S	273		
S	274		La21
E	275		La21
N	276		La21
N	277		La21
E	278	R	La21
G	279		La21
V	280		La21
I	281		La21
V	282		La21
K	283	E	La21
V	284		La21
S	285		
K	286		L2
E	287	D	L2
H	288	Q	L2

【０２７７】

【表１－８】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
V	289		L2
E	290	R	L2
E	291		L2
L	292		L2
T	293		L2
K	294	E	L2
H	295	A	L2
A	296		
K	297		
S	298		
V	299		
S	300		
K	301		
K	302		
G	303		
S	304		
E	305		
E	306		
E	307		
G	308		
D	309	R	La12
I	310		La12
T	311		La12
N	312	H,A	La12
P	313		La12
I	314		La12
N	315		La12
L	316		La12
R	317		La12
E	318	H	La12
G	319		La12
E	320		La12
P	321		
D	322	A,K	C3
L	323		
S	324		
N	325		
N	326		
F	327		L3
G	328		L3
K	329		L3
L	330		L3
F	331	H,W	L3
E	332		L3
V	333		L3
K	334	D,N,A	C3
P	335		L3

【０２７８】

【表１－９】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
D	336	R,S	L3
K	337		L3
K	338		L3
N	339		L3
P	340		
Q	341		
L	342		
Q	343		
D	344		
L	345		
D	346		
M	347		
M	348		
L	349		
T	350		
C	351		
V	352		
E	353		
I	354		
K	355		
E	356		
G	357		
A	358		
L	359		
M	360		
L	361		
P	362		
H	363		
F	364		
N	365		
S	366		
K	367		
A	368		
M	369		
V	370		
I	371		La22
V	372		La22
V	373		La22
V	374		La22
N	375		La22
K	376		La22
G	377		La22
T	378	K,E	La22
G	379		La22
N	380		La22
L	381		La22
E	382		La22

【０２７９】

【表１－１０】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
L	383		
V	384		
A	385		
V	386		
R	387		
K	388		
E	389		
Q	390		
Q	391		
Q	392		
R	393		
G	394		
R	395		
R	396		
E	397		
E	398		
E	399		
E	400		
D	401		
E	402		
D	403		
E	404		
E	405		
E	406		
E	407		
G	408		
S	409		
N	410		
R	411		
E	412		
V	413		L4
R	414		L4
R	415		L4
Y	416		L4
T	417	R	L4
A	418		L4
R	419	E,V,A	L4,C4
L	420		L4
K	421	S,E	L4
E	422	R,A	L4,C4
G	423		L4
D	424		L4
V	425		L4
F	426		L4
I	427		L4
M	428		L4
P	429		

【０２８０】

【表１－１１】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
A	430		
A	431		
H	432	D,I,L	
P	433		
V	434		
A	435		
I	436		
N	437		
A	438		
S	439		
S	440		
E	441	N	La18
L	442		La18
H	443	A	La18
L	444		
L	445	V,I	La14
G	446		La14
F	447		La14
G	448		La14
I	449		
N	450		
A	451		
E	452		
N	453		
N	454		
H	455	A,F,Y,D,N,Q	C3, La19
R	456		La19
I	457		La19
F	458		La19
L	459		La19
A	460		La19
G	461		La19
D	462	A,K,T,R	C1, La19
K	463	S,E	La19
D	464	A,S,R,H,F	C3,La19
N	465		La19
V	466		
I	467		
D	468		
Q	469		
I	470		
E	471		
K	472		
Q	473		
A	474		
K	475		
D	476		

【０２８１】

【表１－１２】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
L	477		
A	478		L5
F	479		L5
P	480	Q,S	L5
G	481	A,S	L5
S	482		L5
G	483		L5
E	484	R,S,A,M	L5C1
Q	485	A	L5,C1
V	486		L5
E	487	S,K	L5
K	488	A	C1
L	489		L5
I	490		L5
K	491	A,E,S	C1
N	492		
Q	493		
K	494	A,E,N,D	C1
E	495		La15
S	496		La15
H	497		La15
F	498		La15
V	499		La15
S	500	K,E,I	La15
A	501		La15
R	502		La15
P	503		La15
Q	504		La15
S	505		
Q	506		
S	507		
Q	508		
S	509		
P	510		
S	511		
S	512		
P	513		
E	514		
K	515		
E	516		
S	517		
P	518		La20
E	519		La20
K	520		La20
E	521		La20
D	522		La20
Q	523	A,K	La20

【０２８２】

【表１－１３】

WT Arah1 配列番号65 （AA 85-626 Uniprot P43238）	変異体の位置 配列番号65及び配列番号67	変異	エピトープ
E	524		La20
E	525		La20
E	526		La20
N	527		La20
Q	528		La20
G	529		La20
G	530		La20
K	531		
G	532		
P	533		
L	534		
L	535		
S	536		
I	537		
L	538		
K	539		
A	540		
F	541		
N	542		

【０２８３】

表２は、ＷＴＡｒａｈ２、アミノ酸変異、及びそれらのエピトープに対する位置に変異を有するＡｒａｈ２変異体の実施形態を要約する。左端の列の太字はプライマリホットスポットを示し、イタリック体の文字はセカンダリホットスポットを示す。「変異」の列の太字は、Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１の変異を示す。

【０２８４】

【表２－１】

表2：Arah2変異体

WTアミノ酸 配列番号2	変異体の位置 配列番号3及び 配列番号4	配列番号1 Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
M				
S	1	20		
A	2	21		
R	3	22		
Q	4	23		
Q	5	24		
W	6	25	V	
E	7	26		
L	8	27		
Q	9	28		
G	10	29		
D	11	30	A,E,F,I,K,W	
R	12	31	**N**,Q,E,D,T,S,G,P,C,K,H	L1

【０２８５】

【表２－２】

WTアミノ酸 配列番号２	変異体の位置 配列番号３及び 配列番号４	配列番号１ Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
			,Y,W,M,I,L,V,A	
R	13	32	C,P,V,T,S,D,H,Y,F,W,L ,M	L1
C	14	33	D,M,N,Y,F,I,P,S,T,A,K	L1,C3
Q	15	34	**R**,E,K,Y,W,F,M,I,V,C, D,G,A	L1,C3
S	16	35	**R**,K,D,Q,T,M,P,C,E,W	L1,C3
Q	17	36	E,N,P	L1,C3
L	18	37	R,K,D,E,N,H,Y,W,I,P,C ,S,V,G	L1,C3
E	19	38	V,L,M,F,W,Y,H,Q,N,A, S,G,P,C,R,K,D	L1,C3
R	20	39	A,S,T,N,Q,E,K,I,L,M,F, P,C,G	L1,C3
A	21	40	D,E,K,R,Y,F,N,P	C3
N	22	41	**F**,Y,W,Q,E,T,S,A,M,I,L ,C,R,H	C3
L	23	42	V,W,Y,F,I,P,T	
R	24	43	**D**,E,H,K,S,T,N,Q,L,I,M, W,Y,F,P,A,G	C3
P	25	44	T,V,L,M,F,W,Y,Q,D,E, K,C,G	C3
C	26	45	A	
E	27	46	C,G,A,S,T,N,D,Q,V,I,M ,F,W,Y,K,R	C3
Q	28	47	**S**,T,V,N,A,P,I,L,F,Y,H, R,K,E,D	C3
H	29	48		
L	30	49		
M	31	50		
Q	32	51	R	
K	33	52		
I	34	53		
Q	35	54		
R	36	55		
D	37	56		
E	38	57		
D	39	58	S	
S	40	59		
Y	41	60		
G	42	61		
R	43	62		
D	44	63	**I**,A,C,G,H,L,F,Y,N,P,Q, K,E,S,T,V,M,R	L3
P	45	64	A,Q,Y,N,E,M,W	L3
Y	46	65	**T**,V,E,H,S,A,G,Q,N,D,	L3

【０２８６】

【表２－３】

WTアミノ酸 配列番号２	変異体の位置 配列番号３及び 配列番号４	配列番号１ Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
			R,P,M,I,L,C	
S	47	66	T,N,D,K,Y,W,F,L,P	L3
P	48	67	**V**,G,C,E,H,Q,F,K,L,I,W,Y,N,R,S,T,V,A,D	L3
S	49	68	D,R,A	L3
Q	50	69	C	L3
D	51	70	**S**,G,Y,F,W,M,N,Q,E,R,K,H,T,V,D	L3
P	52	71	S,T,V,A,F,Y,M,N,D,Q,R,K,H	L3
Y	53	72	**T**,S,Q,V,A,G,C,P,M,L,I,E,H,R,K,N,D	L3
S	54	73	E,D,G,K,I,L,V,H,Y,W,F,P,A,Δ	L3
P	55	74	**G**,A,D,E,F,Y,H,Q,V,I,L,M,R,K,S,T,C,W,Δ	L3
S	56	75	C,E,V,P,Δ	L3
Q	57	76	Δ	L3
D	58	77	H,Q,S,T,G,Δ	L3
P	59	78	D,I,K,M,L,Δ	L3
D	60	79	N,T,S,Y,H,V,Δ	L3
R	61	80	Δ	L3
R	62	81	Δ	L3
D	63	82	**P**,C,F,V,I,L,M,W,Y,N,S,T,Q,G,H,K,R,Δ	L3
P	64	83	W,Y,H,I,N,K,T,L,M,I,Q,D,E,A,C,G,Δ	L3
Y	65	84	**T**,A,N,D,Q,R,K,H,I,L,M,V,W,P,G,C,E,Δ	L3
S	66	85	T,N,D,R,H,Q,Y,W,I,L,V,P,G,Δ	L3
P	67	86	**E**,Q,N,R,H,Y,F,W,M,L,V,T,S,A,G,P,Δ	L3
S	68	87	P,G	L3
P	69	88	A,Q,Y	L3
Y	70	89		
D	71	90		
R	72	91		
R	73	92		
G	74	93		
A	75	94		
G	76	95		
S	77	96		
S	78	97		
Q	79	98		
H	80	99	**N**,S,T,V,A,I,L,M,F,Y,W,C,E,K,R,G	C3

【０２８７】

【表２－４】

WTアミノ酸 配列番号２	変異体の位置 配列番号３及び 配列番号４	配列番号１ Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
Q	81	100	R	
E	82	101	C,F,H,I,K,L,M,N,R,S,V,W,Y,A	C1
R	83	102	**D**,A,C,F,I,P,T,V,W,Y,Q	C1
C	84	103	A	
C	85	104	A	
N	86	105	**Y**,F,H,R,E,C,G,I,L,M,V,T,S,Q	C1
E	87	106	**F**,Y,I,L,M,V,A,S,Q,R,K,D,P,N,E	C1
L	88	107		
N	89	108	R	
E	90	109	**S**, P,R,Q	C1
F	91	110		
E	92	111	M,F,P	C1
N	93	112		
N	94	113		
Q	95	114		
R	96	115	A	
C	97	116	P,A,N,D,E,F,H,Y,I,L,V,Q,S,R	C2,C3
M	98	117		
C	99	118	D,E,Y,H,R,L,M,Q,S,T,V,A,W	C2,C3
E	100	119	C,G,H,I,K,L,M,Q,R,V,W,Y,P	C2,C3
A	101	120		
L	102	121	M,Q,W	C2,C3
Q	103	122	A,D,E,G,R,S	C2,C3
Q	104	123	**L**,M,K,R,H,E,D,A,Y,N,S,W	C2,C3
I	105	124	A,T	C2,C3
M	106	125		
E	107	126	**A**,C,F,G,H,I,K,L,M,Q,P,R,S,T,V,W,Y	C2,C3
N	108	127	**T**,V,D,E,R,H,Y,W,I,G,A,Q,K	C2,C3
Q	109	128	**K**,C,S,R,G,P,Y,W,I,L	L4,C3
S	110	129	R	L4,C3
D	111	130	C,I,L,M,P,Q,K,R,E,Y,S,V,A	L4,C3
R	112	131	D,E,K,H,F,I,M,L,W,A,V,S,T,N,Q,C	L4,C3
L	113	132	D,E,G,H,F,I,K,R,N,P,S,T,W,Y	L4,C3
Q	114	133	H,G,K,N,S,V,A	L4
G	115	134	**V**,D,E,I,L,K,M,N,S,T,A,	L4

【０２８８】

【表２－５】

WTアミノ酸 配列番号2	変異体の位置 配列番号3及び 配列番号4	配列番号1 Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
			I,W,F,Y,H	
R	116	135	K,E,A,V,F,G,H,P,S,T,N,W	
Q	117	136	A	
Q	118	137	N,R,V,Y	
E	119	138	C,N,S,W	
Q	120	139		
Q	121	140		
F	122	141		
K	123	142	**I**, Q,A	C4
R	124	143	**D**,A,C,F,G,H,I,N,S,T,V,Y,L,Q,E	C4
E	125	144	**M**,I,L,W,Y,G,K,N,T,V,A	C4
L	126	145		
R	127	146	**H**,A,D,E,F,G,L,N,P,S,T,W,Y,Q,V	C2,C4
N	128	147	R	C2
L	129	148	F,Q	C2
P	130	149	G,I,L,M,W,R,H,A,N,V	C2
Q	131	150	A,R	
Q	132	151		
C	133	152	A	
G	134	153	R	C2
L	135	154		
R	136	155	A,C,E,F,W,Y,G,N,P,V,Q	C2
A	137	156	C,F,W,Y,H,K,R,N,Q,D,E,G,I,L,M,T,V	C2
P	138	157	C,D,F,G,I,K,M,N,Q,S,T,V	C2,C4
Q	139	158	C,D	C2,C4
R	140	159	**G**,A,C,E,Y,F,H,K,L,M,N,P,Q,S,V	C2,C4
C	141	160	D,E,F,I,L,S,T,V,N,A,W	C2,C4
D	142	161	**M**,A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y	C2,C4
L	143	162	D,E,F,G,H,K,P,Q,N,R,S,T	C2,C4
E	144	163	G,V,M,Y,R,P	C4
V	145	164		
E	146	165	R	
S	147	166		
G	148	167	C,D,E,I,N,S,W,Y	
G	149	168	E,F,M,Q,W,Y	
R	150	169	A,C,E,G,P	
D	151	170	G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,W	

【０２８９】

【表２－６】

WTアミノ酸 配列番号２	変異体の位置 配列番号3及び 配列番号４	配列番号１ Uniprot Q6PSU2 （番号）	変異	エピトープ
			,Y	
R	152	171	S,Y,K,M,P	
Y	153	172	K,R,P	

【０２９０】

実施例３：アレルギー患者の血清サンプルに基づくＩｇＥエピトープマッピング及び脱エピトープ化

【０２９１】

目的：安定した、かつ、その機能的特徴を保持するが、ＩｇＥアレルゲン抗体への結合を減少させるアレルゲン性ポリペプチドの定義された標的変異の基礎を築くという全体的な目的に続いて、これらの実験の目的は、ピーナッツ患者の血清／血漿に対する連続した（直線的な）ＩｇＥエピトープを同定し、それらの変異体を分析することにある。

【０２９２】

結果

【０２９３】

精製ｍＡｂｓ分析法と同じペプチドアレイを用いて、アレルギー患者血清由来のポリクローナルＩｇＥのアレルゲンＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２上のすべての連続エピトープを同定した。これらのアレイを２５０人のピーナッツアレルギー患者の血清で分析し、Ａｒａｈ１－及びＡｒａｈ２－由来ペプチドの血清由来ＩｇＥ結合を検査した。検査した血清のうち、１９２と１６８のスライドは、それぞれＡｒａｈ１またはＡｒａｈ２由来の少なくとも１つのペプチドに対するＩｇＥ結合を同定した。ペプチドアレイの分析とクラスタリングの結果から、タンパク質のすべての線状エピトープのマッピングが可能となった（データは示さず）。

【０２９４】

マッピングされたエピトープに基づき、２つの追加のアレイを合成し、Ａｒａｈ１またはＡｒａｈ２にマッピングされたエピトープごとに、ＩｇＥ結合を減少させるようにコンピュータデザインされた変異ペプチドと共にＷＴペプチドをスポットした。ペプチドは、１５アミノ酸長で、点変異または二重置換変異のいずれかを含んでいた。次に、Ａｒａｈ１またはＡｒａｈ２にマッピングされた血清を、変異した「脱エピトープ化」スポットを含むアレイを用いてアッセイし、結合において最も顕著な減少を示すペプチドをスクリーニングした。代表的なアレイの結果を、Ａｒａｈ２血清Ｐ７０の線状エピトープマッピング（図５Ａ）及び脱エピトープ化（図５Ｂ）について示す。さらに、実施例２の表１に示した変異／エピトープの詳細を、実施例２及び実施例３の両方の結果から照合した。

【０２９５】

実施例４：単一または複数のエピトープの変異

【０２９６】

目的：実施例２及び実施例３で収集したデータを用いて、変異の組み合わせで変異体をデザインした。

【０２９７】

結果：変異の組み合わせは、タンパク質の安定性に対する変異のエネルギー的効果の計算予測に基づいて行った。計算は、Ａｒａｈ２（ＰＤＢ accession 3ob4）とＡｒａｈ１（ＰＤＢ accession 3s7i）の解決された構造から出発して実施した。この段階では、各変異体は、１つのエピトープで変異している。他の実施形態では、いくつかのエピトープは、単一の変異体内で変異され得る。他の実施形態では、単一の変異体は、一度に変異し

た複数のエピトープを有する。変異には、エピトープ内の１～７個の置換変異が含まれる。デザインした変異体を大腸菌で生産し、間接的な酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）によってＡｒａｈタンパク質への結合の減少を検証するために試験した。マッピングされたエピトープ領域で変異した３つのＡｒａｈ１またはＡｒａｈ２変異体に対してそれぞれ試験した、Ａｒａｈ１ｍＡｂＢ８４３（図４Ｂ）及びＡｒａｈ２ｍＡｂＢ５３６（図４Ａ）の代表的な結果を示す。

【０２９８】

表３～５は、単一エピトープで脱エピトープ化されたＡｒａｈ２変異体と、それらの特異的ｍＡｂに対する影響を示す。表６は、複数のエピトープで脱エピトープ化されたＡｒａｈ２変異体を示す。表７は、単一エピトープ（配列番号６８－８７）及び一度に複数エピトープで脱エピトープ化されたＡｒａｈ１変異体（配列番号８８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、２１１－２４６）を示す。

【０２９９】

【表３】

表3：特異的mAbに対する結合が消失したArah2変異体

エピトープ名	変異体名	変異体の変異
L1	Ara h 2_B493	R12S+R13S+Q15E+S16R+E19D
L1	Ara h 2_B572	R12N+Q15R+S16R
L1	Ara h 2_B573	R12Y+R13M+Q15M+S16R
L1	Ara h 2_B574	R12N+R13H+S16R
L1	Ara h 2_B575	R12N+Q15R+S16M+R20S
L3	Ara h 2_B549	D44S+Y46T+P48A+D51S+Y53V+P55G+D63T+Y65I+P67A
L3	Ara h 2_B550	D44I+Y46T+P48V+D51S+Y53T+P55G+D63P+Y65T+P67E
L3	Ara h 2_B577	D44L+P48G+D51W+Y53E+P55W+Y65T+P67G
L3	Ara h 2_B987	Y46A+Y53A+Y65A
L4	Ara h 2_B712	G115V
L4	Ara h 2_B713	Q109K+G115S
L4	Ara h 2_B714	R112H+G115A
L4	Ara h 2_B715	R112H+G115S
L4	Ara h 2_B716	R112H+G115V
L4	Ara h 2_B717	Q109K+G115A
L4	Ara h 2_B718	Q109K+G115V
L4	Ara h 2_B719	Q114H+G115A
L4	Ara h 2_B720	Q114H+G115S
L4	Ara h 2_B721	Q114H+G115V
C1	Ara h 2_B569	N86Y
C2	Ara h 2_B622	E100V+E107K+A137R
C2	Ara h 2_B623	Q104L+E107A+R127H+R140G
C2	Ara h 2_B624	E100V+A137F+R140G+D142H
C2	Ara h 2_B625	Q104L+E107K+R140H+D142A
C2	Ara h 2_B626	E100V+E107A+R127H+D142Y
C3	Ara h 2_B617	N22F+Q28S+H80N+N108T
C3	Ara h 2_B618	Q15R+A21P+R24D+H80R+Q104L
C3	Ara h 2_B620	N22F+E27R+N108T+S110R
C3	Ara h 2_B621	R24L+Q28N+E107A+N108K
C4	Ara h 2_B754	K123I+R124D+E125M+R140E
C4	Ara h 2_B755	K123I+E125M+N128R+D142M
C4	Ara h 2_B756	R124Y+E125I+R140V+D142Y+E144P

【０３００】

【表４】

表４：特異的mAbに対する結合が減少したArah2変異体

L3	Ara h 2_B547	D44S+Y46T, P48L, D51S, P55L, D63T, Y65K, P67E
L3	Ara h 2_B548	D44M+Y46V+P48V+D51F+Y53V+P55Y+D63N+Y65K+P67A
C1	Ara h 2_B556	E87D+G134R
C1	Ara h 2_B557	N86Q
C1	Ara h 2_B560	G134R
C1	Ara h 2_B637	P25F+D63T+N86Q+E92F
C1	Ara h 2_B638	P67A+E82A+N86Y+R136Q
C1	Ara h 2_B639	R83V+N86R+E92P+G134R
C1	Ara h 2_B640	D63T+R83Y+N86Q+R136Q
C1	Ara h 2_B685	P67A+E82A+N86Y
L4	Ara h 2_B710	G115A
L4	Ara h 2_B711	G115S
C3	Ara h 2_B619	R24S+Q104L+N108T
C4	Ara h 2_B725	E125A+D142A
C4	Ara h 2_B726	R124L+D142V
C4	Ara h 2_B727	R124Y+D142A
C4	Ara h 2_B728	R124Y+D142H
C4	Ara h 2_B729	R124Y+D142V

【０３０１】

【表５】

表５：特異的mAbに対する結合が減少していないArah2変異体

C1	Ara h 2_B559	N86R+L135K
C1	Ara h 2_B570	E87I
C2	Ara h 2_B627	E100V+E107K+A137R+D142A

【０３０２】

【表６－１】

表６：Arah2変異体のアミノ酸配列

Arah2変異体	配列番号
Ara h 2_B1001	10
Ara h 2_B764	11
Ara h 2_B761	12
Ara h 2_B767	13
Ara h 2_B768	14
Ara h 2_B769	15
Ara h 2_B770	16
Ara h 2_B771	17
Ara h 2_B772	18

【０３０３】

【表６－２】

Arah2変異体	配列番号
Ara h 2_B773	19
Ara h 2_B774	20
Ara h 2_B775	21
Ara h 2_B776	22
Ara h 2_B777	23
Ara h 2_B778	24
Ara h 2_B779	25
Ara h 2_B780	26
Ara h 2_B781	27
Ara h 2_B782	28
Ara h 2_B783	29
Ara h 2_B784	30
Ara h 2_B785	31
Ara h 2_B786	32
Ara h 2_B831	33
Ara h 2_B832	34
Ara h 2_B833	35
Ara h 2_B834	36
Ara h 2_B835	37
Ara h 2_B836	38
Ara h 2_B837	39
Ara h 2_B956	40
Ara h 2_B957	41
Ara h 2_B958	42
Ara h 2_B961	43
Ara h 2_B962	44
Ara h 2_B963	45
Ara h 2_B964	46
Ara h 2_B967	47
Ara h 2_B968	48
Ara h 2_B969	49
Ara h 2_B970	50
Ara h 2_B971	51
Ara h 2_B973	52
Ara h 2_B974	53
Ara h 2_B975	54
Ara h 2_B976	55
Ara h 2_B977	56
Ara h 2_B646	57
Ara h 2_B981	58
Ara h 2_B982	59
Ara h 2_B983	60
Ara h 2_B984	61
Ara h 2_B985	62
Ara h 2_B986	63
DE Ara 2 variant 1001	168
DE Ara 2 variant 764	170

