

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-527450

(P2004-527450A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/002	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 K 39/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-564788 (P2001-564788)	(71) 出願人	501244004
(86) (22) 出願日	平成12年12月6日 (2000.12.6)		シーア ファーマスーティカルズ エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成14年10月7日 (2002.10.7)		アメリカ合衆国 06430 コネティカ
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/033121		ット、フェアフィールド、サスコ ヒル
(87) 国際公開番号	W02001/066136		ロード 640
(87) 国際公開日	平成13年9月13日 (2001.9.13)	(74) 代理人	100067817
(31) 優先権主張番号	60/195,035		弁理士 倉内 基弘
(32) 優先日	平成12年4月6日 (2000.4.6)	(74) 代理人	100085774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 風間 弘志
(31) 優先権主張番号	09/731,375	(72) 発明者	マイケル キャプラン
(32) 優先日	平成12年12月6日 (2000.12.6)		アメリカ合衆国 06525 コネティカ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ット、ウッドブリッジ、レースブルック
			ロード 1217
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 微生物送達システム

(57) 【要約】

本発明は、アレルゲンに対してアレルギーであり又はアレルギーを起こし易い患者において、アレルギー応答特にアナフィラキシー性アレルギー応答を治療し又は予防するための方法及び組成物を提供する。本発明の方法は、患者への微生物の投与を利用し、それらの微生物は、アレルゲンを生成し、抗原提示細胞により貪食作用を受けるまで患者がそれらのアレルゲンにさらされるのを防ぐ。特に好適な微生物は、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌及び酵母である。特に好適なアレルゲンは、食物、毒液、薬物及びゴムにおいて見出されるタンパク質であって、これらは、これらのタンパク質に対してアレルギー性の又はアレルギーを起こしやすい個人においてアレルギー応答及びアナフィラキシー性アレルギー応答を誘出する。これらのタンパク質を改変して、IgE抗体に結合して架橋する能力を減じ、それにより、T細胞媒介のTh1型免疫に影響を与えることなくアナフィラキシーを誘出する危険を減じることできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレルゲンに対するアナフィラキシー性アレルギー応答を起こし易い患者におけるアレルギーを治療する方法であって、下記のステップを含む当該方法：
そのアレルゲンを生成する微生物を含む組成物を用意し；そして
その組成物を患者に有効且つ非毒性の投与量で投与する。

【請求項 2】

用意するステップにおいて、微生物を、細菌、カビ、ウイルス、藻類及び原生動物よりなる群から選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

用意するステップにおいて、微生物を、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌及び酵母よりなる群から選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

用意するステップにおいて、微生物を、大腸菌、ラクトコッカス、リステリア、ビブリオ、サルモネラ及び S . セレピシエよりなる群から選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

用意するステップにおいて、アレルゲンが、食物、毒液又はゴムにおいて見出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

用意するステップにおいて、アレルゲンが、南京豆、ミルク、卵、海産食物、堅果、酪農製品及び果物において見出されるタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

用意するステップにおいて、アレルゲンが、蜜蜂毒液中に見出されるタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

用意するステップにおいて、アレルゲンが、A r a h 1、A r a h 2、A r a h 3 又はこれらのポリペプチド部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

用意するステップにおいて、アレルゲンが、I g E 抗体に結合して架橋する減じた能力を有するように改変されたタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

用意するステップにおいて、微生物が、アレルゲンの一部分を生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

用意するステップにおいて、生成されたアレルゲンの部分が、アレルゲンと比べて減じた数の I g E 結合部位を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

用意するステップにおいて、アレルゲンがポリペプチドであり且つそのアレルゲンの生成が誘導性であり；投与のステップの後に、このポリペプチドの発現を誘導するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

誘導するステップにおいて、ポリペプチドがペリプラスム中へ分泌され又は細胞の外へ分泌される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

用意するステップが、アレルゲンをペリプラスム中へ分泌するグラム陰性細菌又は酵母を含む組成物を用意することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