【０３０４】

【表６－３】

Arah2変異体	配列番号
GM Arah2	195
GM Arah2-TM	196
GM Arah2- MITD	197
Arah2 TM	198
Arah2 MITD	199
GM Arah2-IgG1 Fc	200
GM Arah2-IgG4 Fc	201
1001-IgG1 Fc	204
1001-IgG4 Fc	205
GM 1001-IgG1 Fc	206
GM 1001-IgG4 Fc	207
1001 var2	208
1001 var4	209
1001 var6	210
Arah2_conbo31	247
1001-TM	248
GM1001-TM	249

【０３０５】

【表７－１】

表７：Arah１変異体のアミノ酸配列

Arah1変異体	配列番号
Ara h1_B867	68
Ara h1_B869	69
Ara h1_B871	70
Ara h1_B876	71
Ara h1_B879	72
Ara h1_B923	73
Ara h1_B924	74
Ara h1_B926	75
Ara h1_B946	76
Ara h1_B947	77
Ara h1_B948	78
Ara h1_B949	79
Ara h1_B991	80
Ara h1_B992	81
Ara h1_B996	82
Ara h1_B997	83
Ara h1_B998	84
Ara h1_B1010	85
Ara h1_B1011	86
Ara h1_B1013	87
Ara h1_B1086	88
Ara h1_B1087	89
Ara h1_B1088	90
Ara h1_B1089	91
Ara h1_B1090	92
Ara h1_B1091	93

【０３０６】

【表７－２】

Arah1変異体	配列番号
Ara h1_B1092	94
Ara h1_B1093	95
Ara h1_B1190	96
Ara h1_B1191	97
Ara h1_B1192	98
Ara h1_B1201	99
Ara h1_B1202	100
Ara h1_B1203	101
Ara h1_B1246	102
Ara h1_B1247	103
Ara h1_B1248	104
Ara h1_B1249	105
Ara h1_B1250	106
Ara h1_B1251	107
Ara h1_B1252	108
Ara h1_B1253	109
Ara h1_B1256	110
Ara h1_B1258	111
Ara h1_B1267	112
Ara h1_B1268	113
Ara h1_B1269	114
Ara h1_B1270	115
Ara h1_B1271	116
Ara h1_B1272	117
Ara h1_B1275	118
Ara h1_B1281	119
Ara h1_B1282	120
Ara h1_B1283	121
Ara h1_B1284	122
Ara h1_B1285	123
Ara h1_B1286	124
Ara h1_B1287	125
Ara h1_B1288	126
Ara h1_B1289	127
Ara h1_B1290	128
Ara h1_B1291	129
Ara h1_B1292	130
Ara h1_B1293	131
Ara h1_B1294	132
Ara h1_PLP242	133
Ara h1_PLP243	134
Ara h1_PLP244	135
Arah1_PLP245	136
Arah1_PLP246	137
Arah1_PLP247	138
Arah1_B1298	139
Arah1_B1299	140

【０３０７】

【表７－３】

Arah1変異体	配列番号
Arah1_B1300	141
Arah1_PLP256	142
Arah1_PLP257	143
Arah1_PLP258	144
Arah1_B1305	145
Arah1_B1306	146
Arah1_B1307	147
Arah1_B1308	148
Arah1_PLP264	149
Arah1_B1309	150
Arah1_B1304	151
Arah1_PLP317	152
Arah1_PLP318	153
Arah1_PLP496	154
Arah1_PLP499	155
Arah1_PLP595	156
Arah1_PLP601	157
Arah1_PLP607	158
Arah1_PLP729	159
Arah1_PLP730	160
Arah1_PLP731	161
DE Arah1 variant 5	174
DE Arah1 variant 8	176
DE Arah1 variant 25	178
DE Arah1 variant 35	180
DE Arah1 variant 51	182
DE Arah1 variant 52	184
combo 68-TM	193
combo 68-MITD	194
Arah1_PLP737	211
Arah1_PLP738	212
Arah1_PLP739	213
Arah1_PLP740	214
Arah1_PLP741	215
Arah1_PLP742	216
Arah1_PLP743	217
Arah1_PLP744	218
Arah1_PLP745	219
Arah1_PLP746	220
Arah1_PLP747	221
Arah1_PLP748	222
Arah1_PLP749	223
Arah1_PLP750	224
Arah1_PLP751	225
Arah1_PLP752	226
Arah1_PLP753	227
Arah1_PLP754	228

【０３０８】

【表７－４】

Arah1変異体	配列番号
Arah1_PLP755	229
Arah1_PLP756	230
Arah1_PLP757	231
Arah1_PLP758	232
Arah1_PLP759	233
Arah1_PLP760	234
Arah1_PLP761	235
Arah1_PLP762	236
Arah1_PLP763	237
Arah1_PLP764	238
Arah1_PLP765	239
Arah1_PLP766	240
Arah1_PLP767	241
Arah1_PLP768	242
Arah1_PLP769	243
Arah1_PLP770	244
Arah1_PLP771	245
Arah1_PLP772	246

【０３０９】
要約
【０３１０】
上記の方法に従って、７個のＡｒａｈ２エピトープ及び少なくとも２７個のＡｒａｈ１エピトープが見つけられた。２０個のＡｒａｈ１及び５０個のＡｒａｈ２単一エピトープ脱エピトープ化変異体は、ＷＴＡｒａｈと比較して結合ＥＣ５０が少なくとも５０％減少することを示すことが、間接ＥＬＩＳＡによって検証された。
【０３１１】
実施例５：エクスビボ好塩基球脱顆粒アッセイによる改変タンパク質のアレルゲン性の評価
【０３１２】
目的：野生型タンパク質と比較して、改変Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異体のアレルゲン性を評価する。
【０３１３】
結果
【０３１４】
実施例２～４で見られた、単一部位の線形及び立体配座脱エピトープ化の結果に基づいて、各エピトープに対する結合を消失させる変異を組み合わせて、複数の結合部位で変異させたＡｒａｈ１変異体（配列番号６８－１６１、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１９３、１９４、２１１－２４６）及びＡｒａｈ２変異体（配列番号１０－６３、１６８、１７０、１９５－２０１、２０４－２１０、２４７－２４９）を構築した（詳細は表６に示す）。あるいは、残基レベルのデータから出発して、複数の部位で変異したタンパク質変異体を作製するモンテカルロ法によって、追加の配列を計算によって組み合わせた。上記の表１～２に示した変異は、個々の変異部位を要約したものである。
【０３１５】
このプロセスにより、ＷＴタンパク質と比較してアレルゲン性が減少した変異体が得られた。これらの遺伝子組換え変異体を大腸菌で発現させ、精製し、アレルゲン性を検査した。まず、ピーナッツアレルギー患者血清で感作されたヒト化ラット好塩基球白血病細胞

株（ＲＢＬＳＸ－３８）を用いた細胞脱顆粒アッセイにより、広範な変異体について試験を行った。Ａｒａｈ１及びＡｒａｈ２に対するＲＢＬアッセイの代表的な結果を図６Ａ（Ａｒａｈ２）及び図６Ｂ（Ａｒａｈ１）に示す。変異型アレルゲンは、ＷＴアレルゲンと比較して細胞脱顆粒が明らかに減少し、Ａｒａｈ２変異体では劇的に減少した。

【０３１６】

次に、最も有望な変異体を好塩基球活性化試験（ＢＡＴ）で評価し、軽くローストしたピーナッツ粉から精製した実際の天然アレルゲンと比較した。ＢＡＴは、アレルギー患者の新鮮血液を用いてアレルギーの重症度を検出及び評価する臨床グレードの検査であり、アレルギー診断のゴールドスタンダードになりつつある。代表的なＢＡＴの結果を図７Ａ及び図７Ｂに示す。この結果により、イスラエル人患者とアメリカ人患者のそれぞれにおいて、主要なＡｒａｈ２変異体Ｂ７６４及びＢ１００１変異体による好塩基球の活性化が、天然アレルゲンと比較して減少していることがわかる。

【０３１７】

要約

【０３１８】

ＲＢＬ及びＢＡＴのエクスビボアッセイに基づき、複数のエピトープにおいて変異の組み合わせを有する複数のＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２突然変異体について、アレルゲン性の潜在的な消失が観察された。

【０３１９】

実施例６：Ｔ細胞活性化による免疫原性評価

【０３２０】

目的：代表的なＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２変異体の免疫原性を評価する。

【０３２１】

結果

【０３２２】

免疫療法の有効性を保証するためには、遺伝子組換えされた低アレルゲン性変異体は、免疫応答の再プログラミングを可能にするＴ細胞免疫原性を保持していなければならない。免疫原性の保持を確実にするために，Ａｒａｈ２変異体の、ピーナッツアレルギー患者末梢血由来Ｔヘルパー細胞のアレルゲン特異的増殖を誘導する能力を試験した。Ａｒａｈ１変異体についても同様の分析を行った。２つの代表的な変異体を有する２人のピーナッツアレルギー患者から収集したＰＢＭＣに対して実施されたＴ細胞増殖アッセイの例を図８Ａ及び図８Ｂに示す（患者ＳＨ４０９及び患者Ｂ２９３）。ＷＴ処理細胞及び変異体処理細胞は両方とも、未処理細胞のバックグラウンドを超える増殖を示し、このことは、変異体がＴ細胞活性化能を保持していることを示唆する。

【０３２３】

要約

【０３２４】

Ｔ細胞増殖アッセイは、Ａｒａｈ２突然変異体の２つのＴ細胞活性化特性が保存されていることを示し、このことは、これらの変異体を用いた免疫療法が成功することを示唆する。

【０３２５】

実施例７：変異体の生物物理学的特性

【０３２６】

目的：突然変異体における正しい３Ｄ折畳みを確実にするためには、天然タンパク質の同じオリゴマー化レベルを維持することが重要である（すなわち、Ａｒａｈ１は三量体、Ａｒａｈ２は単量体）。タンパク質のオリゴマー化状態を検証するためには、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）ＨＰＬＣを各変異体に対して実施し、正確なオリゴマー化状態を有する変異体のみが、低アレルゲン性変異体の開発の有効な候補と考えられた（データは示さず）。

【０３２７】

主要なＡｒａｈ２変異体のいくつかを、円偏光二色性を用いて熱安定性についてさらに分析した。試験した両変異体（Ｂ７６４及びＢ１００１）とＷＴは、２０８ｎｍと２２２ｎｍにおいて、αヘリックス含有量に特徴的なピークを示した。両変異体とＷＴの熱融中点（ＴＭ）は９０℃超であり、高い安定性と正しい折畳みを示唆した（図９Ａ～図９Ｆ）。

【０３２８】

要約

【０３２９】

主要なＡｒａｈ２変異体の２つは、ＣＤ中で高い融点を示し、ＷＴアレルゲンに類似した熱安定性を示唆した。Ａｒａｈ２とＡｒａｈ１のすべての組合せ変異体をＳＥＣ－ＨＰＬＣで試験し、Ａｒａｈ２変異体は単量体質量（約１９ｋＤａ）を示し、Ａｒａｈ１変異体は三量体質量（約１８０ｋＤａ）を示した。

【０３３０】

変異型低アレルゲン性ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２の特定の特徴を本明細書中に例示及び説明したが、様々な改変、置換、及び等価物が、当業者であれば可能であろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、これらの変形及びその使用の真の精神の範囲内に入るすべての改変及び変更をカバーすることを意図していることを理解されたい。

【０３３１】

実施例８：哺乳動物細胞からのアレルゲン変異体の発現及び分泌

【０３３２】

目的：ピーナッツタンパク質が、ＤＮＡベクターに基づいて、哺乳動物細胞から発現、フォールド、及び分泌されることを実証する。また、遺伝子組換えされた脱エピトープ化アレルゲンが、哺乳動物細胞から発現、フォールド、及び分泌されることを実証する。

【０３３３】

方法

【０３３４】

クローニング：ｗｔピーナッツアレルゲンＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１、並びに脱エピトープ化（ＤＥ）Ａｒａｈ２及びＡｒａｈ１のＤＮＡベクターを、哺乳動物細胞発現のためにコドンを最適化して合成し、ＨＭＭ＋３８リーダー配列を有するｐＴｗｉｓｔＣＭＶｐｕｒｏプラスミドにクローニングした。ｍＲＮＡ鋳型ベクターについては、インビトロ転写及び哺乳類発現のために配列を最適化して合成し、独自のプラスミドにクローニングした。ｍＲＮＡ鋳型のコード配列は、ＩＶＴのためのＳＰ６転写部位、ＴＥＶ´リーダーＵＴＲ、アフリカツメガエルβグロビン３´ＵＴＲ、及びプラスミド中で鋳型化された１２０量体ポリＡに隣接する。各配列を、ヒトＩｇＧカッパ軽鎖、ヒトＩｇＥ重鎖、またはヒトオステオネクチン（基底膜タンパク質４０）のいずれかに由来するリーダー配列でクローニングした。

【０３３５】

ｍＲＮＡの作製：すべてのｍＲＮＡ構築物は、バーナル・バイオサイエンス社（Vernal Bioscience Inc.）によって作製された。動物実験に使用したｍＲＮＡは、酵素的にｃａｐ１でキャップされ、すべてのウリジンがＮ１－メチル－プソイドウリジンで置換されている。

【０３３６】

一過性細胞トランスフェクション：Ｅｘｐｉ２９３細胞（ThermoFisher Scientific）を製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。簡単に説明すると、細胞を、２５ｍｌのＥｘｐｉ２９３発現培地中で、２．５×10^6個の細胞／ｍｌで１２５ｍｌのフラスコ中に分割した。細胞を、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ中で複合化したＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅと複合化した２５μｇのＤＮＡでトランスフェクトした。トランスフェクションの翌日、製造業者の推奨比率に従って、増殖培地にエンハンサー１及びエンハンサー２を添加した。ＥｘｐｉＣＨＯ細胞（ThermoFisher Scientific）を、製造業者のプロト

コルに従ってトランスフェクトした。簡単に説明すると、細胞を、ＥｘｐｉＣＨＯ発現培地中の１５ｍｌ中の４×１０^{6}個の細胞／ｍｌ、通気された５０ｍｌチューブに分注した。次いで、細胞を、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅＣＨＯ試薬と複合体を形成した７．５μｇのＤＮＡでトランスフェクトした。トランスフェクションの翌日に、増殖培地に、製造業者の推奨比率に従って、ＥｘｐｉＣＨＯエンハンサー及びＥｘｐｉＣＨＯフィードを添加した。

【０３３７】

タンパク質精製：ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１、並びにＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１の脱エピトープ化変異体を、上記のように一過的にトランスフェクトした細胞で４～５日間発現させ、その後、細胞をスピンダウンし、清澄化した培地を２０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、３５０ｍＭのＮａＣｌ、５％のグリセロールに対して一晩かけて透析した。透析したタンパク質を、緩衝液Ａ：２０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、３５０ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのイミダゾールで平衡化したＮｉ－ＮＴＡ樹脂カラムにロードし、緩衝液Ａで洗浄し、２４０ｍＭのイミダゾールを加えた緩衝液Ａで溶出した。次に、溶出したタンパク質を遠心濃縮機で濃縮し、ＰＢＳで平衡化した適切なサイズ排除カラム（Ａｒａｈｈ２及びＡｒａｈｈ１についてはそれぞれＳｕｐｅｒｄｅｘ７５またはＳｕｐｅｒｄｅｘ２００）にロードした。溶出したタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、適切な画分をプールし、遠心濃縮機で濃縮した。

【０３３８】

分析的ＨＰＬＣ：精製した組換えＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２を分析的サイズ排除ＨＰＬＣに供し、天然のピーナッツアレルゲンスタンダード（INDOOR Biotechnologies）と比較して、正しいオリゴマー化及び酸化的折畳み状態を確認した。簡単に説明すると、１０μｌ中の約１０μｇのタンパク質を、ＰＢＳで平衡化したＢＥＨ２００Å分析ＳＥＣカラムを備えたＷａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　Ａｒｃ　ＵＨＰＬＣに注入し、ＵＶ吸光度によって溶出タンパク質をモニターした。得られたクロマトグラムトレースから純度及び濃度を算出し、後の実験で使用した。

【０３３９】

全質量分析：精製した組換えＡｒａｈ２について、正確な組成と酸化状態を決定するために、タンパク質を全質量分析に供した。これは、ヘブライ大学のコア施設質量分析ユニットで実施した。組換えＡｒａｈ２のサンプルを、ｐＨ９．０の２０ｍＭ重炭酸アンモニウムに緩衝液交換し、正確な質量定量のためにＥＳＩＭＳ法に供した。

【０３４０】

アレルゲン抗体結合アッセイ：精製した哺乳類発現組換えピーナツアレルゲンについて、アレルギー患者の血清または抗Ａｒａｈ１抗体もしくは抗Ａｒａｈ２抗体がパネルと結合する能力をＥＬＩＳＡ法により評価した。簡単に説明すると、プレートを、１００μＬの２μｇ／ｍｌの抗原を含むＰＢＳ、及び、陰性対照としての０．５％のＢＳＡを含むＰＢＳで被覆した。プレートを密封し、振とう器上で、４°Ｃで一晩インキュベートした。被覆溶液を捨て、２００μｌのＰＢＳ＋０．５％のＢＳＡブロッキング溶液を各ウェルに添加し、振とうしながら２時間インキュベートした。各ウェルに、５０μｌのアレルギー患者血清または抗体溶液を添加し、室温で１時間インキュベートした。ウェルをＰＢＳＴで３回洗浄し、次いで、二次抗体で処理した。すなわち、ヒト血清で試験したサンプルについてはＨＲＰ結合抗ヒトＩｇＥで処理し、ＳｃＦｖまたはＩｇＧ抗体でアッセイしたサンプルについてはＨＲＰ結合抗ＦＬＡＧまたはＨＲＰ結合抗ＩｇＧ二次抗体で処理した。二次抗体と共に３０分間インキュベートした後、ウェルをＰＢＳＴで３回洗浄し、ＴＭＢ溶液と反応させた。ＴＭＢ反応をクエンチし、４５０ｎｍでの吸光度により結合を定量した。

【０３４１】

結果

【０３４２】

以下の結果は、ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ１、Ａｒａｈ２、及びそれらの脱エピト

ープ化変異体が高レベルで発現されることを実証する。図１０は、野生型または脱エピトープ化ピーナッツアレルゲンＡｒａｈ２及びＡｒａｈ１が、トランスフェクトされた哺乳動物細胞から発現及び分泌されたことを示す。トランスフェクトされた哺乳動物細胞から精製されたＡｒａｈ１は、ＨＰＬＣ分析によって示されるように、正しい三量体折畳みを有することが見出された（図１３）。図１４に示す全質量測定は、トランスフェクトされた哺乳動物細胞由来のＡｒａｈ２が、トランスフェクトされたＡｒａｈ２の配列から予想される正確な質量を有することを示す。

【０３４３】

哺乳動物細胞由来のアレルゲンは、精製モノクローナル抗体、及び、アレルギー患者血清由来ＩｇＥの両方において、抗アレルゲン抗体と結合する能力を保持している。図１１は、天然Ａｒａｈ１、組換え大腸菌由来野生型Ａｒａｈ１、及び組換えＨＥＫ細胞由来野生型Ａｒａｈ１が、アレルギー患者血清中のＩｇＥと同程度の結合を有することを示す。図１２は、組換えＡｒａｈ２及びＨＥＫ由来野生型Ａｒａｈ２が、多数の十分に特性化された抗Ａｒａｈ２モノクローナルＩｇＧ抗体と同程度の結合を有することを示す。

【０３４４】

実施例９：予備的動物試験

【０３４５】

目的：ｍＲＮＡ遺伝子治療によって送達されたピーナッツアレルゲンから免疫応答を産生することの実現可能性を究明するとともに、アレルゲンタンパク質分泌の増加についてリーダー配列をアッセイする。

【０３４６】

研究デザイン

【０３４７】

３５匹のＢＡＬＢ／ｃマウスを、抗ピーナッツ抗体の形成を防ぐために、ピーナッツを含まない飼料のみで飼育した。そのマウスを５匹ずつ７群に分け、各群に、製造業者の指示に従って、Ｔｒａｎｓ－ＩＴ－ｍＲＮＡ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）及びＤＭＥＭで作製された特定のｍＲＮＡ構築物（表８参照）１０μｇを毎週６回静脈内注射した。

【０３４８】

【表８】

表８：mRNA構築物

群	リーダー配列	タンパク質
1	BM-40	Ara h 1
2	IgGk	Ara h 1
3	IgE	Ara h 1
4	BM-40	Ara h 2
5	IgGk	Ara h 2
6	IgE	Ara h 2
7	-	蛍ルシフェラーゼ

【０３４９】

マウス血清を１週目、３週目、及び５週目に採取し、マウスは７週目に　殺した。各群の血清を、抗ピーナツアレルゲン抗体産生と、ピーナッツタンパク質自体について、ＥＬＩＳＡで分析した。

【０３５０】

結果

【０３５１】
野生型ピーナッツアレルゲンをコードするｍＲＮＡの送達は、Ｂ細胞応答を生成し、ＷＴＡｒａｈ１に対するＩｇＧ抗体の産生を誘発したが、天然のピーナッツアレルゲンを用いたＥＬＩＳＡアッセイによって検出されるように、ＷＴＡｒａｈ２に対するＩｇＧ抗体の産生は誘導しなかった。このような抗体の検出は、分泌されたアレルゲンタンパク質に対するＢ細胞応答を示し、ピーナッツアレルゲンのｍＲＮＡ送達が、減感作のための脱エピトープ化アレルゲンを用いたその後の実験の有望な戦略であることを実証した。ピーナツタンパク質の血中血清レベルを、抗アレルゲンＩｇＧレベルと同様に、様々なリーダー配列間で比較し、それぞれのリーダー配列の分泌効率を示した。この情報を用いて、どのリーダー配列が各ピーナッツアレルゲンの最も効率的な分泌を促進するかを決定した。ＢＭ－４０リーダー配列が最も高い抗体価を示し、同じ構築物を用いた哺乳動物細胞で観察された発現レベルパターンとよく一致した。
【０３５２】
実施例１０：アレルギーモデル動物試験
【０３５３】
目的：脱エピトープ化Ａｒａｈ２のｍＲＮＡ送達による感作マウスの減感作の可能性と程度を究明する。
【０３５４】
研究デザイン
【０３５５】
マウス（雌Ｃ３Ｈ／ＨｅＪ７０匹）を、ピーナッツ抽出物の腹腔内注射により、最初にピーナッツに感作させた。その後、マウスを５匹からなる１４のコホートに分け（表９参照）、製造業者の指示に従って、Ｔｒａｎｓ－ＩＴ－ｍＲＮＡ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）及びＤＭＥＭで作製した野生型または２つの主要な脱エピトープ化Ａｒａｈ２変異体のいずれかのｍＲＮＡ３０μｇ、または対照を、毎週または３週間ごとに静脈内注射した。
【０３５６】

【表９】

表９

群	感作（ピーナッツ抽出物）	投与	用量レベル（μg／マウス）	投与頻度	チャレンジ（i. p. 、i. d. またはi. g）
1	Yes	シャム (PBS)	0	7（週1回）	ピーナッツ
2	No (PBS)	対照 (PBS)	0	7（週1回）	ピーナッツ
3	Yes	WT Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	ピーナッツ
4	Yes	WT Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	天然Arah2
5	Yes	WT Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	ピーナッツ
6	Yes	WT Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	天然Arah2
7	Yes	DE 1001 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	ピーナッツ
8	Yes	DE 1001 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	天然Arah2
9	Yes	DE 1001 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	ピーナッツ
10	Yes	DE 1001Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	天然Arah2
11	Yes	DE 764 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	ピーナッツ
12	Yes	DE 764 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	3（3週間毎）	天然Arah2
13)	Yes	DE 764 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	ピーナッツ
14	Yes	DE 764 Arah2 mRNA	30 μg / 250 μL	7（週1回）	天然Arah2

【０３５７】

最初のｍＲＮＡ注射後の３週目、５週目、７週目に血清を採取した。ｍＲＮＡ投与の終了後（７週目）、マウスにピーナッツ抽出物または精製天然Ａｒａｈ２を投与し、その後のアレルギー反応をモニターしてスコア化した（行動学的、生理学的、及び血清学的測定）。

【０３５８】

予想される結果

【０３５９】

脱エピトープ化Ａｒａｈ２の投与後、マウスが、臨床パラメータのスコアの統計的に有意な低下、例えば、アナフィラキシー、マウス肥満細胞プロテアーゼのレベルの低下、及び、抗Ａｒａｈ２ＩｇＥの相対レベルの低下を示した場合、減感作は成功したと見なす。

【０３６０】

変異体低アレルゲン性ピーナツアレルゲンＡｒａｈ１及びＡｒａｈ２をコードする核酸の特定の特徴を本明細書中に例示及び説明したが、様々な改変、置換、及び等価物が、当業者であれば可能であろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、これらの変形及びその使用の真の精神の範囲内に入るすべての改変及び変更をカバーすることを意図していることを理解されたい。

【０３６１】

実施例１１：Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１（配列番号１０）の生物活性の特性評価

【０３６２】

目的：Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１の生物活性を実証すること

【０３６３】

方法：

【０３６４】

組換えＡｒａｈ２の発現及び精製

【０３６５】

組換えＡｒａｈ２配列（ＷＴまたはＢ１００１）をｐＥＴ２８プラスミドにクローニングし、Ｈｉｓ標識ＴＲＸタンパク質及びＴＥＶプロテアーゼ切断部位をコードする配列に融合した（N-Trx-His X6-TEV site-Ara h 2-C）。プラスミドをＯＲＩＧＡＭＩ（ＴＭ）細胞（New England Labs）に形質転換し、Ｔ７プロモーターの転写制御下でタンパク質を発現させた。細胞を、ＯＤが０．５～０．８に達するまで、３７°Ｃにて２５０ＲＰＭで振とうしながら培養し、１ｍＭのＩＰＴＧの添加及び３７°Ｃでのさらに３時間のインキュベーションによって誘導を実施した。細胞をペレット化し（３０分間４８００ｇ）、１０倍（ｗ／ｖ）溶解緩衝液（５０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）、３５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％ｖ／ｖのグリセロール、０．２％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００、５Ｕ／ｍｌのベンゾナーゼ（Sigma）、０．２ｍのＭＰＭＳＦ（Thermos-Fisher Scientific）、１ｍｇ／ｍｌのリゾチーム（Angene））で再懸濁した。超音波処理（振幅６０％、１０秒間オン、３０秒間オフ、２分間）によって細胞を破砕した。溶解液を遠心分離し（１５０００ｇ、４５分）、上清を、結合緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．０）、３５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％ｖ／ｖのグリセロール）で事前洗浄したＮｉ－ＮＴＡカラムにロードした。ビーズを、イミダゾール濃度を高めた結合緩衝液で洗浄し、個々の画分を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。目的のタンパク質を含む画分をプールした。ＳｎａｋｅＳｋｉｎ透析チューブ３．５ｋＤａ（Thermo Fisher Scientific）を用いて、室温で一晩透析して、緩衝液をイミダゾール非含有結合緩衝液に交換した。翌日、Ｈｉｓ標識ＴＥＶプロテアーゼ（ＴＥＶ：ｒＡｒａｈ２）を１：３０モル比でサンプルに添加し、室温で３時間インキュベートした。結合緩衝液で事前洗浄したＮｉ－ＮＴＡカラム上に溶液をロードして、Ｔｒｘ－Ｈｉｓ標識部分及びＴＥＶプロテアーゼを除去した。フロースルー及びＡｒａｈ２含有２０ｍＭイミダゾール洗浄画分を収集し、３ｋＤａセントリコーン（Amicon, Mercury）によって約５ｍｇ／ｍｌに濃縮し、ＰＢＳ緩衝液（Cytiva）で予備洗浄したＳｕｐｅｒｄｅｘ７５ｐｇＳＥＣカラムにロードした。単量体Ａｒａｈ２を含む画分をプールし、濃度を測定し、伸長係数（ＷＴでは０．８１７、Ｂ１００１では０．６７２）を用いて、２８０ｎｍにおける吸光度から算出した。タンパク質を液体窒素中で急速凍結させ、使用するまで－８０°Ｃで保存した。

【０３６６】

円偏光二色性

【０３６７】

精製したＡｒａｈ２タンパク質（ＷＴ及びＢ１００１）をＰＢＳ緩衝液で０．３ｍｇ／ｍｌに希釈し、室温で２００～２６０ｎｍのスペクトルについて円偏光二色性分析（ＣＤ）（Chirascan(TM)-plus CD Spectrometer）を行った。二次構造の熱安定性分析のために、ＣＤスペクトル（２００～２６０ｎｍ）を以下の条件で記録した：２０～９０°Ｃの温度から１℃／分の速度及び１ｍｍの経路長で昇温させた。

【０３６８】

ウエスタンブロット分析

【０３６９】

２μｇの精製タンパク質をβ－メルカプトエタノールを含むＬｅａｍｍｅｌｉサンプル緩衝液（Bio Rad）と混合し、無染色Ｍｉｎ－ＰｒｏｔｅａｎＴＧＸゲル（Bio Rad）に加えた。転写前に、ゲルをＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｅｒ（登録商標）ＣｈｅｍｉＤｏｃ（ＴＭ）ＸＲＳ＋（Bio Rad）で可視化し、Ｔｒａｎｓｂｌｏｔ　ｔｕｒｂｏ　ＰＶＤＦ膜（Bio Rad）に転写した。ＰＢＳＴ中の５％脱脂乳（Sigma）を使用して、室温で１時間ブロッキングを行った。Ａｒａｈ２の検出は、１：１０００のＰＡｂウサギ抗Ａｒａｈ２（Indoor）と１：１００００の二次抗体抗ウサギＨＲＰを使用して行った。バンドの可視化には、フェムトグラムＥＣＬ基質を用いた。

【０３７０】
ＳＥＣ－及びＲＰ－ＨＰＬＣ
【０３７１】
精製した天然Ａｒａｈ２（Indoor)）、ＷＴＡｒａｈ２及びＢ１００１Ａｒａｈ２をＳＥＣ－ＨＰＬＣによって３０℃で分析した（UHPLC Arc System, Waters；Column XBrige Protein BEH SEC 200A、移動相としての０．１Ｍのリン酸ナトリウム緩衝液中に２．５μｍ）。分子量は、ゲルろ過分子量標準（Biorad）に基づいて推定した。また、タンパク質を、５０°ＣでＣ１８カラム、移動相ＡとしてＨＰＬＣグレードの水中の０．１％ＴＦＡ及び移動相Ｂとしてアセトニトリル中の０．１％ＴＦＡを用いて、ＲＰ－ＨＰＬＣによって分析した（UHPLC Arc System, Waters; Column Jupiter 5 um C18 300A, 250x4.6 mm）。両方とも、分析検出は、ＵＶ２２０ｎｍで行った。
【０３７２】
アレルギー患者用サンプル
【０３７３】
すべてのサンプルは、ピーナッツに対するアレルギー反応の最近の病歴を有し、臨床的にピーナッツアレルギーと診断された患者から得た。すべての協力医療施設は、この研究のためのサンプル提供について、現地の施設審査委員会の承認を得た。イスラエルの協力医療施設で、ピーナッツアレルギー患者から、ヘパリン処理チューブを用いて全血を採取した。血漿を、８００ｇで１０分間遠心分離し、上相を分離して単離した。末梢血単核球（ＰＢＭＣ）は、Ｓｅｐｍａｔｅチューブ（Stemcell, Canada）を用いて、製造業者の指示に従って血液サンプルから抽出し、エンドトキシンを含まない材料を用いて凍結保存した：ＦＢＳ（Biological industries, ISR）、ＰＢＳｘ１０ｐＨ７．４（Gibco, US）、超高純度ｄｄｗ（Bioline, ISR）、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Stemcell）。好塩基球活性化試験のための新鮮全血も、Ａｍｅｒｉｍｍｕｎｅ社により米国各地の臨床施設から入手した。
【０３７４】
追加の血漿、血清（ゲル相ロックチューブにより分離）、及びＰＢＭＣは、以下のパートナー及びプロバイダーから同等の分離手法を用いて入手した：スタンフォード大学Ｎａｄｅａｕ研究室（米国カリフォルニア州）、Ａｂｂａｌｔｉｓ社（英国）、慈恵大学海老沢研究室（東京、日本国）、ニーニョ・ヘスス大学病院（マドリード、スペイン国）、Ａｃｃｅｓｓ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ社（米国カリフォルニア州）、Ａｍｅｒｉｍｍｕｎｅ社（米国バージニア州）、三重大学医学部附属病院（日本）。臨床サンプルの補足情報は、補足データに記載されている。
【０３７５】
ＥＬＩＳＡによるＩｇＥ及びＩｇＧレベルの分析
【０３７６】
Ｍａｘｉｓｏｒｐ９６ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific）を、ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌの１００μｌの天然Ａｒａｈ２またはＢ１００１で、４°Ｃで一晩被覆した。その後のすべてのステップは、ステップ間にＰＢＳＴ洗浄（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）を挟み、室温で実施した。滴定曲線は、各血清または血漿サンプルを、１０倍希釈後に連続的に２．１倍希釈（ＩｇＥ検出用）、または２５倍希釈後に連続的に２．５倍希釈（ＩｇＧ用）で作成した。プレートをＰＢＳＴ＋２％ＢＳＡ（Sigma）で２時間ブロックし、滴定されたサンプルまたはサンプルなし（ブランク）で２時間インキュベートし、次いで、１：５，０００のＨＲＰ－ヤギ抗ヒトＩｇＥ（Abcam）または１：２０，０００のＨＲＰ－ロバ抗ヒトＩｇＧ（Jackson labs）で１時間インキュベートした。最後に、プレートを１００μｌの１－Ｓｔｅｐ Ｕｌｔｒａ ＴＭＢ（Thermofisher）と共に発色するまでインキュベートし、１００μｌの０．５ＭのH_2SO_4を添加して反応を停止させた。Ｓｙｎｅｒｇｙ ＬＸマイクロプレート分光光度計（Biotek, Vermont）を用いて４５０ｎｍでの光学濃度を記録し、ブランクウェル（サンプルなし）のＯＤを差し引き、Ｐｒｉｓｍ Ｇｒａｐｈｐａｄを用いて曲線下面積を算出した。

【０３７７】
ＲＢＬ　ＳＸ－３８細胞の脱顆粒アッセイ
【０３７８】
ＲＢＬ　ＳＸ－３８細胞は、ボストンのＢＩＤＭＣの許可を得て、カリフォルニア大学デンバー校のＳｔｅｐｈｅｎ　Ｄｒｅｓｋｉｎ教授から受け取った。細胞を、通気性フラスコ（Greiner）中で、８０％のＭＥＭ（Gibco, US）、２０％のＲＰＭＩ－１６４０、５％のＦＣＳ（非熱不活性化）、２ｍＭのＬ－グルタミン、ペニシリン－ストレプトマイシン（Biological industries, ISR）。及び１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８（Formedium, UK）を含有した維持培地中で、３７°Ｃ、５％CO_2で培養した。細胞を分割し、アッセイ培地（ＲＰＭＩとＧ４１８を含まない）中で４８時間培養した。アッセイ当日、０．０５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Gibco）を用いて細胞を分離し、３００ｇで１０分間遠心分離し、１０％の臨床サンプル（ピーナッツアレルギー患者由来の血漿または血清）を添加したアッセイ培地中に250×10^5個の細胞／ｍｌまで再懸濁した。非ヘパリン化血漿に３０Ｕ／ｍｌナトリウム－ヘパリン（Sigma）を添加し、室温で１０分間インキュベートした後、凝固を防止するために細胞に添加した。翌日、天然Ａｒａｈ２、Ｂ１００１、または陰性対照（KLH, Sigma）をＴｙｒｏｄｅ緩衝液中で１０倍に連続希釈し、活性化溶液を作製した。緩衝液組成：１３７ｍＭのＮａＣｌ、２．７ｍＭのＫＣｌ、０．４ｍＭのNaH_2PO_4、０．５ｍＭの$MgCl_2$、１．４ｍＭの$CaCl_2$、１０ｍＭのＨｅｐｅｓ（ｐＨ７．３）、５．６ｍＭのグルコース、０．１％のＢＳＡ（Sigma Aldrich, ISR）、ｐＨは７．４に調整、８０％ｄｄｗ、２０％Ｄ２Ｏ重水（Sigma Aldrich）の水組成で作製した。細胞をｄｄｗのみで作製したＴｙｒｏｄｅ緩衝液で３回洗浄し、１００μｌの活性化溶液を適切なウェルに添加した（二連で）。また、総脱顆粒を測定するために、溶解緩衝液（１％Ｔｒｉｔｏｎｘ－１００を含有するＴｙｒｏｄｅ緩衝液、Fisher Scientific）と、ベースライン脱顆粒を測定するためのＴｙｒｏｄｅ緩衝液のみを用いて、二連ウェルを作製した。その後、細胞を、３７℃、５％CO_2で１時間インキュベートした。インキュベーション直後に、３０μｌの各ウェルを、透明な非結合性９６ウェルプレート（Greiner Bio-one）中の対応するウェルに移し、０．１Ｍクエン酸で最終濃度１．３６８ｍｇ／ｍｌ、ｐＨ４．５に作製した５０μｌの比色基質４－ニトロフェニルＮ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミニド（Sigma）を添加した。３７°Ｃで１時間穏やかに振とうした後、ｐＨ１０．７のグリシン１００μｌで反応を停止させた。信号については４０５ｎｍで、バックグラウンド吸光度については６３０ｎｍで光学密度を読み取った。正味脱顆粒％は、バックグラウンド吸光度を差し引き、ベースライン脱顆粒を差し引き、総脱顆粒数で割ることにより計算した。
【０３７９】
好塩基球活性化試験
【０３８０】
ヘパリン処理したチューブに新鮮全血を１００μｌずつ分注した（個々のＦＡＣＳチューブまたは２ｍｌの深さの９６ウェルプレートに）。アレルゲン及び対照を、ＲＰＭＩ－１６４０（Biological Industries）で希釈して２倍株とし、チューブに１：１で加えた（最終量は２００μｌ）。使用した用量は０．０３～１０５ｎｇ／ｍｌの範囲であり、用量は利用可能な容量に依存して１０倍または３倍の中間段階（１、３、１０、３０など）であったが、６～１０倍以上の濃度であった。粗ピーナッツ抽出物（ＣＰＥ）、ｆＭＬＰ（Sigma）、及びヤギ血清抗ヒトＩｇＥ抗体（Ｄｒｅｓｋｉｎ研究所からの寄贈）を陽性対照として使用し、ＫＬＨ（Sigma）を１０５ｎｇ／ｍｌで陰性対照として使用した（容量が利用可能であれば６濃度のＣＰＥ）。サンプルを、３７°Ｃ、５％CO_2の加湿インキュベーター中で３０分間インキュベートした後、氷上で５分間インキュベートして反応を停止させた。次いで、サンプルを氷上で３０分間、以下のマーカー：ＣＤ２０３ｃ、ＣＤ６３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ４５、ＣＤ１２３（Biolegend）に対する蛍光色素結合抗体で染色した。赤血球溶解は、製造業者の指示に従って溶解液（ＢＤＦＡＣＳ）を用いて行い、細胞をＰＢＳｘ１で洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。好塩基球検

出のために細胞をゲーティングし（細胞＞一重項＞ＣＤ４５高値／ＳＳＣ低＞ＣＤ１２３高／ＨＬＡ－ＤＲ低＞ＣＤ２０３ｃ高）、活性化率（％ＣＤ６３陽性好塩基球）を測定した。チューブ当たり少なくとも５００個の好塩基球を分析し、非活性化ウェルをゲーティングすることによってベースラインを設定した。Ａｒａｈ２またはＣＰＥの少なくとも１つの濃度で５％以上の活性化を示したサンプルのみを分析に含めた。患者の平均化及びカーブフィッティングは、Ｐｒｉｓｍ　Ｇｒａｐｈｐａｄで行った。

【０３８１】

Ｔ細胞活性化試験：増殖試験及びサイトカインＥＬＩＳＡ

【０３８２】

使用したすべての材料はエンドトキシンを含まないことが確認されている。ＷＴＡｒａｈ２またはＢ１００１（２０ＡＡオーバーラップを有する３５～４１量体、ペプチド２．０、ＶＡ、ＵＳＡ）の全配列をカバーするペプチドプールを、ＤＭＳＯ（Alfa Aesar, MA, USA）中で作製した。ピーナッツアレルギー患者ＰＢＭＣを、ＰＢＳ＋０．５％ＦＢＳ中の１０μＭのＣｅｌｌｔｒａｃｅ　ｖｉｏｌｅｔ（Thermo-Fisher）で３７°Ｃにて２０分間染色し、次いで、ＲＰＭＩ＋５％ＦＢＳによる５分間クエンチした。細胞を洗浄し、１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Biological industries）を添加したＸ－ｖｉｖｏ１５培地（Lonza, Switzerland）中で再懸濁し、９６ウェルの丸底プレートに２～２．５×10^5個の細胞／ウェル及び４～８反復（利用可能な細胞数に従って）で播種した。ペプチドプールをウェルに、２００μｌ／ウェルで、ペプチドあたり最終濃度１０μｇ／ｍｌになるように添加した。同等希釈液を非刺激ウェルに添加し、ＣＰＥを陽性対照として用いた。細胞を、３７°Ｃ、５％CO_2の加湿インキュベーターで７日間インキュベートした。その後、細胞をペレット化し、培地を除去して、サイトカインＥＬＩＳＡ用に保持した。収集した細胞を生存色素（近赤外線ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色、Thermo-Fisher）で染色し、次いで、蛍光色素結合抗体（Biolegend, USA）でＣＤ３及びＣＤ４を染色し、フローサイトメトリーで分析した。細胞を、生きている増殖Ｔヘルパーについてゲーティングした（一重項＞ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤｌｏｗ＞ＣＤ４ｈｉｇｈ／ＣＤ３ｈｉｇｈ＞Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ　ｄｉｍ、最終的な増殖ゲーティングはベースライン及び陽性対照サンプルによって誘導した）。増殖％、刺激指数（Ｓ．Ｉ、平均アレルゲン活性化／平均ベースライン）マン・ホイットニーのＵ検定（ＭＷ）の有意性を計算した（Graphpad Prism）。ＷＴのＳ．Ｉ≧２かつＭＷのｐ値≦０．１の場合にのみ、各サンプルを真の活性化と見なし、データに含めた。最終的な平均値については、各患者のデータをベースライン複製の１つの値に正規化した。

【０３８３】

保持培地中のＩＬ５、ＩＬ１３、及びＩＦＮγレベルの検出のために、ＥＬＩＳＡを、サンドイッチＥＬＩＳＡ用に最適化された非コンジュゲート／ビオチン化抗体対（Mabtech, Sweden）を用いて実施した。Ｍａｘｉｓｏｒｐプレートを、炭酸水素塩緩衝液（Sigma）中の１μｇ／ｍｌで５０μｌの非コンジュゲート捕捉抗体で４°Ｃにて一晩被覆した。翌日、ＰＢＳＴ－２％ＢＳＡ中の組換えＩＬ５、ＩＬ１３またはＩＦＮγ（ペプロテック、ＩＳＲ）を用いて標準曲線を作成した。プレートをＰＢＳＴ＋２％ＢＳＡで室温にて２時間ブロックし、次いで、５０μｌのアッセイ培地または適切な標準と共に４°Ｃで一晩インキュベートした。最終日に、プレートをＰＢＳＴ＋２％ＢＳＡ中の１μｇ／ｍｌのビオチン結合検出抗体と共に１時間インキュベートし、次いで、ＨＲＰ結合ストレプトアビジンと共に１時間インキュベートした。最後に、プレートを、１００μｌの１－Ｓｔｅｐ　Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢで発色するまでインキュベートし、０．５ＭのH_2SO_4を１００μｌ加えて反応を停止させ、４５０ｎｍで光学濃度を記録した。標準曲線を非線形回帰モデルでフィッティングし、個々の値を補間するために使用した。ＷＴのＳ．ＩとＭＷのｐ値を計算し、真の活性化サンプル（Ｓ．Ｉ≧２、ｐ値≦０．１）のみをデータに含めた。最終的な平均値については、各患者のデータをベースライン複製の１つの値に正規化した。

【０３８４】

マウスアレルギーモデル研究

【０３８５】

すべてのマウス試験は、Ｐｏｒｓｏｌｔ　ＳＡＳ（France）の委託研究として実施された。ナイーブ雌Ｃ３Ｈ／ＨｅＪマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, U.S）を、ピーナッツと大豆を含まない飼料で３週齢まで飼育した。２５０μｌのＰＢＳに１０μｇの粘膜アジュバントであるコレラ毒素（List Laboratories, CA, USA）を混ぜた２ｍｇのピーナッツ脱脂粉（タンパク質５０％）を週１回で４週間経口投与し、最終投与量は２倍の４ｍｇとした。安全性試験：マウスに、最終量２５０μｌの天然Ａｒａｈ２またはＢ１００１を、腹腔内注射により投与した。翌日、Ｂ１００１で変化したマウスを２つのサブグループに無作為に分け、より高用量のＡｒａｈ２またはＢ１００１を再度投与した。体温は、ベースライン時及び各投与の１０分後、２０分後、３０分後、４５分後、６０分後、及び１２０分後に直腸で測定した。アナフィラキシー症状は、下記の一般的な臨床スコアリングシステムを用いて、各投与の１２０分後に評価した（０－臨床症状なし。１：目や口の周りの浮腫／腫れ。２：アクティビティの低下。３：腹臥位で１分以上動かない。４：ひげ刺激に反応せず、つついても反応が少ないかまたは反応しない。５：エンドポイント：振戦、痙攣、死亡）。