用意するステップにおいて、アレルゲンが小型分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

アレルゲンに対してアレルギーである患者においてアナフィラキシー性アレルギー反応を

10

20

30

40

50

誘出するアレルゲンを生成する微生物を含む組成物。

【請求項 17】

アレルゲンが、ポリペプチド又は小型分子である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

微生物を、細菌、カビ、ウイルス、藻類及び原生動物よりなる群から選択する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

微生物を、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌及び酵母よりなる群から選択する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 20】

微生物を、大腸菌、ラクトコッカス、リステリア、ビブリオ、サルモネラ及び S . セレピシエよりなる群から選択する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 21】

アレルゲンが、食物、毒液又はゴムにおいて見出される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 22】

アレルゲンが、南京豆、ミルク、卵、海産食物、堅果、酪農製品及び果物において見出されるタンパク質である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 23】

アレルゲンが、蜜蜂毒液中に見出されるタンパク質である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 24】

アレルゲンが、A r a h 1、A r a h 2、A r a h 3 又はこれらのポリペプチド部分である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 25】

アレルゲンが、I g E 抗体に結合して架橋する減じた能力を有するように改変された、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 26】

微生物が、アレルゲンの一部分を生成する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 27】

生成されたアレルゲンの部分が、アレルゲンと比べて減じた数の I g E 結合部位を有する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 28】

アレルゲンの生成が誘導性である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 29】

アレルゲンが、ペリプラスム又は細胞の外へ分泌されるポリペプチドである、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 30】

微生物が、アレルゲンをペリプラスム中へ分泌するグラム陰性細菌又は酵母である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 31】

アナフィラキシー性アレルギー応答を受けやすい患者においてアナフィラキシー性アレルギー応答を誘出するアレルゲンを生成する微生物を含み且つ製薬上許容しうるキャリアーを更に含む医薬組成物。

【請求項 32】

アレルギーが、ポリペプチド又は小型分子である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

微生物が、アナフィラキシー性アレルギー応答を受けやすい患者においてアナフィラキシー性アレルギー応答を誘出するアレルゲンの一部分を生成する、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

20

30

40

50

発明の背景

アレルギー反応は、世界的に重大な公衆衛生上の問題を提出している。花粉アレルギー（アレルギー鼻炎又は枯草熱）だけで、人口の約10～15%が影響を受け、莫大な経済的コストを生じている。例えば、報告は、1990年に米国において、180万ドルの直接的及び間接的出費を生じたと見積もっている（Fact Sheet, National Institute of Allergy and Infectious Diseases; McMenamin, Annals of Allergy 73:35, 1994）。抗原にさらされることで引き金がかかってくる喘息も又、重大な公衆衛生上の問題であり、アナフィラキシー性アレルギーと同様に、極端な場合には死に至りうる。現在、喘息は、年間数百万人が病院を訪れる原因となっており、その頻度は増加している。現在可能な唯一の治療は、症状の緩和（例えば、気道の狭窄の除去）のためのものである。花粉及び他の吸入されるアレルギー（例えば、カビ、塵ダニ、動物の鱗屑）に関連する経済的コストよりも一層重大なのは、食物アレルギー、昆虫毒、薬物及びラテックスなどのアレルギーについて認められるアナフィラキシー性アレルギー反応の危険である。

10

20

30

40

50

【0002】

アレルギー反応は、個体の免疫系が会った抗原に対して過剰反応し又は不適当に反応する場合に生じる。典型的には、個体が始めて特定の抗原にさらされたときにはアレルギー反応はない。しかしながら、それは、抗原に対する初期応答であり、その後のアレルギー反応のためのシステムを準備する。特に、抗原は、抗原提示細胞（APC；例えば、マクロファージ及び樹状細胞）により取り込まれ、該細胞は、その抗原を分解してから抗原断片をT細胞に提示する。T細胞特にCD4⁺「ヘルパー」T細胞は、他の免疫系細胞に対する効果を有するサイトカインのコレクションを分泌することにより応答する。応答性CD4⁺T細胞により分泌されたサイトカインのプロファイルは、その後にその抗原にさらされたときにアレルギー反応が誘発されるか否かを決定する。2つのクラスのCD4⁺T細胞（Th1及びTh2）が、抗原に対して高まる免疫応答の種類に影響を及ぼす。