【０３８６】

経口免疫療法（ＯＩＴ）試験：安全性試験と同様にマウスを感作し、別の対照は無処置のままとした。感作後、ピーナッツ粉３５０μｇを２５０μｌのＰＢＳに混和したものをマウスにｉ．ｐ．投与し、臨床スコアが２以上であるか、または体温が１．５℃以上低下しなかったマウスを試験から除外した。最後の感作投与の２週間後に開始して、ＰＢＳ（偽のＯＩＴ）、２５０μｌのＰＢＳ中に１５ｍｇのピーナッツ粉を含むもの、または、１０００μｌのＰＢＳ中に１０００μｇのＢ１００１を含むもの（５００μｌを超える量の単回投与を避けるため、１日２回に分けて）を週５回、３週間経口投与することによってマウスを減感作した。最後の減感作投与の１２日後、２５０μｌのＰＢＳ中に３５μｇの天然Ａｒａｈ２を含むものをｉ．ｐ．注射することによってマウスに投与し、アナフィラキシースコアリング及び体温を上記のように記録した。生存マウスを５日後に　殺し、腸間膜リンパ節（ＭＬＮ）を採取し、１００Ｕ／ｍＬのペニシリンと１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Pen/strp mix）を加えた氷冷ＰＢＳに移した。ＭＬＮを小片に切断し、ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳディソシエータを用いてホモジネートし、ＴｅｘＭＡＣＳ培地（Miltenyi Biotec）で予め湿潤させた７０μＭの細胞ストレーナーにホモジネートを通すことによって細胞を単離した。その後、ＭＬＮ細胞を、１０％のＦＢＳ及び２００μｇ／ｍｌの天然Ａｒａｈ２を含むｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ　ｍｉｘを含有するＴｅｘＭＡＣＳ培地中の９６ウェルＵ底プレートに７２時間播種した（４００，０００個の細胞／１００μｌ）。培養培地を採取し、製造業者の指示に従ってルミネックスパネルアッセイ（ProcartaPlex, ThermoFisher Scientific）を用いてＩＬ－４、ＩＬ－５、及びＩＬ－１３のレベルを測定した。データは、Ｂｉｏ－Ｐｌｅｘ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェア（Biorad）で分析し、濃度は対応するサイトカインの標準曲線を用いて算出した（検出範囲内の値は０に修正した）。すべてのデータは、マン・ホイットニーのＵ検定により有意性について分析した。

【０３８７】

結果

【０３８８】

図１５は、アレルゲン脱エピトープ化のための患者サンプルに基づくパイプラインの一般的な概要を示す。一実施形態では、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及び血漿または血清は、多様な背景を持つ臨床的に確認されたアレルギー患者の血液サンプルから単離される。新鮮な血液は協力しているイスラエルの医療施設から提供され、加工または冷凍された分離株は世界中の様々な場所から入手される（学術及び臨床機関との共同研究を通じて入手するか、または認可を受けた民間の臨床サンプル提供者から購入する）。コンビナトリアルｓｃＦｖ抗体ファージ提示ライブラリを作成し、スクリーニングすることによって、ま

たは、単一細胞ソーティングフローサイトメトリーによって、患者ＰＢＭＣから、自然発生のアレルゲン特異的Ｂ細胞クローンを単離した。これらのクローンを用いて、患者由来のアレルゲン特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）を作製した。次に、酵母提示アレルゲン変異体飽和ライブラリを作製し、アレルゲン特異的ｍＡｂでスクリーニングすることにより、確認エピトープをマッピングした。線状エピトープマッピングは、患者の血清／血漿中のＩｇＥまたはｍＡｂと、スライディングウィンドウのカバレッジまたはアレルゲンの全配列を示すペプチドアレイとの結合を分析することによって行った。本明細書に記載された包括的マッピングプロセス及び独自のバイオインフォマティックプロセスは、可能な限り最小限の改変で、慎重にデザインされたアレルゲン変異体に適用される。これらの変異体を組換え発現させ、生化学的に特性化して、天然アレルゲンに対する安定性及び全体的な構造的類似性を検証した。次いで、患者の血清／血漿を用いたＥＬＩＳＡ及びＲＢＬ－ＳＸ３８アッセイにより、十分に折り畳まれた変異体及びＷＴアレルゲンのＩｇＥ結合及びアレルゲン性を比較した。その後、主要な候補変異体を、アレルゲン性が実質的に低下した変異体が得られるまで、デザイン－検証プロセスの反復のための入力として使用した。

【０３８９】

Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１の生化学的特性評価

【０３９０】

Ａｒａｈ２のマッピングと脱エピトープ化の後に、基本的な同一性を保持しながら実質的に安全性を高めるために必要な最小限の変異の数及び同一性を決定した。これらの変異を組み合わせて、最終的にＷＴのＡｒａｈ２に対して８０％の配列同一性を有する変異体をデザインし、発現させた。Ｂ１００１と名付けられたこの新規変異体の生化学的特性を評価した。

【０３９１】

Ａｒａｈ２に対するその基本的同一性は、市販のＡｒａｈ２特異的ウサギポリクローナル抗体（ｐＡｂ）を用いてウエスタンブロット分析（図１６Ａ）を行うことにより確認された（図１６Ａ）。実際、ｐＡｂは、天然のＡｒａｈ２（２つのバンドは既知の異性体に相当する）、組換え発現ＷＴＡｒａｈ２及びＢ１００１に対して同様に特異的に結合した（図１６Ａ、右ペイン）。また、組換えＷＴＡｒａｈ１をピーナッツ関連の陰性対照として用い、ＢＳＡを一般的な陰性対照として用いたところ（レーン４、５）、ｐＡｂｓはどちらにも結合しなかった。ウエスタンブロット分析の前に、分離したタンパク質の対照をローディングすることにより、膜上の５つのタンパク質すべての可視的な存在が確認された（図１６Ａ、左ペイン）。

【０３９２】

Ａｒａｈ２は１７ｋＤａの単量体タンパク質であり、その大部分はα－ヘリックスから構成され、４個のジスルフィド結合を持ち、顕著に高い熱安定性を示した。サイズ排除ＨＰＬＣを用いて、Ｂ１００１の分子量及びオリゴマー状態を推定し、そのプロファイルを組換えＷＴ及び天然Ａｒａｈ２と比較した。３つのタンパク質はすべて、同様の保持時間及び１７～１８ｋＤａの推定分子量を有した（図１６Ｂ）。次に、Ｂ１００１の二次構造を円偏光二色性（ＣＤ）により調べ、ＷＴタンパク質と比較した。両タンパク質は、天然タンパク質と同様の、典型的なα－ヘリックススペクトル（図１６Ｃ、左ペイン）を示した。Ｂ１００１とＷＴＡｒａｈ２の二次構造の熱安定性を、温度を徐々に上げながら（２０～９０°Ｃ）ＣＤを行うことにより調べた。両タンパク質とも、９０°Ｃでも二次構造を保持していた（図１６Ｃ、右ペイン）（Ａｒａｈ２で以前に示した）。

【０３９３】

要約すると、Ｂ１００１変異体は、ＷＴＡｒａｈ２タンパク質に匹敵する分子量、二次構造、及び熱安定性を有する安定な単量体に折り畳まれることがわかった。さらに、Ｂ１００１は、Ａｒａｈ２特異的ｐＡｂに結合することにより、Ａｒａｈ２に対して明確な免疫交差反応性を示すことがわかった。これらの結果は、Ｂ１００１が、Ａｒａｈ２の変異体の本質的な同一性を保持していることを意味する。

【０３９４】
Ａｒａｈ２変異体Ｂ１００１に対する患者抗体結合の差次的減少
【０３９５】
免疫療法のためにアレルゲン性を低下させるようにアレルゲンを操作することは、当然ながら、その免疫原性を損なう可能性が高く、したがって、これらの相反する結果の間の妥協が必要となる。エピトープ－抗体相互作用のレベルでは、これは、病原性ＩｇＥの結合を減少させることと、ＩｇＧ結合能が保持されるように天然アレルゲンに対する本質的な同一性を保持することのバランスをとることを意味する。
【０３９６】
修飾によってＩｇＥとＩｇＧの結合がどのように変化するかを調べるために、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。天然Ａｒａｈ２またはＢ１００１で被覆したプレートを、２４人のピーナッツアレルギー患者から採取した連続希釈血漿または血清とインキュベートした。得られた曲線は形状が著しく異なっていたが、これは、各患者の抗体レパートリーを形成する複数の因子間の複雑な相互作用を考慮すると予想されたことであった。このことは、単一の希釈における結合を比較したり、ＥＣ５０値を導出したりすることは、部分的で誤解を招く可能性のある指標を提供する可能性があることを示唆する。そこで、ＡＵＣ（area-under-the-curve：曲線下面積）値の差を比較した。ＡＵＣ値は臨床的に解釈できる値ではないが、局所的な偏りや回帰モデルのフィッティングによる歪みはない。
【０３９７】
ＩｇＥ画分及びＩｇＧ画分の両方において、Ｂ１００１への結合が有意に減少したことがわかった。なお、この減少は、ＩｇＧ分画では、顕著により緩やかであった（図１７Ａ、ウィルコクソン順位和検定のＰ値＜０．０００１）。実際、個々の［Ｂ１００１のＡＵＣ／Ａｒａｈ２のＡＵＣ］比を観察すると、すべての患者において、ＩｇＧ分画よりもＩｇＥ分画の方が、減少が顕著であり、比の中央値はＩｇＥ分画で０．１７３、ＩｇＧ分画で０．５９３であった（図１７Ｂ、ウィルコクソンＰ値＜０．０００１）。これらの結果は、Ａｒａｈ２脱エピトープ化プロセスが、ＩｇＧ結合部位よりもＩｇＥ結合部位を選択的に減少させることに成功したことを示している。
【０３９８】
Ｂ１００１のアレルゲンは天然のＡｒａｈ２と比較して著しく低下した
【０３９９】
アレルゲンに対する患者のＩｇＥレパートリーの全体的な結合強度は、抗原特異的力価、クローンの多様性、個々のクローンの結合強度などの複数の因子によって形成される。しかしながら、或る分子のアレルゲン性は、これらの因子によって異なる程度に影響される可能性があり、単純な結合アッセイからは容易に予測できない別個の特性である。アレルゲン性に影響を与える他の重要な因子としては、とりわけ、患者のアレルゲン特異的ＩｇＥ相対力価や、エフェクター細胞の活性化に立体的に適合する特異的エピトープの結合などが挙げられる。したがって、ＩｇＥ結合の低下はアレルゲン性の低下を示す場合もあれば、示さない場合もあり、別途検討する必要がある。
【０４００】
ヒト化ラット好塩基球様ＲＢＬＳＸ－３８細胞株を活性化するＢ１００１の能力を試験した。この広く使用されている細胞株は、細胞脱顆粒によりアレルゲン刺激に応答するようにヒト患者サンプルで感作することができる。脱顆粒の速度は、刺激分子のアレルゲン性に比例し、顆粒状酵素β－ヘキソサミニダーゼの比色基質との酵素反応によって測定することができる。ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、臨床的に検証された、様々な背景を持つ２８人のピーナッツアレルギー患者から採取した１：１０の血漿または血清で一晩感作した後、０．０１～１０，０００ｎｇ／ｍｌのＡｒａｈ２、Ｂ１００１、または非関係陰性対照タンパク質キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）のいずれかで細胞を刺激した。驚くべきことに、ポイントごとの平均値をプロットしてみると、Ｂ１００１は、試験した全濃度範囲において、ＲＢＬの脱顆粒を誘発する能力を本質的にすべて失い、ＫＬＨと同様の無反応性を示すことがわかった（図１８Ａ）。実際、試験したすべてのサンプルで、

Ｂ１００１に対する応答は、天然のＡｒａｈ２と比較して１０００分の１以下に減少した（データは示さず）。これらの結果は、Ｂ１００１の脱エピトープ化プロセスがアレルゲン性を劇的に低下させたことを実証した。

【０４０１】

ＲＢＬアッセイは、複数の患者サンプルを用いて複数の変異体のハイスループット比較を可能にし、修飾アレルゲンのエンジニアリング及び検証のための強力なツールである。しかしながら、患者の反応を予測する上でのこのアッセイの感度及び精度は、ラット細胞に対するヒト血清細胞毒性、表面ＦｃεＲＩ分子数の変動及びヒトＦｃεＲＩβサブユニットの欠如、ヒトＩｇＧ受容体の欠如、及び個人の免疫背景の欠如などのいくつかの因子によって制限される可能性がある。一方、好塩基球活性化試験（ＢＡＴ）は十分に確立されたサイトメトリーアッセイであり、その精度、感度、及び臨床的予測データを提供する能力により、医師や研究者に支持されている。Ａｒａｈ２と比較したＢ１００１の安全性を試験するため、イスラエル国及び米国の４４人のピーナッツアレルギー患者のコホートで、一般的に認められたプロトコルを用いて、０．０３～１０，０００ｎｇ／ｍｌの範囲のアレルゲン濃度でＢＡＴアッセイを実施した（患者１人当たりの試験ポイントの範囲及び数は、使用可能な血液量によって異なる）。両タンパク質の相対的アレルゲン性は、ポイントごとの平均値をプロットし、得られた曲線を４パラメータロジスティック回帰モデルにフィッティングし、各曲線のＥＣ５０値を抽出することによって推定した。Ａｒａｈ２のＥＣ５０は３９．３であり、Ｂ１００１のＥＣ５０は１１、９８６であり、平均してＢ１００１はＡｒａｈ２よりも約３００倍アレルゲン性が低いことがわかった（図１８Ｂ）。これらの結果は、Ｂ１００１の安全性がＡｒａｈ２よりも高いことを示し、Ｂ１００１の免疫療法への適用を支持した。

【０４０２】

Ｂ１００１のＴ細胞免疫原性

【０４０３】

免疫療法は、既存のアレルゲン特異的ＴヘルパークローンのＴｈ２ＡからＴｈ１／ｉＴｒｅｇ表現型への再プログラミングに依存することが十分に確立されている。これは、元のＴｈ２Ａスキューイングを伴わずにこれらのクローンの慢性的な活性化を引き起こす、アレルゲン性以下の用量への慎重な曝露によって達成されると考えられている。したがって、修飾アレルゲンが有効な免疫療法薬となるためには、既存のアレルゲン特異的Ｔｈクローンに対して少なくともある程度の免疫原性を保持していなければならない。これまでのところ、インビトロＴ細胞活性化アッセイは、臨床的有効性とある程度予測可能な程度まで確実に相関するようには調整されていない。しかしながら、このようなアッセイは、分子の免疫原性が決定的に損なわれているかどうかを評価するための確固たるアプローチであることに変わりはない。

【０４０４】

修飾がＢ１００１Ｔ細胞の免疫原性を消失させないことを確認するために、ピーナッツアレルギー患者の末梢血Ｔ細胞を増殖検出色素で処理し、非修飾Ａｒａｈ２またはＢ１００１のいずれかの全配列を含む重複ペプチドのプールで刺激した。その後、両方の細胞を細胞増殖分析のために保持し、Ｔｈ２サイトカインＩＬ－５及びＩＬ－１３並びにＴｈ１サイトカインＩＦＮγの分泌のサンドイッチＥＬＩＳＡ分析のために培地を保持した（図１９Ａ）。データは、Ａｒａｈ２について予め定められた閾値をクリアしたサンプルからのみ収集した。その結果、Ｂ１００１に対するピーナッツアレルゲン性Ｔ細胞の反応性は、ＷＴと比較して低下したが、それでもなお、活性化は、試験したすべてのパラメータにおいて明らかにかつ有意に保持されていた（Ｂ１００１のＳ．Ｉ／ＷＴのＳ．Ｉ：増殖は６１％、ＩＬ－５は３９％、ＩＬ－１３は５０％、ＩＦＮγは７１％）。Ｂ１００１の全体的な反応性を評価するために、予め定められた閾値を用いて、各患者サンプルを、非反応性のもの、または、Ａｒａｈ２と比較して部分的または同程度の反応性を有するものに分類した。試験した全２１サンプルのうち、３つのサンプルは同等、１３のサンプルは部分的、５つのサンプルは非反応性と推定された（図１９Ｂ）。これらの結果は、ＩｇＥの

脱エピトープ化は、アレルゲンのＴ細胞免疫原性を部分的にしか損なわないことを示している。この知見は、免疫原性の完全な消失は、ごく一部の患者でのみ生じたことを示唆する。

【０４０５】

マウスピーナッツアレルギーモデルにおけるＢ１００１の安全性及び免疫療法効果

【０４０６】

現在のマウス食物アレルギーモデルは、ヒトとのいくつかの重要な違い、例えば、顕著なＩｇＧ媒介アナフィラキシー、異なる臨床応答（例えば、全身性低体温）、エピトープ特異性の違い、及び、ＩｇＧ４マウスホモログの欠如などに起因して、仮の臨床的洞察を提供するに過ぎない。アレルゲンはヒトに合わせた方法で特異的に脱エピトープ化されており、マウスを用いた研究の臨床的予測可能性はさらに制限された。それにもかかわらず、Ｃ３Ｈ／ＨｅＪモデルを用いたピーナッツアレルギー及び免疫療法に関する研究が数多く発表されており、顕著な臨床反応が得られることが示されている。このモデルを用いてプロトコルを確立し、ヒトにおける免疫療法のためのＢ１００１の潜在的な安全性及び有効性を裏付ける証拠を提供する２つの試験を実施した。

【０４０７】

まず、Ｃ３Ｈ／ＨｅＪマウスに、粘膜アジュバントであるコレラ毒素をＰＢＳに混ぜた脱脂ピーナッツ粉を週４回経口投与して感作させた。その後、マウスを２群に無作為に分け、天然型Ａｒａｈ２またはＢ１００１を順次増量して腹腔内（ＩＰ）注射により連続的にチャレンジした。マウスのアナフィラキシー反応は、１２０分後に一般的な臨床スコアリング指標（図２０Ａ、上部ペイン、０＝反応なし～５＝重篤な反応及び死亡）と、１２０分間にわたる体温の直腸記録（図２０Ａ、下部ペイン）によって評価した。最初の３０μｇのチャレンジ後、すべてのＡｒａｈ２ロードマウスは明らかな症状を示したが（ｎ＝１２、平均臨床スコア２．３±０．２、平均最大体温降下－７°Ｃ±０．７）、Ｂ１００１チャレンジマウス（ｎ＝１１）は全く反応を示さなかった。翌日、生存マウスに６０μｇのいずれかのタンパク質をチャレンジしたが、今度はどのマウスも反応を示さなかった（データは示さず）。これは、特定の用量を超える反復曝露が、おそらくエフェクター細胞の消耗に起因する無応答性をもたらすことを示唆する以前の知見と一致している。翌日、この影響を回避するために、Ｂ１００１でチャレンジ群をさらに無作為化し、１２０μｇのＡｒａｈ２（ｎ＝５、スコア３．２±０．２、最大体温降下－９．８°Ｃ±１．４５）またはＢ１００１（ｎ＝６、スコア０．３±０．２、体温降下なし）で再チャレンジした。このプロセスは最終日にも繰り返し、Ａｒａｈ２（ｎ＝３、スコア３．２±０．２、最大体温降下－９．８°Ｃ±１．４５）と、Ｂ１００１（ｎ＝３、スコア０、最大体温降下－０．３°Ｃ±０．１）についても同様の傾向が見られた。

【０４０８】

ピーナッツＯＩＴ（経口免疫療法）をＢ１００１ＯＩＴと並行して標準的に実施し、その免疫治療能を評価した。マウスを上記と同じプロトコルで感作し、対照として非感作マウス群を確保して、ピーナッツ粉抽出物（ＰＥ）、Ｂ１００１、またはビヒクルのＰＢＳのいずれかを１日５回×３週間投与するＯＩＴを行った。１２日間の回復期間の後、マウスを３５μｇの天然Ａｒａｈ２でＩＰチャレンジし、アナフィラキシースコアを記録した（図２０Ｂ、上部ペイン）。ピーナッツ感作は明らかであった（平均スコア：対照＝０、シャム＝３．５±０．５、ＭＷのｐ値＝０．０１）。ＰＥ及びＢ１００１の両処置群では、偽処置群（シャム）と比較してアナフィラキシースコアが有意に改善した（ＰＥ平均値２．７±０．４（ｐ＝０．１９　ｖｓ．シャム）、Ｂ１００１平均値２．４±０．４（ｐ＝０．０．８　ｖｓ．シャム））。

【０４０９】

ＯＩＴがＡｒａｈ２で刺激された腸間膜リンパ節細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響をさらに分析した。生存マウスのＭＬＮをチャレンジの５日後に採取及び分離した後、播種し、７２時間刺激した。次いで、Ｔｈ２サイトカインＩＬ－４、ＩＬ－５、及びＩＬ－１３のレベルを、Ｌｕｍｉｎｅｘパネルアッセイ（図２０Ｂ、底部パネル）を用いて細胞

培養培地中で検出した。３つのサイトカインのすべてで、ＰＥ処置群では、偽処置群と比較して、分泌の顕著な減少が認められた（ｐ値：ＩＬ－４＝０．１８、ＩＬ－５＝０．００５、ＩＬ－０．０２）。Ｂ１００１処置群でも同様の低下が認められたが、その程度は小さく、有意性も低かった（ｐ値：ＩＬ－４＝０．２６、ＩＬ－５＝０．０８７、ＩＬ－０．０９５）。

【０４１０】

要約すると、マウス試験からの知見により、Ｂ１００１がアレルギーモデルにおいて、Ａｒａｈ２と比較して明らかに優れたインビボ安全性プロファイルを有することが実証され、免疫療法剤としてのＢ１００１の可能性が支持された。

【０４１１】

実施例１２：Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５（Ｃ１５９）（配列番号１５６）及び他のＡｒａｈ１変異体の特性評価

【０４１２】

Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５の生化学的特性評価

【０４１３】

目的：ＷＴＡｒａｈ１と比較したＡｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５の特性評価

【０４１４】

Ａｒａｈ１タンパク質は三量体タンパク質であり、各単量体の重量は約６２ｋＤａであるため、天然分子量は約２００ｋＤａである。サイズ排除ＨＰＬＣを用いてＡｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５の分子量及びオリゴマー状態を推定し、そのプロファイルを、組換えＷＴ及び天然Ａｒａｈ１のタンパク質と比較した。図２１に示すように、３つのタンパク質はすべて、同様の保持時間と約２００ｋＤａの推定分子量を有していた。このことは質量測光法によってさらに検証され、その結果、図２３に示すように、ＷＴとＡｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５のタンパク質の分子量は約２００ｋＤａであった。したがって、Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５は、ＷＴＡｒａｈ１タンパク質と同様の分子量を有し、三量体を形成すると推論した。

【０４１５】

次に、Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５の二次構造プロファイルを円偏光二色性（ＣＤ）により調べ、ＷＴＡｒａｈ１タンパク質と比較した。両方のタンパク質は、図２２Ａに示すように、同様のＣＤプロフィールを示した。Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５の二次構造の熱安定性も評価し、温度を徐々に上げて（２０～９０°Ｃ）ＣＤを行うことによりＷＴＡｒａｈ１タンパク質と比較した。Ａｒａｈ１変異体ＰＬＰ５９５は８５°Ｃまで安定しており、ＷＴは９０°Ｃまで安定しており、これは２０５ｎｍにおけるより高い楕円率によって示される（図２２Ｂ）。

【０４１６】

Ａｒａｈ１変異体Ｃ１５９に対する患者抗体結合の差次的減少

【０４１７】

修飾によってＩｇＥとＩｇＧの結合がどのように変化するかを調べるために、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。天然Ａｒａｈ１またはＰＬＰ１５９（Ｃｏｍｂｏ 159）で被覆したプレートを、１６人のピーナッツアレルギー患者から採取した連続希釈血漿または血清とインキュベートした。Ａｒａｈ２で観察されたように、得られた曲線は形状が著しく異なっていたため、曲線下面積（ＡＵＣ）値の差異を比較した。その結果、ＩｇＥとＩｇＧ画分の両方において、Ｃ１５９への結合が有意に減少したことがわかった。なお、この減少は、ＩｇＧ分画では、顕著により緩やかであった（図３９Ａ、ウィルコクソン順位和検定のＰ値＜０．０００１）。実際、個々の［Ｃ１５９ＡＵＣ／Ａｒａｈ１ＡＵＣ］比を観察すると、すべての患者において、ＩｇＧ分画よりもＩｇＥ分画の方が、減少が顕著であることが明らかであった（図３９Ｂ、ウィルコクソンＰ値＜０．０００１）。これらの結果は、Ａｒａｈ１脱エピトープ化プロセスが、ＩｇＧ結合部位よりもＩｇＥ結合部位を選択的に減少させることに成功したことを示している。

【０４１８】

Ｃ１５９のアレルゲン性は天然Ａｒａｈ１と比較して著しく低下した

【０４１９】

ヒト化ラット好塩基球様ＲＢＬＳＸ－３８細胞株を活性化するＣ５７、Ｃ６８、及びＣ１５９の能力を試験した。この広く使用されている細胞株は、細胞脱顆粒によりアレルゲン刺激に応答するようにヒト患者サンプルで感作することができる。ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、臨床的に検証された、様々な背景を持つ１３人のピーナッツアレルギー患者から採取した１：１０の血漿または血清で一晩感作した後、０．５～５０００ｎｇ／ｍｌのＡｒａｈ１、Ｃ５７、またはＣ６８のいずれかで細胞を刺激した。異なるアレルゲンに対する各患者の反応を比較するために、個々のＡＵＣ値を計算した。全体として、すべての患者がＡｒａｈ１（ＡＵＣ中央値４５．７）に対して反応性を示し、Ｃ５７（ＡＵＣ中央値２２．５）と比較してＣ６８（ＡＵＣ中央値９．３）の方が優れていた（図２４Ａ）。同じ方法を用いて、ＲＢＬＳＸ－３８細胞を、臨床的に検証された、様々な背景を持つ４７人の異なるピーナッツアレルギー患者から採取した１：１０血漿または血清で一晩感作した後、０．５～５０００ｎｇ／ｍｌのＡｒａｈ１、Ｃ５７、またはＣ１５９のいずれかで細胞を刺激した。異なるアレルゲンに対する各患者の反応を比較するために、個々のＡＵＣ値を計算した。全体として、すべての患者がＡｒａｈ１（ＡＵＣ中央値５６．３）に対する反応性を示し、両方の変異体に対する反応性が低下しており、Ｃ５７（ＡＵＣ中央値７．５）と比較してＣ１５９（ＡＵＣ中央値１．７）の方が優れていた（図２４Ａ）。

【０４２０】

これらの結果は、Ｂ１００１の脱エピトープ化処理により、そのアレルゲン性が劇的に低下したことを示している。

【０４２１】

Ａｒａｈ１脱エピトープ化プロセス中に、Ｃｏｍｂｏ５１（Ｂ１２９１）、５２（Ｂ１２９２）、７４（Ｂ１３０９）、７５（Ｂ１３０４）、または１１６（ＰＬＰ４９９）などの追加のＡｒａｈ１変異体のＳＸ－３８ＲＢＬ脱顆粒アッセイで性能を試験した。これらの変異を有する個々の患者から得たいくつかの検査の例を図２５～図２６に示す。

【０４２２】

ＲＢＬアッセイは、複数の患者サンプルを用いて複数の変異体のハイスループット比較を可能にし、修飾アレルゲンのエンジニアリング及び検証のための強力なツールである。しかしながら、患者の反応を予測する上でのこのアッセイの感度及び精度は限られている可能性がある。Ａｒａｈ１と比較したＣ１５９の安全性をさらに検証するために、イスラエル及び米国のピーナッツアレルギー患者１９人のコホートで、一般的に認められたプロトコルを用いて、０．０６～６、６００ｎｇ／ｍｌの範囲のアレルゲン濃度でＢＡＴアッセイを実施した。得られた曲線から４パラメータロジスティック回帰モデルにフィッティングしたＥＣ５０値から、Ｃ１５９は集団レベルで反応性が１０００倍以上低下していることが示唆された（図２７）。これらの結果は、Ｃ１５９の安全性がＡｒａｈ１よりも高いことを示し、Ｃ１５９の免疫療法への適用を支持した。

【０４２３】

Ｃ１５９のＴ細胞免疫原性

【０４２４】

修飾がＣ１５９Ｔ細胞の免疫原性を消失させないことを確認するために、ピーナッツアレルギー患者の末梢血Ｔ細胞を増殖検出色素で処理し、ＰＢＳ、組換えＷＴＡｒａｈ１、またはＣ１５９のいずれかで刺激した。その後、細胞を、サイトメトリー増殖分析のために保持し、Ｔｈ２サイトカインＩＬ－５及びＩＬ－１３並びにＴｈ１サイトカインＩＦＮγの分泌のサンドイッチＥＬＩＳＡ分析のために培地を保持した（図３８Ａ）。データは、Ａｒａｈ１について予め定められた閾値をクリアしたサンプルからのみ収集した。その結果、Ｃ１５９に対するピーナッツアレルゲン性Ｔ細胞の反応性は、ＷＴと比較して低下したが、それにもなお、活性化は、試験したすべてのパラメータにおいて明らかにかつ有意に保持されていた。Ｃ１５９の全体的な反応性を評価するために、予め定められた閾値を用いて、各患者サンプルを、非反応性のもの、または、Ａｒａｈ１と比較して部分的ま

たは同程度の反応性を有するものに分類した。試験した全１９サンプルのうち、２つサンプルは同等、１４のサンプルは部分的、３つのサンプルは非反応性と推定された（図３８Ｂ）。これらの結果は、ＩｇＥの脱エピトープ化は、アレルゲンのＴ細胞免疫原性を部分的にしか損なわないことを示している。

【０４２５】

実施例１３：ｍＲＮＡ治療のための脱エピトープ化Ａｒａｈ２の半減期の増加

【０４２６】

目的：脱エピトープ化Ａｒａｈ２の半減期を増加させ、その治療可能性を改善する。

【０４２７】

脱エピトープ化Ａｒａｈ２（１００１として示されている）は、当初、細菌発現のためにデザインされたが、哺乳動物細胞での発現が乏しい。このタンパク質が哺乳類細胞から発現及び分泌されないことは、ｍＲＮＡ治療の一部としての使用を妨げる可能性がある。哺乳動物細胞での発現が低いことに加えて、脱エピトープ化されたＡｒａｈ２は分子量が１９ｋＤａ未満の小さな単量体タンパク質であるため、腎経路によって迅速に除去されると予想される。このタンパク質の半減期を増加させることは、免疫系への曝露、すなわち所望の免疫応答を産生する機会を効果的に延長することによって、その治療可能性を向上させる。

【０４２８】

また、Ａｒａｈ２とその脱エピトープ化誘導体は、哺乳類の分泌経路を介したタンパク質発現を阻害するような態様で、擬似的にＯ－グリコシル化されることが観察された（ＥＴＤ質量分析によって検証されたが、データは示さず）。グリコシル化部位の消失は野生型Ａｒａｈ２の発現レベルを改善したが、脱エピトープ化誘導体の発現レベルを増加させるには不十分であった。

【０４２９】

上記の問題に対処するため、脱エピトープ化したＡｒａｈ２－１００１をｍＲＮＡ治療の一部として機能するように調整したいくつかの構築物をデザインした。

【０４３０】

方法

【０４３１】

細胞トランスフェクション：Ｅｘｐｉ２９３細胞（Thermo-Fisher）をＥｘｐｉ２９３発現培地で培養し、製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクションした。簡単に説明すると、トランスフェクションの前に、細胞を４～５００万個の細胞／ｍｌの生存細胞密度まで増殖させ、３００万個の細胞／ｍｌに希釈し、培地１ｍｌあたり１μｇのＤＮＡでトランスフェクションした。ＤＮＡを、ＯｐｔｉＭＥＭ（Thermo-Fisher）中で、発現量の６．１％に希釈した。別のチューブで、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ２９３をＯｐｔｉＭＥＭ中で１：１８．５に希釈し、発現量の６％にした。５分間インキュベートした後、希釈したＥｘｐｉｆｅｃｔａｍｉｎｅ２９３（Gibco）とＤＮＡを混合し、１０分間インキュベートした後、細胞培養物に加えた。

【０４３２】

タンパク質発現：Ｅｘｐｉ２９３細胞を３７°Ｃ、５％CO_2で培養した。トランスフェクションの翌日、細胞に、エキスピフェクタミン２９３エンハンサー１及び２を、それぞれ１：１６０及び１：１６の量で添加した。細胞を合計５日間放置してタンパク質を発現させた。

【０４３３】

タンパク質の精製：培地上清を３００ｘｇ、１０分間の遠心分離で清澄化し、０．４５μｍのＰＥＳフィルタでろ過した。Ｈｉｓ標識構築物を１００容量の２０ｍＭのｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、２００ｍＭのＮａＣｌに対して一晩透析した。透析した上清を、Ｎｉ－ＮＴＡＳｕｐｅｒｆｌｏｗ樹脂（Thermo-Fisher）と共に４°で１時間撹拌した。樹脂を、２０ｍＭのｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、２００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのイミダゾールで洗浄した。タンパク質を、２０ｍＭのｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、２００ｍＭのＮａＣ

し、２５０ｍＭのイミダゾールで溶出させた。Ｆｃ融合タンパク質については、清澄化した培地上清をプロテインＡ結合樹脂（Toyopearl, HC-650F）と共に１時間インキュベートした。樹脂を１００樹脂体積のＰＢＳで洗浄した。タンパク質を、０．１Ｍのクエン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ３．０）の添加により溶出させた。溶出画分を、１Ｍのトリス（ｐＨ９．０）の０．３３溶出体積の添加により中和した。さらに精製するために、溶出した画分を１０ｋＤａまたは５０ｋＤａの適切なＭＷＣＯのＡｍｉｃｏｎ遠心フィルタ（Merk Milipore）で濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィー分離のためにＰＢＳで平衡化したＳｕｐｅｒｄｅｘ７５ＰＧまたはＳｕｐｅｒｄｅｘ２００ＰＧ１６／６００（Cytiva）にロードした。

【０４３４】

ＥＬＩＳＡアッセイ：投与前及び最初のＤＮＡ注射後２１日目にマウスから血清を採取した。抗原特異的抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイによってマウス血清中で検出された。簡単に説明すると、９６ウェルのＥＬＩＳＡプレート（MaxiSorp, Nunc）を、以下のスキームに従って、リン酸緩衝生理食塩水中の５０μｌ（１μｇ／ｍｌ）の精製タンパク質で４°Ｃで被覆した。天然のＡｒａｈ１を、α－Ａｒａｈ１及びα－ＤＥＡｒａｈ１コンボ６８抗体（可溶性及び膜貫通融合の両方）の検出に使用した。天然Ａｒａｈ２を用いてα－Ａｒａｈ２抗体を検出し、組換えＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１を用いてα－ＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１抗体（Ｆｃ融合及び膜貫通融合の両方）を検出した。１μｇ／ｍｌのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH, Sigma Aldrich）を陰性対照として用いた。すべての条件を二連で行った。被覆後、プレートを、ＰＢＳ０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）、２％ＢＳＡと共に室温で１時間インキュベートすることによりブロックし、その後、２００μｌのＰＢＳＴで１回洗浄した。血清をＰＢＳＴ２％ＢＳＡで１：２００に希釈し、５０μｌ／ウェルを上記スキームに従ってＥＬＩＳＡプレートに移し、室温で１．５時間インキュベートした。プレートを２００μｌ／ウェルのＰＢＳＴで３回洗浄した。すべてのウェルを、５０μｌの１：１０，０００のＨＲＰ結合α－マウスＩｇＧ（Jackson ImmunoResearch）二次抗体とインキュベートした。ウェルを２００μｌ／ウェルのＰＢＳＴで３回洗浄した後、ＴＭＢ反応（Promega）を行い、H_2SO_4の添加によりクエンチした。光学密度値をＫＬＨ対照の値から差し引いた。

【０４３５】

インビボトでのランスフェクション：６～８週齢の雌性Ｃ３Ｈ／ＨｅＮＨｓｄマウスをＥｎｖｉｇｏ社（Envigo, Israel）から購入し、ＣＭＶプロモーターとＳＶ４０ポリアデニル化シグナルに挟まれた目的のタンパク質をコードするプラスミドからなるＤＮＡ構築物（´ｐＴｗｉｓｔＣＭＶ´、Twist Bioscience）で処理した。マウスを、１０μｇのＤＮＡのＰＢＳへの注射、またはＰＥＩトランスフェクションにより処理した。簡単に説明すると、ＰＥＩトランスフェクション用の８４０μｌのＤＮＡを作製するために、ＤＮＡを５％グルコース中で０．４２ｍｇ／ｍｌの最終濃度になるように４００μｌで希釈した。もう１本のチューブでは、７０．４μｌの１ｍｇ／ｍｌの２５ｋＤａ直鎖ＰＥＩ（Polyscience）を４４０μｌの５％グルコースで希釈した。２つのチューブをピペット操作により混合し、注入前に１５分間インキュベートした。最終的なＤＮＡのｎ／ｐ比は６であった。マウスの大腿尾筋に、５０μｌ、０．２ｍｇ／ｍｌを週３回筋肉注射（Ｉ．Ｍ．）し、初回投与後２１日目に出血させた。

【０４３６】

結果

【０４３７】

コンセンサス変異

【０４３８】

哺乳類細胞における脱エピトープ化Ａｒａｈ２１００１の乏しい発現に対処するために、ＩｇＥエピトープの再導入を回避しつつ、野生型タンパク質の安定性を回復することを意図して、一連のバック・トゥ・コンセンサス変異（back-to-consensus mutation）をデザインした。そのデザインを、発現レベルとＲＢＬ活性化の両方について反復的に

試験した。数回のデザインの反復の後、ＩｇＥエピトープを有意に再導入することなく、脱エピトープ化されたＡｒａｈ２を良好に発現するバージョンが達成された（Arah2_conbo31）。図２８は、ＨＥＫ２９３細胞において発現されたＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１のバック・トゥ・コンセンサス変異体の例を示し、バック・トゥ・コンセンサス変異体のサブセットの分泌レベルが、それらが由来するＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１と比較して増加したことを示す（右レーン）。非還元ゲルは、変異体が単量体であり、ミスフォールドではなく、Ａｒａｈ２のいくつかの組換え型で観察される現象である分子間ジスルフィド結合を形成することを示した。

【０４３９】

図２９に示すように、最終的なバック・トゥ・コンセンサス変異体（ｖａｒ３１）及びＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１－Ｆｃ融合タンパク質は、ＲＢＬアッセイで測定すると、天然Ａｒａｈ２と比較して、アレルゲン性が有意に低かった。

【０４４０】

Ｆｃ融合

【０４４１】

脱エピトープ化Ａｒａｈ２の乏しい発現、短い半減期、及び速いクリアランスに対処するために、脱エピトープ化Ａｒａｈ２を抗体Ｆｃに融合した。Ｆｃ部分は２つの機能を果たし、分泌経路における担体として作用するとともに、融合した治療用部分の半減期を増加させる。上記の機能に加えて、脱エピトープ化アレルゲンのＩｇＧ４のＦｃへの融合は、ＦｃγＲへの結合によってアレルギー反応を阻害することが期待される。図３０は、Ｆｃへの融合が脱エピトープ化Ａｒａｈ２　１００１の分泌レベルを劇的に増加させたことを示す。また、図３０は、脱エピトープ化Ａｒａｈ２Ｆｃ融合体（及びＦｃ二量体のアセンブリ）の分泌レベルが、単量体タンパク質と比較して、著しく増加したことを示す。単量体タンパク質はウエスタンブロットによってほとんど検出されないが、ＦＣ融合体は明らかに過剰発現され、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで見られるように培地に分泌される。ウエスタンブロットにより、過剰発現されたタンパク質バンドが脱エピトープ化されたＡｒａｈ２融合を含むことが確認された。

【０４４２】

膜貫通融合体

【０４４３】

脱エピトープ化Ａｒａｈ２の乏しい発現、短い半減期、及び速いクリアランスにさらに対処するため、脱エピトープ化Ａｒａｈ２の膜固定バージョンをデザインした。発現の増加を促進することに加えて、膜融合体は、可溶性バージョンで起こるような腎臓系によって除去されない。加えて、膜融合タンパク質は、抗体の産生を誘導することができるが、細胞膜に固定されているためＦｃεＲＩの架橋を誘導することができず、したがって、アレルギー反応を引き起こす可能性は低い。

【０４４４】

図３１に示すように、ＤＥ　Ａｒａｈ２　１００１は膜に固定されて過剰発現するが、可溶性画分にはごくわずかな量のタンパク質しか見られない。図３２は、遺伝子治療の一部としてデリバリーされたときの様々な構築物に対する抗体応答を示している。この応答は、構築物が実際にインビボで発現及び分泌され得ること、及びそれらが免疫療法に不可欠であると予想される免疫応答を誘発することを確認する。

【０４４５】

実施例１４：ピーナッツアレルギーに対する舌下免疫療法

【０４４６】

ピーナッツ抽出物の作製

【０４４７】

１００ｇの脱脂ピーナッツ粉（Shaked Tavor、軽くローストしたピーナッツからの約４８％のタンパク質、約８０％の脱脂分）を、５００ｍｌの抽出緩衝液（２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０）と混合し、ハンドホモジナイザーミキサーを使用してホモジナイズし

、室温で２時間撹拌した。次いで混合物を５０００ｇで５分間遠心分離し、上清を、２０，０００ｇ、５０分間、４°Ｃで再度遠心分離した。得られた上清を２０，０００ｇ、５０分間、４°Ｃで再度遠心分離し、０．４５μｍフィルタでろ過した。ろ過したピーナッツ抽出物（ＰＥ）は、精製ステップまで、－８０°Ｃで保存した。

【０４４８】

天然Ａｒａｈ２の単離

【０４４９】

１００ｍｌのＰＥを７０ｍｌのＱセファロースＨＰカラム（Cytiva）にロードし、抽出緩衝液で前平衡化した。ピーナッツタンパク質を、抽出緩衝液中の１８カラム容積の０～０．４ＭのＮａＣｌの直線勾配を用いて溶出した（図３３Ａ）。天然Ａｒａｈ２（ｎＡｒａｈ２）含有画分（図３３Ｂ参照）をプールし、３ｋＤａセントリコーン（Amicon, Mercury）によって２～５ｍｇ／ｍｌに濃縮し、ＰＢＳで平衡化したＨｉｌｏａｄ　１６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ＰＧＳＥＣカラム（Cytiva）にロードした。純粋な単量体ｎＡｒａｈ２含有画分をプールし、約２ｍｇ／ｍｌに濃縮した（図３及び図４参照）。２８０ｎｍでの吸光度（ε＝１４９４０）を用いて、濃度を測定した。ＢＥＨ　ＳＥＣ２００Ａカラム（Waters）及びミオグロビン標準曲線を用いて、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより物質の最終濃度を測定した。

【０４５０】

マウスモデルにおけるピーナッツアレルギーに対する舌下免疫療法

【０４５１】

実験手順

【０４５２】

３週齢のナイーブな雌性Ｃ３Ｈ／ＨｅＪマウス３６匹を注文した。１日目のマウスの体重範囲は１４～１８ｇであった。マウスは、消えないマーカーをマウスの尾部にマークして識別した。マウスは、米国バーハーバーのジャクソン研究所から供給された。

【０４５３】

感作相

【０４５４】

３６匹のマウス（シャム動物を含む）を以下のように経口感作した。

【０４５５】

１週目、２週目、及び３週目：１週間に１回、２ｍｇ（タンパク質５０％）のピーナッツ抽出物を、０．２５０ｍＬのＰＢＳ、１０μｇの粘膜アジュバントコレラ毒素（List Laboratories, Campbell, Calif, reference 100B）に混合した。

【０４５６】

４週目：ピーナッツ抽出物４ｍｇ（タンパク質５０％）を、０．２５０ｍＬのＰＢＳ、１０μｇの粘膜アジュバントコレラ毒素（List Laboratories, Campbell, Calif）に混合した。

【０４５７】

マウスは、各強制経口投与の３時間前から餌を与えなかった。

【０４５８】

２９日目に、すべてのマウスに、ピーナッツ抽出物３５０μｇを腹腔内投与した。マウスの体温を、腹腔内投与前、投与３０分後、投与４０分後に、直腸に挿入した温度プローブで測定した。体温が１．５°Ｃ以上低下した場合を陽性と見なした。

【０４５９】

腹腔内投与４０分後に、下記のスコアリングシステムを用いて、アナフィラキシー症状を評価した。

０：臨床症状なし；

１：繰り返し口や耳をかいたり後ろ足で外耳道をかいたりする；

２：活動性の低下、目や口の周りの浮腫／腫れ；

３：腹臥位で１分以上動かない；

４：ひげ刺激に反応せず、つついても反応が少ないかまたは反応しない。
５：エンドポイント：振戦、痙攣、死亡。
【０４６０】
次に、酵素免疫測定キットを使用してポーソルトで総免疫グロブリンを測定するために、無麻酔で約１００μＬの血液サンプルを顎下静脈レベルで採取した（凝固活性化剤を含むポリプロピレン血清チューブ）。チューブを数回反転させて、全血を凝固活性化剤と混合した。バイアルを室温で２０～３０分間維持した（チューブは直立させた）。次いで、血液を、１０００ｇ、室温で、１０分間遠心分離した。血清サンプル（２５μＬの１つの血清サンプル＋残量の１つの血清サンプル）をポリプロピレンチューブに移し、分析まで－８０°Ｃで凍結保存した。
【０４６１】
全免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、及びＩｇＧ２ｃ）の定量を、清澄化血漿サンプル及び抗体アイソタイピング７－ＰｌｅｘマウスＰｒｏｃａｒｔａＰｌｅｘ（ＴＭ）パネル（reference EPX070-20816-901, ThermoFisher)）を使用して行った。総ＩｇＧ２ａ定量には、ＩｇＧ２ａ用のＰｒｏｃａｒｔａＰｌｅｘ Ｍｏｕｓｅ Ｂａｓｉｃ Ｋｉｔ（reference EPX010-20440-901, ThermoFisher）を使用した。
【０４６２】
３５０μｇのピーナッツ抽出物の腹腔内投与後の２９日目に得られたデータ（体温及び臨床スコア）に付け加えて、２８匹のマウスを選択した。３３日目には、追加検査を実施しなかった。
【０４６３】
治療期
【０４６４】
３６日目から、経口または舌下免疫療法を開始した（週５回、３週連続投与）。舌下投与（すなわち、シャム、第３群及び第４群、表１参照）の場合、治療の１週目に、ケタミン／メデトミジンの混合物（５０／１ｍｇ／ｋｇ、１０ｍＬ／ｋｇ ｉ．ｐ．）によってマウスを短時間麻酔した。約１０分後、マウスの麻酔が十分に行われていることを確認するために、マウスの麻酔深度を調べた。
【０４６５】
舌下投与：マウスを垂直に立たせ、マイクロピペットを使用して、マウス１匹あたり１０μＬの溶液を舌下に投与した。
【０４６６】
タング・ローリング（Tongue Rolling）：マウスに投与した後、舌背を約１分間穏やかにロールさせた。これは、意識のある動物における正常な舌の動きをシミュレートするためのものであり、マイクロピペットの先端で行うことができる。
【０４６７】
回復体位：その後、マウスが溶液を飲み込む可能性を最小限にするため、舌下投与後約２０分間、マウスを前屈位にした（頭を下肢の上に曲げて座らせた）。
【０４６８】
２群のマウスを経口投与した後、他の群と同様に、ケタミン／メデトミジン（５０／１ｍｇ／ｋｇ、１０ｍＬ／ｋｇ ｉ．ｐ．）の混合物で短時間麻酔した。したがって、すべての動物を同じ実験条件下（すなわち短時間麻酔）で試験した。
【０４６９】
投与１週目に麻酔による死亡があったため、麻酔のプロトコルを変更した：マウスはケタミン／メデトミジンの混合物（２５／２ｍｇ／ｋｇ、１０ｍＬ／ｋｇ ｉ．ｐ．）で短時間麻酔した。
【０４７０】
麻酔の約３０分後、ケタミン／メデトミジンの麻酔作用を逆転させるために、アチパメゾール（１ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｌ／ｋｇ ｉ．ｐ．）を使用した。

【０４７１】
【表１０】

表10:実験群

群	感作（ピーナッツ抽出物）	投与	用量レベル（μg／マウス）	チャレンジ（i. p. 、i. d. またはi. g）
1 (n=4)	Yes	シャム（PBS、舌下投与）	0 (10 μL of PBS)	天然Arah2タンパク質
2 (n=8)	Yes	天然Arah2タンパク質（経口投与）	500 μg/250 μL	天然Arah2タンパク質
3 (n=8)	Yes	天然Arah2タンパク質（舌下投与）	5 μg/10 μL	天然Arah2タンパク質
4 (n=8)	Yes	天然Arah2タンパク質（舌下投与）	50 μg/10 μL	天然Arah2タンパク質

(*):ピーナッツのi. d. チャレンジ（右耳のみ）
群間比較は、スチューデントの対応のないt検定により行った。

【０４７２】
チャレンジ（ｉ．ｐ．）
【０４７３】
６７日目に、マウスに、３５μｇの天然Ａｒａｈ２タンパク質／２５０μＬを腹腔内投与した。マウスの深部体温を、腹腔内投与前、１０分、２０分、３０分、４５分、６０分、１２０分、及び２４時間後に、直腸に挿入した温度プローブを使用して測定した。体温が１．５℃以上低下した場合を陽性と見なした。
【０４７４】
脾臓及び腸間膜リンパ節の細胞からのサイトカイン分泌
【０４７５】
血液サンプルの採取後（７２日目）、脾臓及び腸間膜リンパ節（ＭＬＮ）を採取し、氷上に置かれた別々のファルコンチューブ内の１００Ｕ／ｍＬのペニシリン及び１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含有する１ＸＰＢＳに移した。ＭＬＮを、無菌器具を使用して小片に切断した。脾臓を、ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ解離器を使用して、新鮮にホモジナイズした。次いで、それらを、ＴｅｘＭＡＣＳ培地（ref. 130-097-196, Miltenyi Biotec）で予め湿らせた７０μＭの細胞ストレーナー上に移した。
【０４７６】
脾細胞を単離し、次いで４５０ｇで８分間遠心分離した。溶解緩衝液（ref 555899, BD Biosciences）を用いて赤血球を溶解した。５容量のＰＢＳ中２％ＦＢＳを用いて反応を停止し、細胞をＰＢＳで１回洗浄した。ＭＬＮ細胞を、培地を繰り返し添加しながらシリンジプランジャーで組織を穏やかに圧迫することによって単離し、次いで４５０ｇで８分間遠心分離した。
【０４７７】

脾細胞及びＭＬＮ細胞を、ＴｅｘＭＡＣＳ培地（ref. 130-097-196, Miltenyi Biotec）及び１００Ｕ／ｍＬペニシリン及び１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを含有する１０％ＦＢＳ中の９６ウェルＵ底プレート（４００，０００個の細胞／１００μＬ）に播種し、２００μｇ／ｍＬの最終濃度で細胞培養培地（群１）または天然Ａｒａｈ２（群１～４）で処理した。シャムマウス及び感作マウス由来の細胞も、コンカナバリンＡ（最終濃度２．５μｇ／ｍＬ）で処理するか、または、対照としてマウスＴ細胞活性化／培養キット（ref. 130-093-627, Miltenyi Biotec）を使用してＣＤ３－ＣＤ２８ビーズで刺激した。処理の２４時間後及び７２時間後に上清を採取し、分析まで－８０°Ｃで保存した。

【０４７８】

サイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦγ、ＩＬ－１２、ＩＬ－９、ＴＧＦβ）のレベルは、Ｌｕｍｉｎｅｘパネルアッセイを使用して、製造業者の指示に従って測定した（ProcartaPlex 7 plex Assay, ThermoFisher Scientific, reference no. EPX010-20440-901 and TGF beta1 Mouse ProcartaPlex(tm) Simplex Kit, ThermoFisher Scientific, reference no. EPX01A-20608-901）。Ｂｉｏ－Ｐｌｅｘ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェア（Biorad）を用いてデータを分析し、対応するサイトカインの標準曲線を用いて濃度を算出した。

【０４７９】

結果

【０４８０】

チャレンジ（ｉ．ｐ．）：過敏反応の評価

【０４８１】

体温変化で測定した過敏反応を図５に示す。シャムマウスでは、体温の漸進的な低下が経時的に観察された（腹腔内投与の１２０分後で最大で－１１．５±１．３℃）。

【０４８２】

ピーナッツタンパク質（４００μｇ／マウス　経口投与）で処理したマウスでは、体温低下はシャムマウスと比較して顕著ではなかった（腹腔内投与の６０分後で最高で－３．９±１．３°Ｃ、１２０分後で－１．７±０．６°Ｃ）。両群の差は、投与の２０～１２０分後で、統計的有意に達した。

【０４８３】

ピーナッツタンパク質（５μｇ／マウス舌下）を投与したマウスでは、体温低下はシャムマウスと比較して有意に変化しなかった。

【０４８４】

ピーナッツタンパク質（５０μｇ／マウス舌下）を投与したマウスでは、体温低下はシャムマウスと比較して顕著ではなかった（腹腔内投与の６０分後で最高で－４．９±１．２°Ｃ、１２０分後で－２．７７±１．３°Ｃ）。両群の差は、投与の２０～１２０後で、統計的有意に達した。

【０４８５】

すべてのマウスにおいて、腹腔内投与の３０分後に測定した臨床スコアは、２であった。したがって、群間差は認められなかった。

【０４８６】

サイトカイン産生の分析

【０４８７】

陽性対照

【０４８８】

陽性対照は、脾細胞及び腸間膜リンパ節細胞由来の試験したサイトカインの大部分に対してサイトカイン分泌の増加を誘導したが、腸間膜リンパ節細胞では低レベルであった。脾臓及び腸間膜リンパ節は、無反応動物から採取し、ナイーブ動物からは採取しなかった。

【０４８９】

脾細胞

【０４９０】

シャム対照マウスの脾細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦγ、及びＩＬ－１２のレベルは、２４時間から７２時間の間に増加した。ＩＬ－９レベルは定量下限未満であり、ＴＧＦβレベルは、経時的に安定していた。陰性対照として、培養液で処理したシャム対照マウスの脾細胞を使用したところ、サイトカインのレベルは、ＴＧＦβ（約３５０ｐｇ／ｍＬの基礎レベル）を除いて、非常に低いか、または定量下限未満であった。

【０４９１】

経口感作マウス（４００μｇ／マウス　経口投与）由来の脾細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦγ、及びＩＬ－１２レベルは、シャム対照マウスと比較して、明らかな変化は認められなかった。ＴＧＦβレベルは、シャム対照マウスと比較して、２４時間（＋８１％、ｐ＜０．０１）及び７２時間（＋８０％、ｐ＜０．０５）で、有意に増加した。しかし、対照条件下で測定された基礎レベルを考慮すると、この差異は生物学的関連性を欠いていると思われる。

【０４９２】

舌下感作マウス（５μｇ／マウスまたは５０μｇ／マウス）由来の脾細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦγ、ＩＬ－１２、及びＴＧＦβレベルは、シャム対照マウスと比較して、明らかな変化は認められなかった。

【０４９３】

【表１１】

表11:脾細胞によるサイトカイン分泌（pg／ml）

AVG（平均）	IL-4		IL-5		IL-10		IL-13		TNF-B	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
PE Sham IT	33	110	62	938	121	828	45	439	233	212
PE OIT	46	78	137	699	103	656	59	351	233	212
PE SLIT 5	60	76	158	953	143	859	104	604	330	153
PE SLIT 50	52	49	97	632	111	616	53	309	402	287
SEM	IL-4		IL-5		IL-10		IL-13		TNF-B	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
PE Sham IT	18	9	10	307	5	97	1	96	20	61
PE OIT	18	9	10	307	5	97	1	96	20	61
PE SLIT 5	15	22	19	111	14	108	18	122	61	28
PE SLIT 50	25	29	37	224	22	199	15	118	37	29

【０４９４】

腸間膜リンパ節細胞

【０４９５】

シャム対照マウス由来の腸間膜リンパ節細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦγ、及びＩＬ－１２のレベルは、２４時間から７２時間の間に増加した。ＩＬ－９レベルは、定量下限未満であった。試験した２つのウェルでは、ＴＧＦβの動態は異なっていた。陰性対照として、培地で処理したシャム対照マウス由来の腸間膜リンパ節細胞では、サイトカインのレベルは、ＴＧＦβ（約４００ｐｇ／ｍＬの基礎レベル）を除いて、非常に低いか、または定量下限未満であった。

【０４９６】

経口感作マウス（４００μｇ／マウス　経口投与）由来の腸間膜リンパ節細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、及びＩＬ－１３レベルは、偽対照マウスと比較して減少した。ＩＮＦγ、ＩＬ－１２、及びＩＬ－９のレベルは、ゼロまたは定量下限未満であった。ＴＧＦβのレベルは、シャム対照マウスと比較して、明らかな変化は認め

られなかった。

【０４９７】

舌下感作マウス（５μｇ／マウスまたは５０μｇ／マウス）由来の腸間膜リンパ節細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、及びＩＬ－１３のレベルは、シャム対照マウスと比較して減少した。ＩＮＦγ、ＩＬ－１２、及びＩＬ－９のレベルは、ゼロまたは定量下限未満であった。ＴＧＦβレベルは、シャム対照マウスと比較して、明らかな変化は認められなかった。効果は、最高濃度及び７２時間時点でより顕著であったように思われる。

【０４９８】

【表１２】

表12:腸間膜リンパ節細胞によるサイトカイン分泌

AVG	IL-4		IL-5		IL-10		IL-13		TNF-B	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
PE Sham IT	7.3	12.5	42.4	188.3	25.6	87.6	17.8	62.0	561	361
PE OIT	3.8	4.3	20.6	45.2	9.5	27.5	7.3	21.3	420	376
PE SLIT 5	3.8	7.9	19.2	79.9	15.7	39.1	7.5	33.9	501	406
PE SLIT 50	3.4	4.3	19.2	34.7	12.4	20.7	7.5	13.9	385	400
SEM	IL-4		IL-5		IL-10		IL-13		TNF-B	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
PE Sham IT	1.4	4.3	10.5	51.8	0.6	22.5	4.3	2.7	-	2
PE OIT	0.6	0.7	5.7	22.3	1.6	9.2	1.4	7.0	15	21
PE SLIT 5	0.2	0.7	5.4	30.9	2.7	11.9	2.1	5.8	44	11
PE SLIT 50	0.8	3.2	6.0	26.5	2.5	6.9	1.9	7.3	20	11

【０４９９】

結論として、これらの結果は、ピーナッツタンパク質の経口投与（４００μｇ／マウス）または舌下投与（５０μｇ／マウス）により、事前にピーナッツ抽出物で感作した雌性Ｃ３Ｈ／ＨｅＪマウスにおける体温の大幅低下及び臨床スコアの増加に反映されるアナフィラキシー反応を減少させることを示唆した。最低舌下用量（５μｇ／マウス）は、アナフィラキシー反応に影響を及ぼさなかった。アレルギー性皮膚反応（耳の腫脹）は、どのような投与でも変化しなかった。

【０５００】

ピーナッツタンパク質を投与したマウスは、シャム対照マウスと比較して、すべての投与において同様のＩｇＧ上昇を示した。総ＩｇＥ、ＩｇＡは、ピーナッツタンパク質の投与（経口投与及び５μｇ／マウス舌下投与）の後に上昇したが、５０μｇ／マウスのＳＬＩＴ処置後には上昇しなかった。

【０５０１】

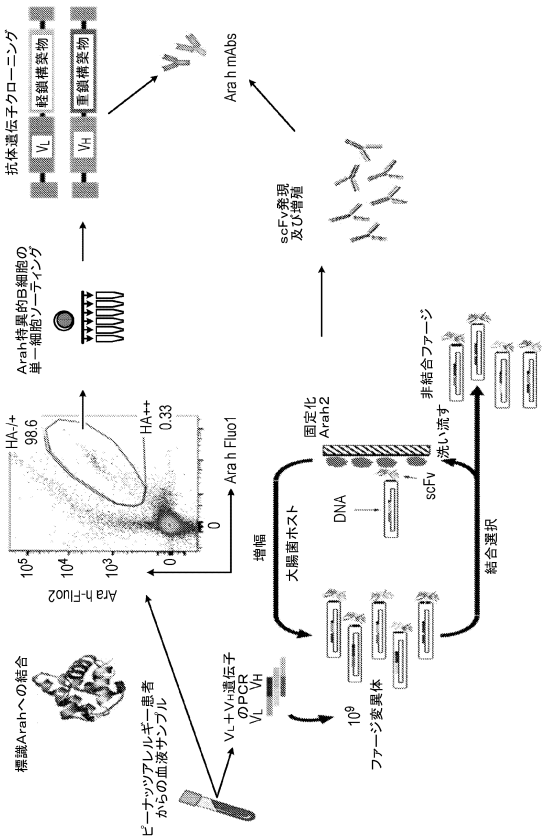
また、これらの処置は、ピーナッツタンパク質による生体外刺激後の脾細胞または腸間膜リンパ節細胞の上清中のサイトカイン放出の増加も変更し、統計学的ではないが、いくつかのサイトカインで減少傾向、ＴＮＦでは増加傾向が観察された。

【０５０２】

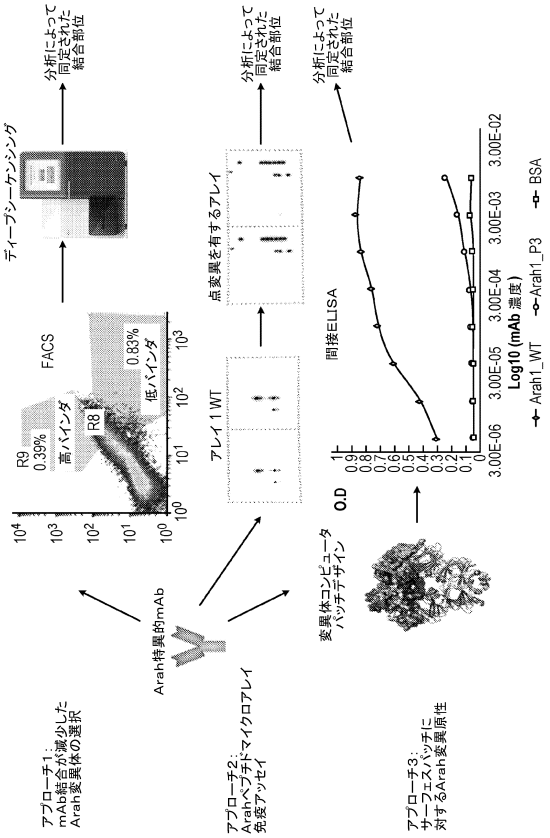
天然Ａｒａｈ２（５μｇ／マウス舌下または５０μｇ／マウス舌下）刺激（２００μｇ／ｍＬの天然Ａｒａｈ２）腸間膜リンパ節細胞の上清において、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、及びＩＬ－１３のレベルは、偽刺激した腸間膜リンパ節細胞と比較して減少し、ＴＧＦβのレベルは、５μｇ／マウスの処理群において、偽刺激した腸間膜リンパ節細胞と比較して、有意に低下した（－３１％、ｐ＜０．０５）。

【図面】

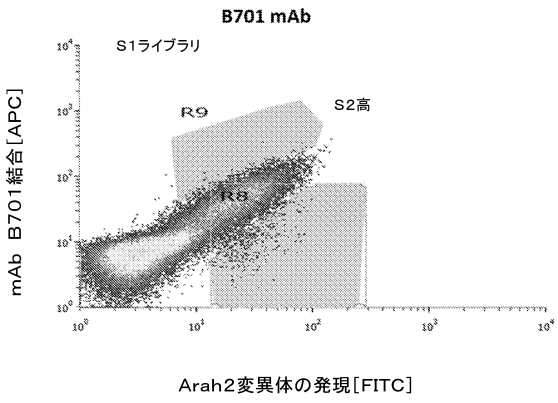
【図１】



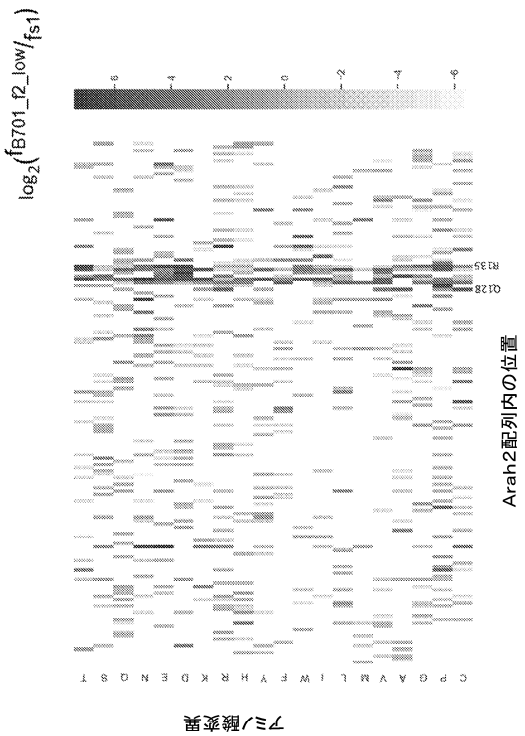
【図２】



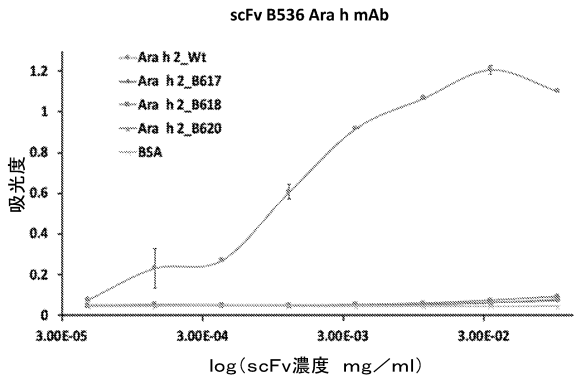
【図３Ａ】



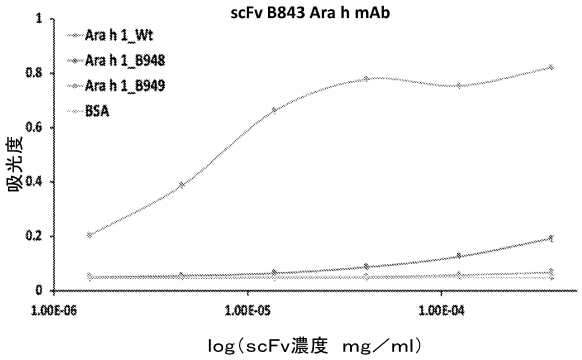
【図３Ｂ】



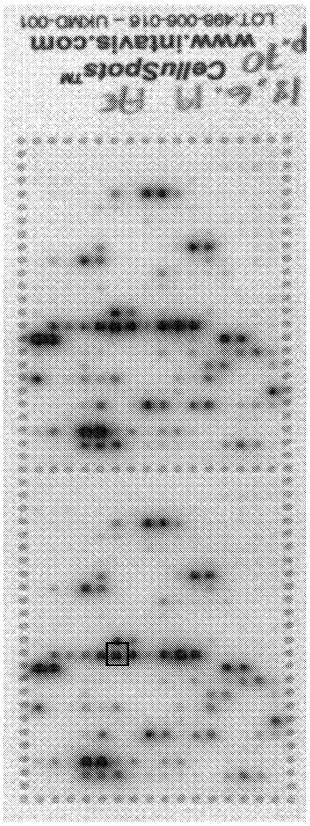
【図４Ａ】



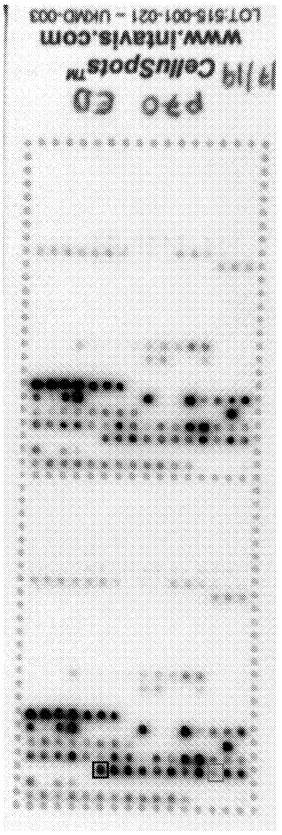
【図４Ｂ】



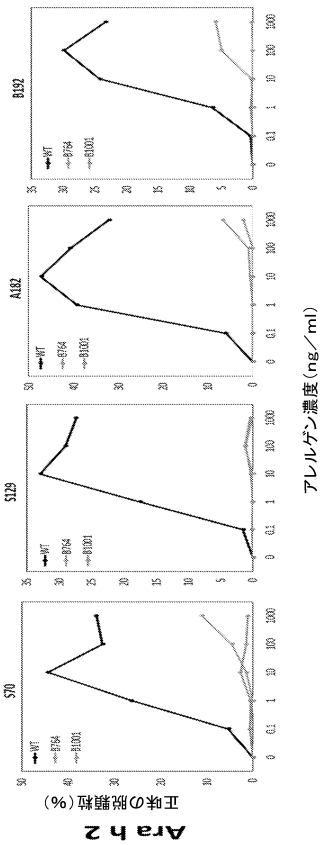
【図５Ａ】



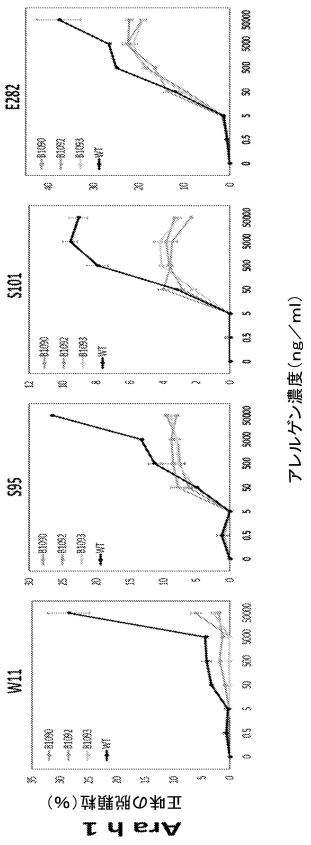
【図５Ｂ】



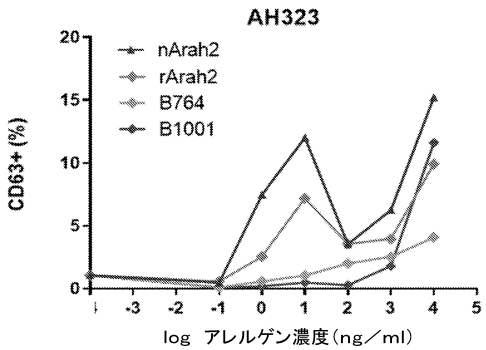
【図６Ａ】



【図６Ｂ】

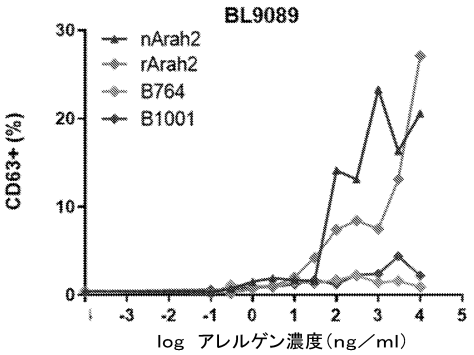


【図７Ａ】



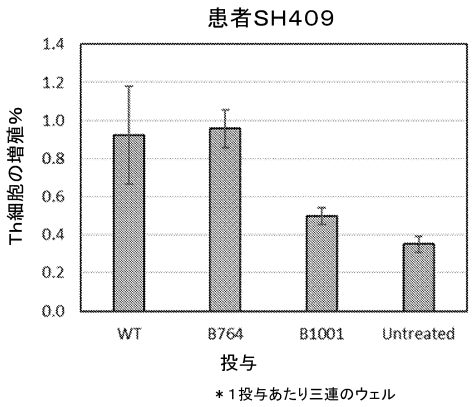
	nArah2	rArah2	B764	B1001
EC50	0.3918	1.079	52.34	15135

【図７Ｂ】

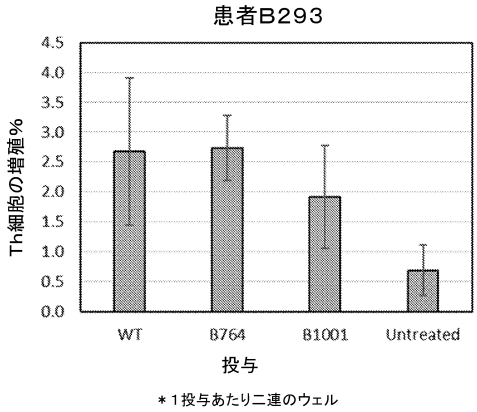


	nArah2	rArah2	B764	B1001
EC50	90.57	3365		

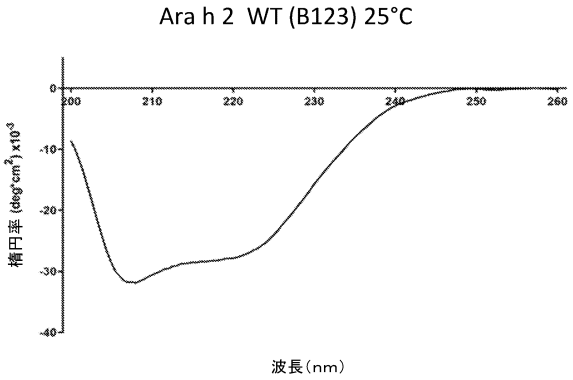
【図８Ａ】



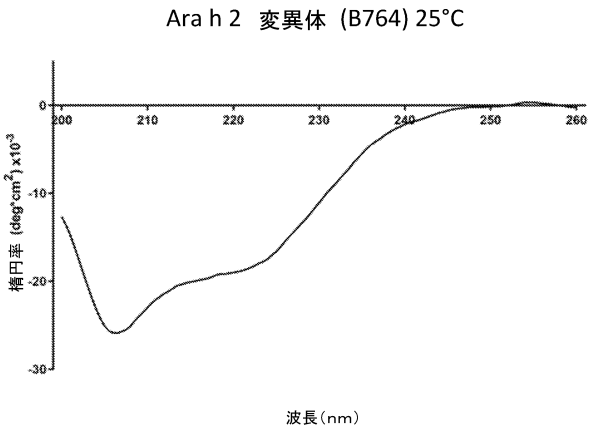
【図８Ｂ】



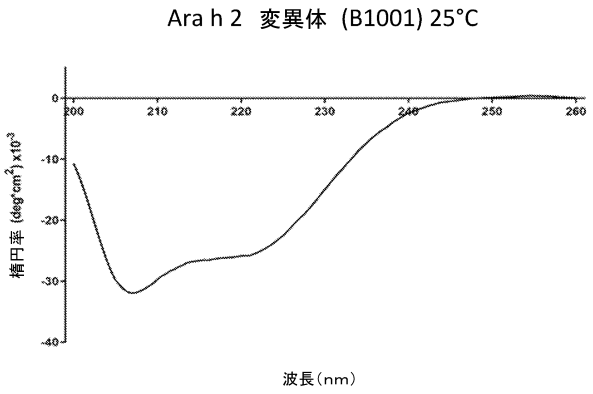
【図９Ａ】



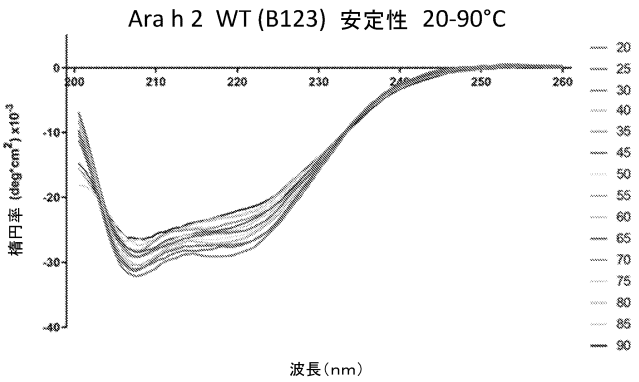
【図９Ｂ】



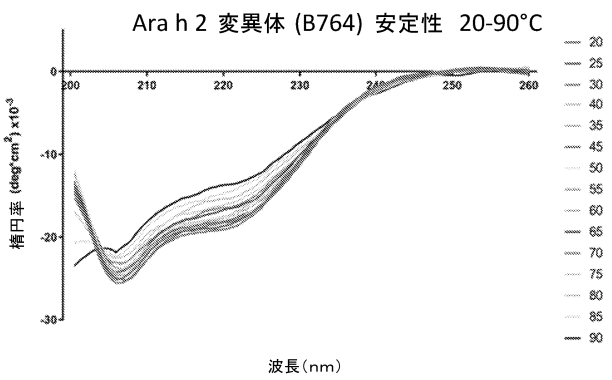
【図９Ｃ】



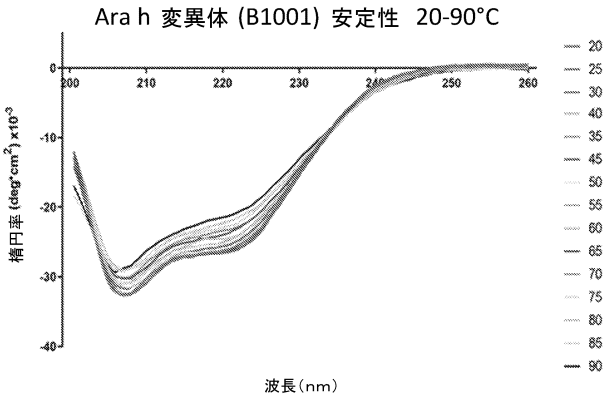
【図９Ｄ】



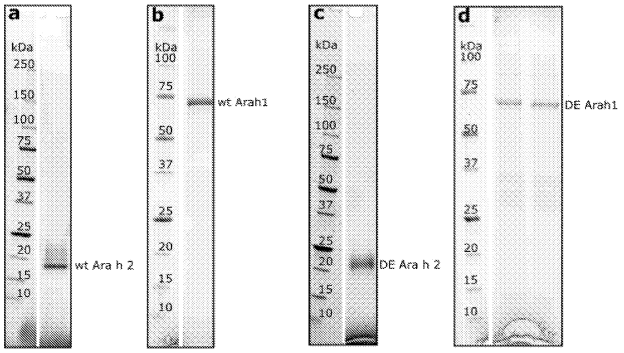
【図９Ｅ】



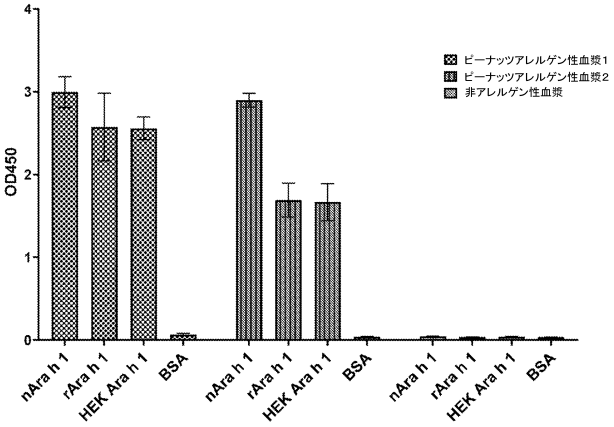
【図９Ｆ】



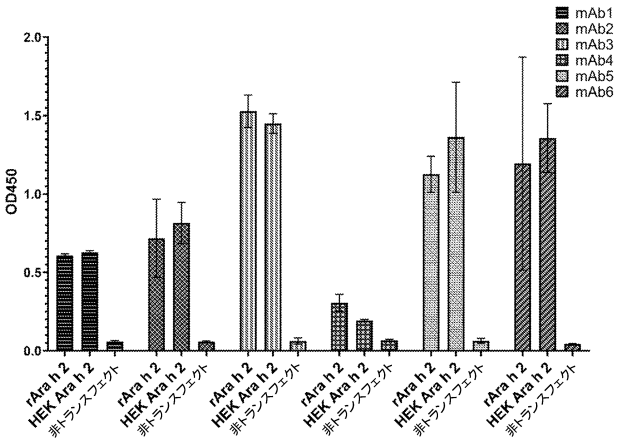
【図１０】



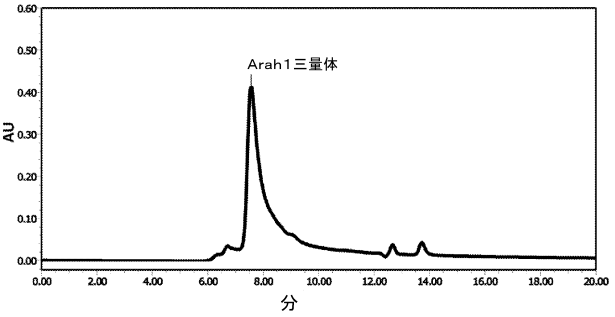
【図１１】



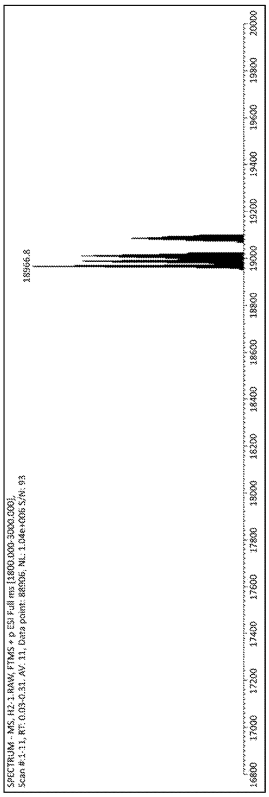
【図１２】



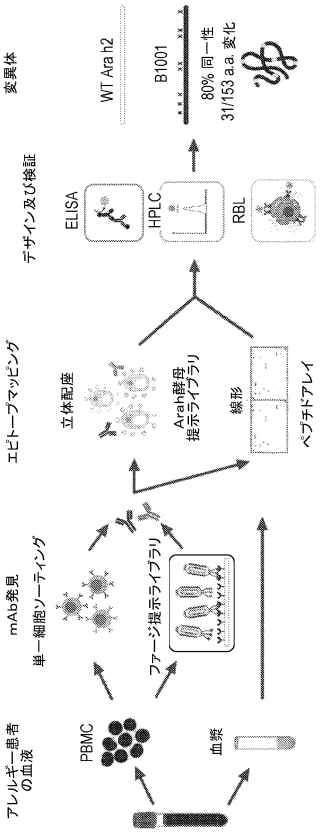
【図１３】



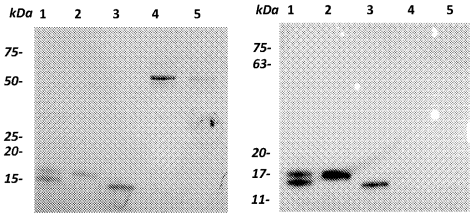
【図１４】



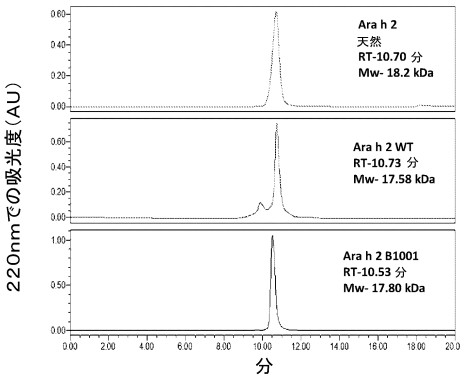
【図１５】



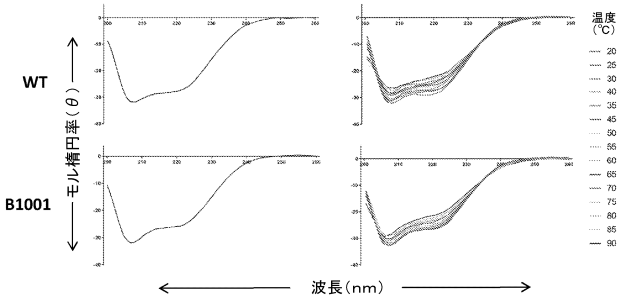
【図１６Ａ】



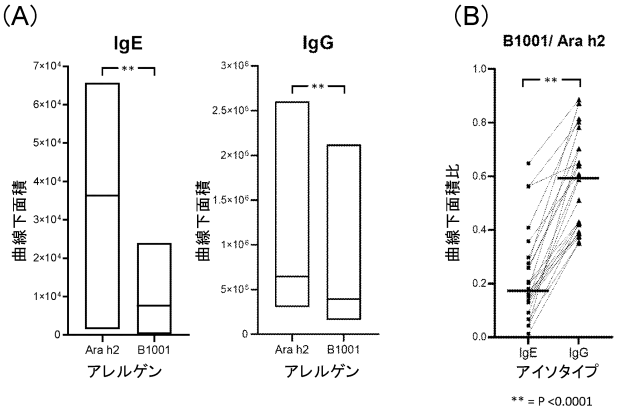
【図１６Ｂ】



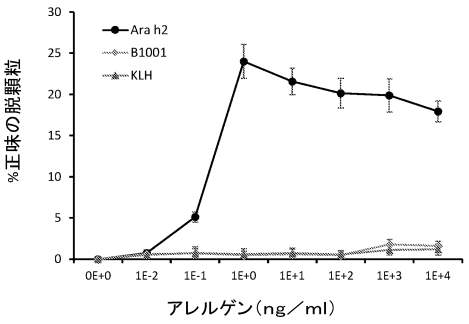
【図１６Ｃ】



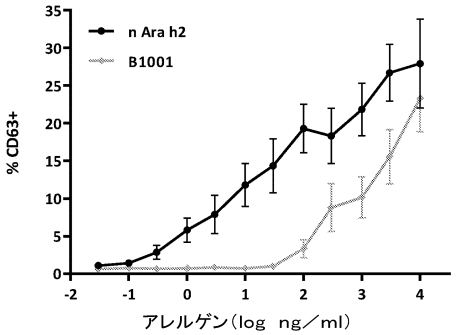
【図１７】



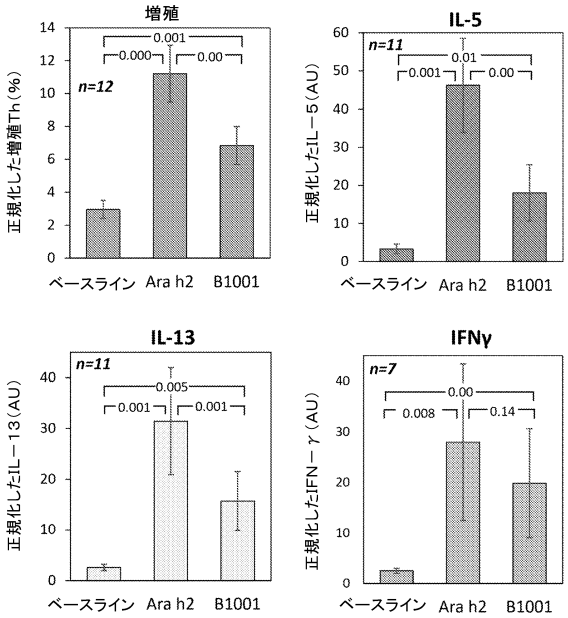
【図１８Ａ】



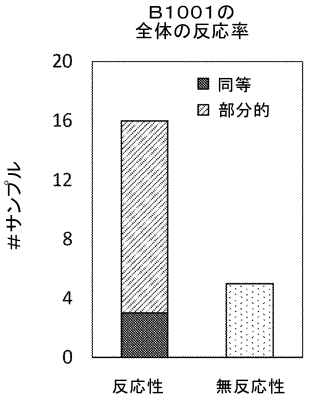
【図１８Ｂ】



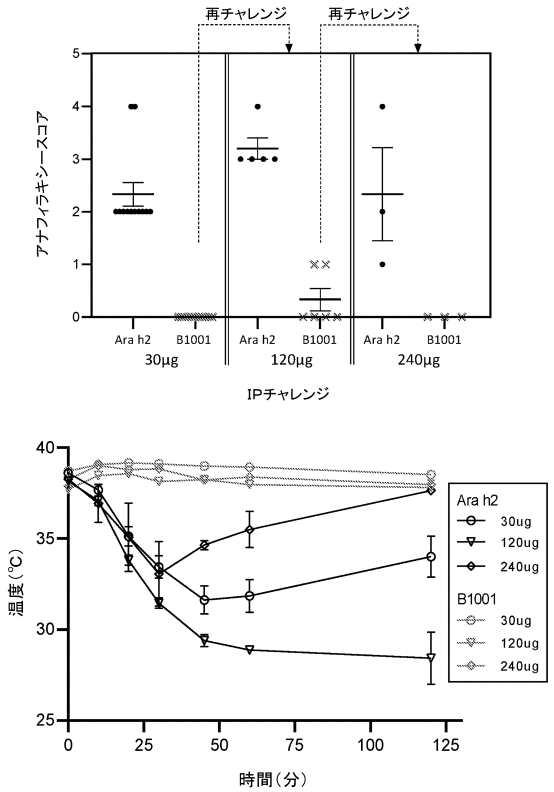
【図１９Ａ】



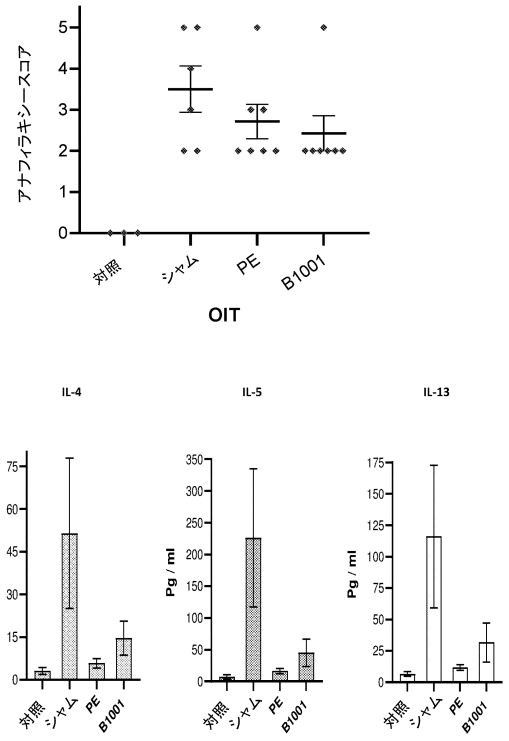
【図１９Ｂ】



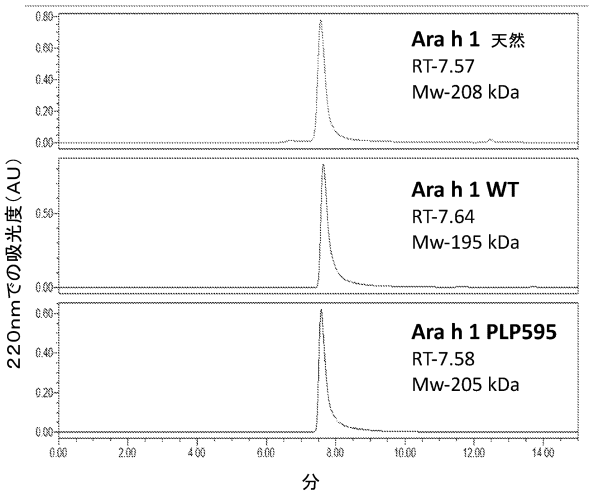
【図２０Ａ】



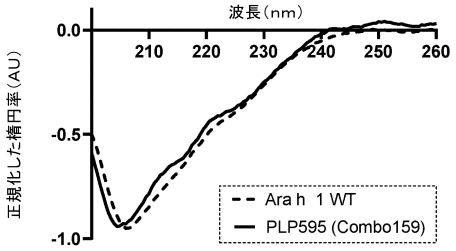
【図２０Ｂ】



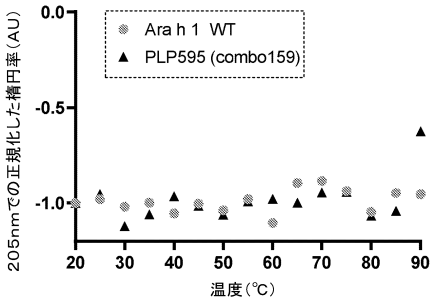
【図２１】



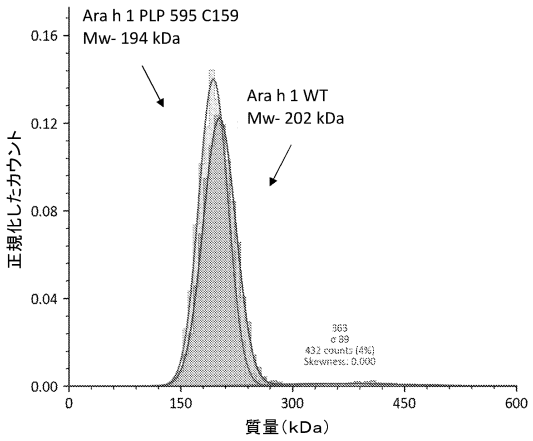
【図２２Ａ】



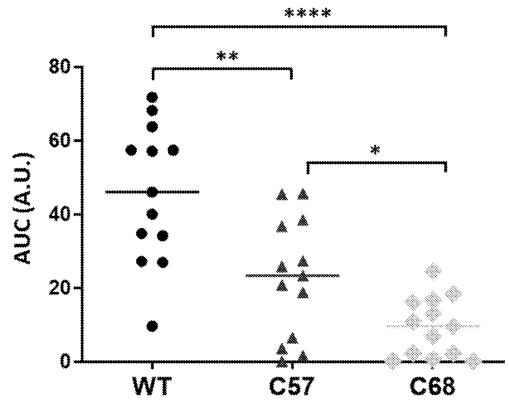
【図２２Ｂ】



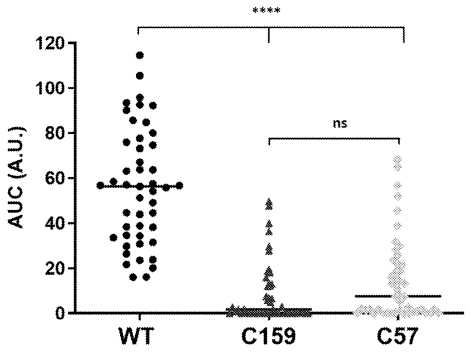
【図２３】



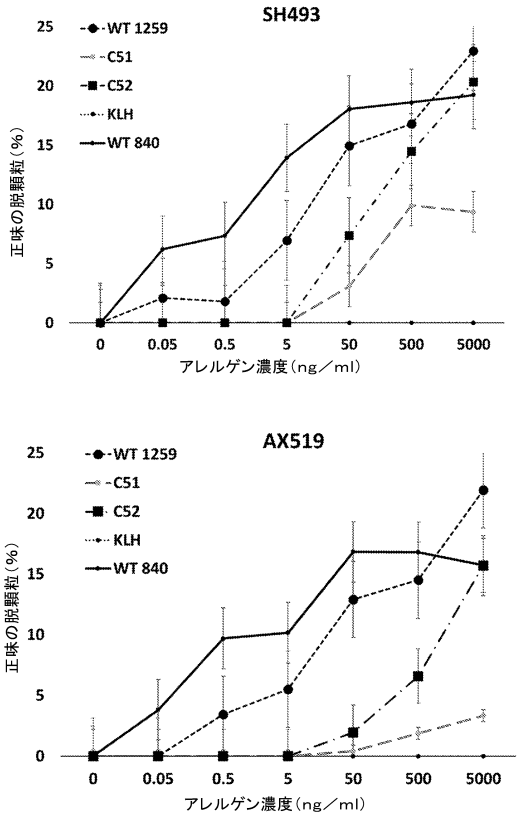
【図２４Ａ】



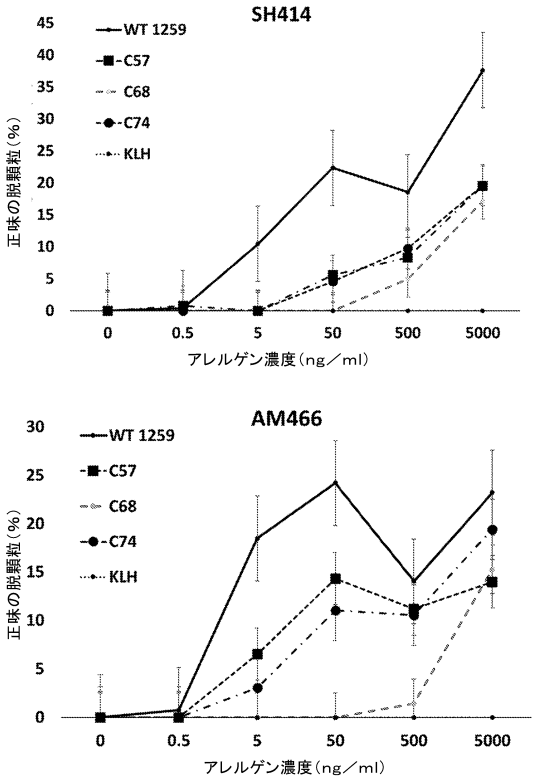
【図２４Ｂ】



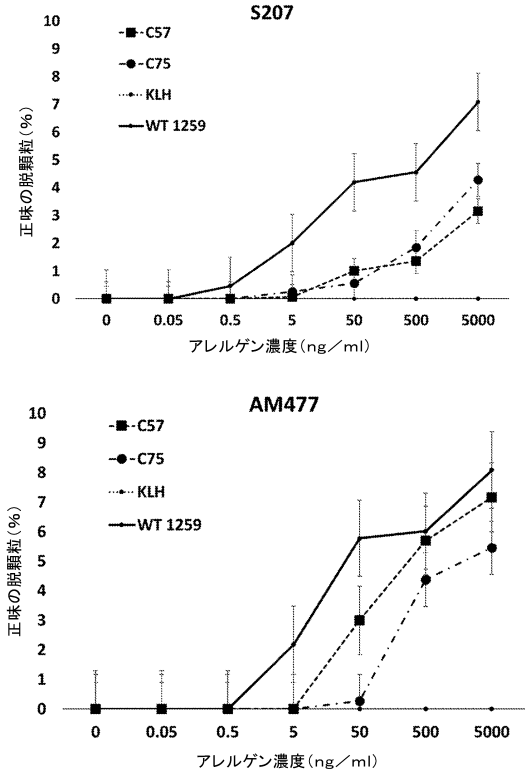
【図２５Ａ】



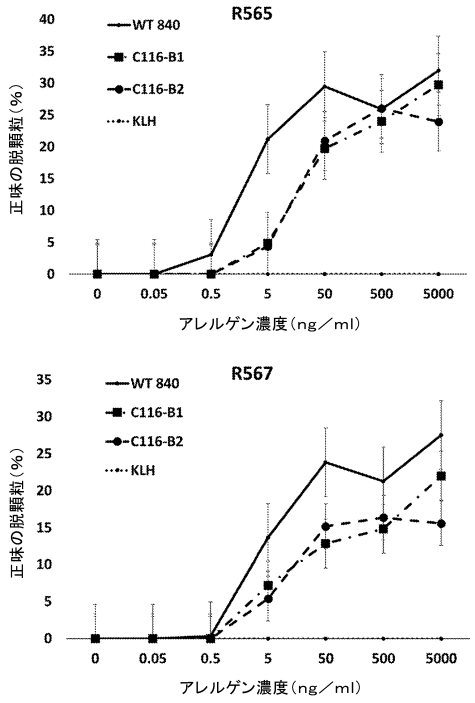
【図２５Ｂ】



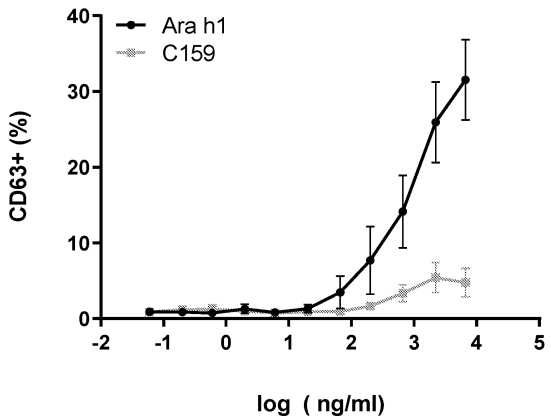
【図２６Ａ】



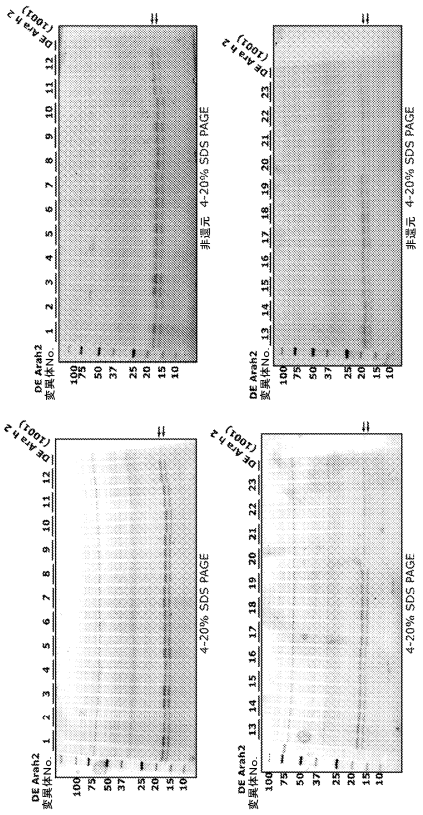
【図２６Ｂ】



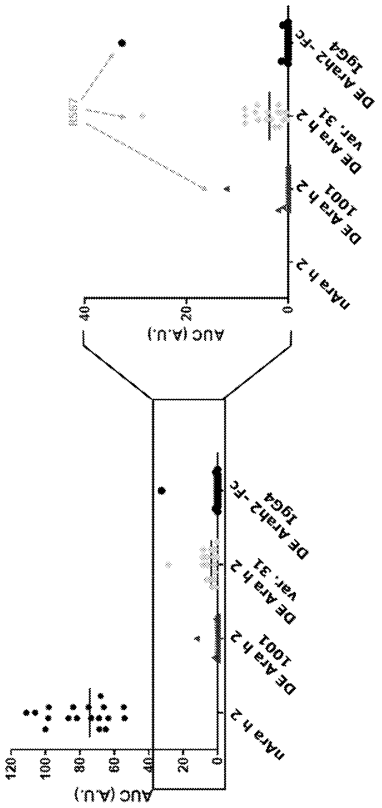
【図２７】



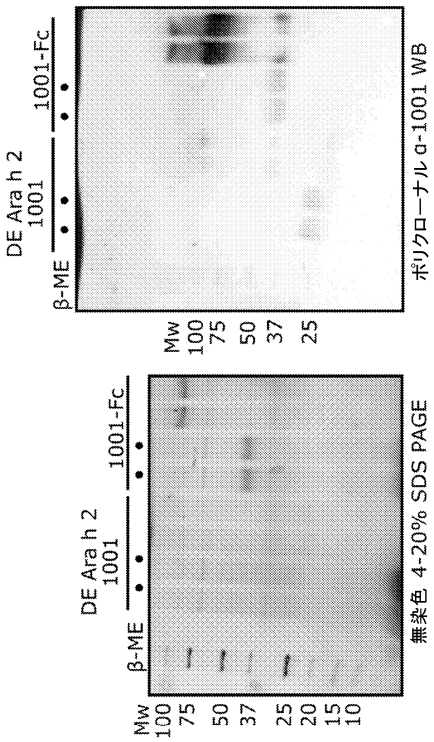
【図２８】



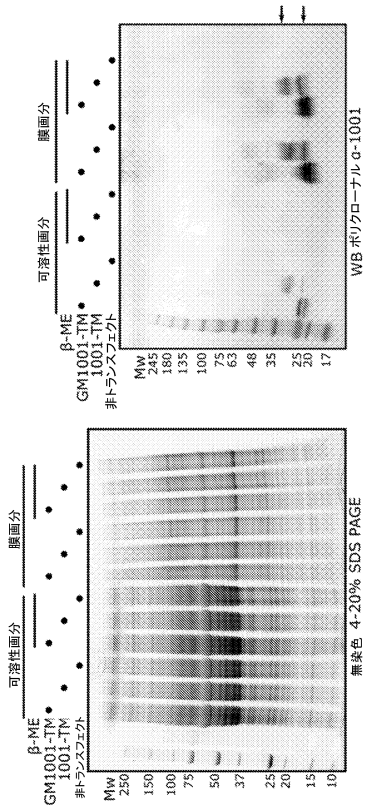
【図２９】



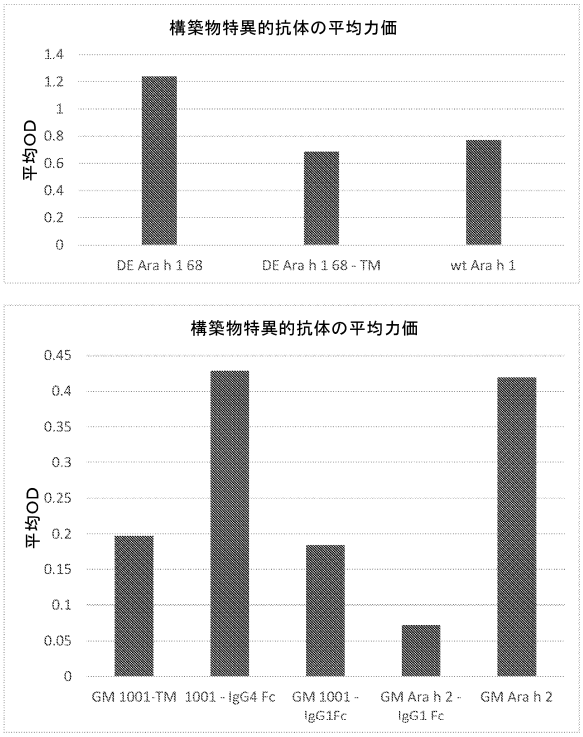
【図３０】



【図３１】

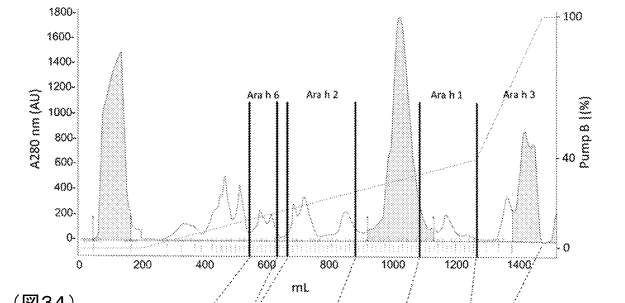


【図３２】

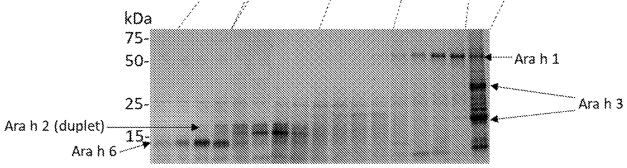


【図３３】

（図33）

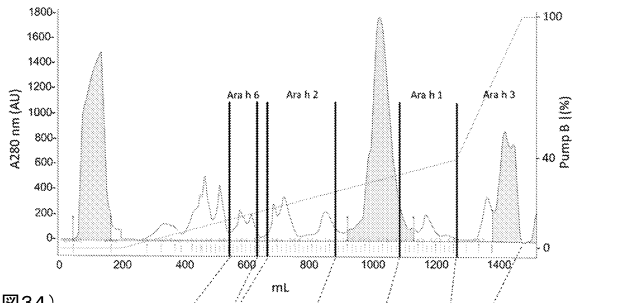


（図34）

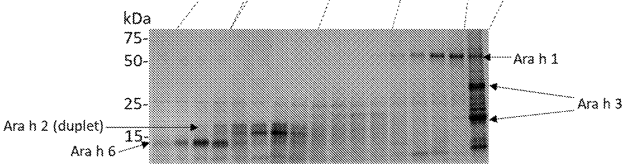


【図３４】

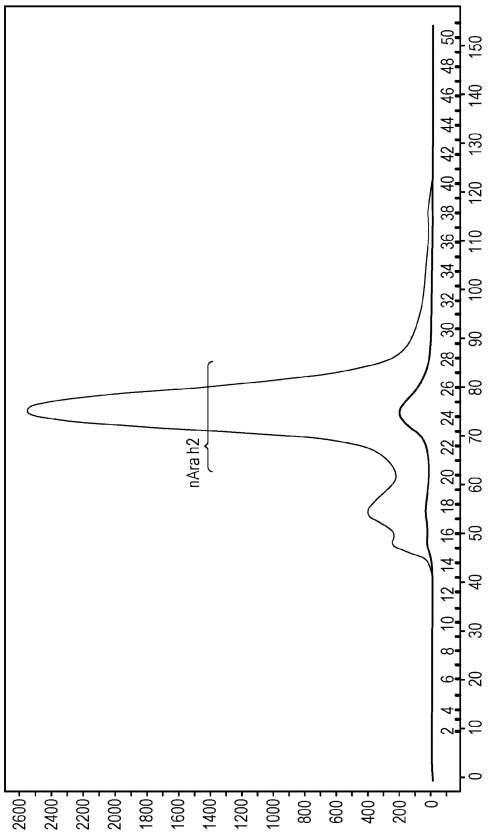
（図33）



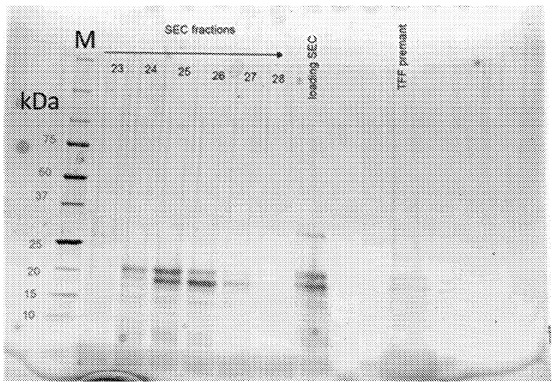
（図34）



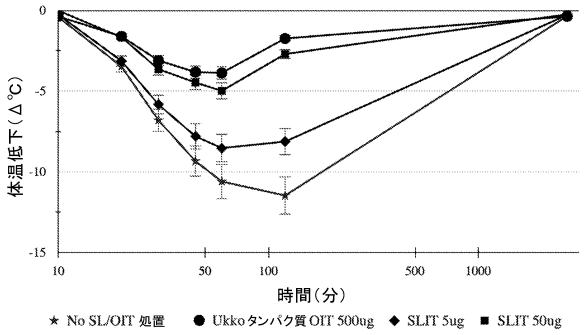
【図３５】



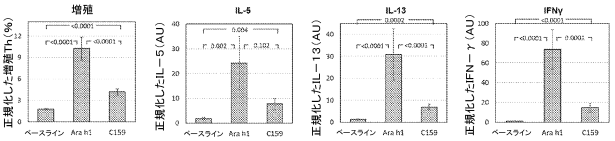
【図３６】



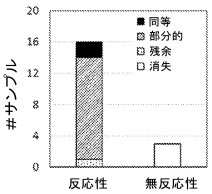
【図３７】



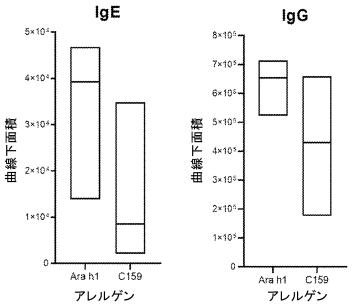
【図３８Ａ】



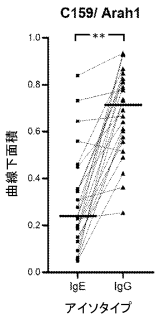
【図３８Ｂ】



【図３９Ａ】



【図３９Ｂ】



** = P <0.0001

【配列表】

<u>20245309260000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/057144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C07K 14/415 (2022.01)
ADD. - A61K 39/35; A61P 37/08 (2022.01)

CPC - INV. - C07K 14/415 (2022.08)
ADD. - A61K 39/35; A61P 37/08 (2022.08)

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/171268 A1 (BIOMAY AG) 21 November 2013 (21.11.2013) entire document	1-3, 5-9, 11-20
A	WO 2019/222281 A1 (IMMUNOMIC THERAPEUTICS INC.) 21 November 2019 (21.11.2019) entire document	1-3, 5-9, 11-20
A	US 2008/0075725 A1 (O'HEHIR et al) 27 March 2008 (27.03.2008) entire document	1-3, 5-9, 11-20
A	US 2020/0124615 A1 (UKKO INC.) 23 April 2020 (23.04.2020) entire document	1-3, 5-9, 11-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 2022	JAN 24 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/057144

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/057144

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
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:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 5-9, 11-20

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/057144

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-41 are drawn to recombinant Ara H 2 variant polypeptides.

The first invention of Group I+ is restricted to a recombinant Ara h 2 variant polypeptide selected to be SEQ ID NO:10. It is believed that claims 1-3, 5-9, and 11-20 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NO:10.

Applicant is invited to elect additional recombinant Ara h 2 variant polypeptides, encoding polynucleotides, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a recombinant Ara H 2 variant polypeptide selected to be SEQ ID NO:11. Additional recombinant Ara H 2 variant polypeptides, encoding polynucleotides, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating peanut allergies requiring the selection of alternative recombinant Ara h 2 variant polypeptides where "wherein said variant comprises the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NOs: 10-63, 168, 170, 195-201, 204-210, 247-249, or comprises an amino acid sequence having at least 80% identity with the amino acid sequences set forth in any of SEQ ID NOs: 10-63, 168, 170, 195-201, 204-210, 247-249."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a recombinant Ara h 2 variant polypeptide comprising one or more substitutions, deletions, insertions. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2013/171268 A1 to Biomay Ag discloses a recombinant Ara h 2 variant polypeptide comprising one or more substitutions, deletions, insertions (Ara h 2 to be modified and thus the loop
regions comprising the fragments of Ara h 2 to be re-ordered, Pg. 20, fifth paragraph; mutated as follows, Pg. 12, first paragraph; rAra h 2 mut1, Pg. 29, bottom of page).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｋ	*39/35 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/35	
Ａ６１Ｋ	*39/39 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39	
Ａ６１Ｐ	*37/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08	
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	

(32)優先日　令和3年11月30日(2021.11.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/292,441
(32)優先日　令和3年12月22日(2021.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/311,117
(32)優先日　令和4年2月17日(2022.2.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/319,393
(32)優先日　令和4年3月14日(2022.3.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/319,394
(32)優先日　令和4年3月14日(2022.3.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．プルロニック
２．ＴＷＥＥＮ
３．ＰＹＴＨＯＮ

イスラエル国モディーン ７１７７９９９・ハルア ハイヴリ ストリート ４１
(72)発明者　ナフタリー キロス、シー
イスラエル国キルヤット ビアリク ２７０７２１９・ガッシュ ハラヴ ストリート １５
(72)発明者　ディアマント、ギル
イスラエル国テル アビブ ６９４１２３１・アノチ ストリート １１
(72)発明者　ブレグマン コーヘン、アルモグ
イスラエル国レホボト ７６２９１０１・アイゼンバーグ ストリート ３
(72)発明者　コーマン、マアヤン
イスラエル国ハル アダル ９０８３６００・マヴォ ハレチェス ストリート ６

(72)発明者　チュプリン、アンナ
イスラエル国テル アビブ ６７０６４２４・ハマアラカ ストリート ２２
(72)発明者　ビロン ソレク、ゾハル
イスラエル国レホボト ７６３２７０６・ワイツマン インスティチュート・メオノット シャイン ストリート １２
(72)発明者　ローゼンフェルド シュラムコビッチ、リオール
イスラエル国モディーン ７１６９０６１・ヤール ハニタ ストリート ７
(72)発明者　ロテム、エタイ
イスラエル国レホボト ７６３８９１５・ドヴノフ ストリート ６
(72)発明者　ガット、ヤイール
イスラエル国レホボト ７６２８９２０・ゴードン アパートメント５ ２４

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA88X AA88Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C084　AA13 MA52 MA66 NA05 NA14 ZB081 ZB082 ZB131 ZB132
4C085　AA03 AA38 BB03 DD62 EE01 EE06 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10
4C086　AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA52 MA66 NA05 NA14 ZB08 ZB13
4H045　AA10 AA30 BA09 CA30 DA86 EA20 EA50 FA74