【0003】

Th2細胞は、様々なサイトカイン及びインターロイキン（IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びIL-13を含む）を分泌することができる。IL-4の一つの効果は、B細胞の成熟を刺激することであり、該細胞は、抗原に特異的なIgE抗体を生成する。アレルギーに対するアレルギー応答は、抗原特異的なIgE抗体の生成により特徴付けられ、それらはIL-4分泌性CD4⁺T細胞の助成に依存している。これらの抗原特異的なIgE抗体は、マスト細胞、好塩基球及び好酸球の表面のレセプターに結合し、そこにおいて、それらは、次に抗原にさらされたときに引き金として作用して、急性アレルギー反応を開始する。その個体が、その抗原に2度目に出会った場合に、その抗原は、これらの表面結合したIgE分子によって迅速に結合される。各抗原は、典型的には、1つより多くのIgE結合部位を有し、それにより、表面結合した複数のIgE分子が同時に抗原に結合する（直接又は間接的に）ことにより互いに迅速に架橋される。かかる架橋は、マスト細胞の脱顆粒を誘導し、それは、ヒスタミンその他の物質の放出を生じ、これらがアレルギー反応の引き金を引く。高レベルのIgE抗体を有する個体は、特にアレルギーの傾向があることが知られている。

【0004】

アレルギーの現在の治療は、特定のアレルギーに感受性の個体に周期的注射によって「ワクチン接種」を試みることを又はその個体を生アレルギーの粗懸濁液で処置することを含んでいる。既知量の抗原の制御された投与によるゴールは、その個体で開始されたIgE応答を調節することである。もしこの治療が成功すれば、その個体のIgE応答は減少し、又は消失さえしうる。しかしながら、この治療は、数回のワクチン接種を長期間（3～5年）にわたって必要とし、非常にしばしば所望の結果を生じない。その上、ある個体は、内包的な制御された投与にもかかわらず、これらのワクチンに対するアナフィラキシー反応を被る。

【0005】

明らかに、アナフィラキシーを含む重篤なアレルギー応答を誘出するアレルゲンに対するアレルギーの患者を治療する方法及び予防する方法に対する要求がある。

【0006】

発明の概要

本発明は、患者における免疫応答を調節する方法及び組成物を提供する。患者における望ましくないアレルギー反応及びアナフィラキシー性アレルギー反応を治療し又は予防する方法を提供することは、本発明の一つの面である。本発明の方法は、患者に、関心あるアレルゲンを発現し又は生成する微生物を投与することを含んでいる。提示する作用の機構に限定はされないが、投与の後に、これらの微生物は、患者内の抗原提示細胞により取り込まれ、そこで発現された抗原は放出される。抗原提示細胞内で処理されてその細胞表面に提示された後に、それらの処理された抗原は、T細胞媒介の免疫応答を活性化する。それ故、アレルゲンを発現して患者に送達するように遺伝子改変された微生物の利用は、それらのアレルゲンが患者のIgE抗体にさらされてアレルギー反応をそしてひょっとしたらアナフィラキシーを生じるのを減少させる。それ故、本発明は、免疫療法中のアナフィラキシーの危険を低下させる。その上、これらの微生物は、天然のアジュバントとして作用して、望ましいTh1型の免疫応答を増強する。

10

【0007】

好適具体例において、微生物は、本発明によって、選択したポリペプチド又はタンパク質を発現するように遺伝子改変されて、送達用ビヒクルとして利用される。かかる微生物には、細菌、ウイルス、カビ（酵母を含む）、藻類及び原生動物が含まれるが、これらに限らない。一般に、本発明によって利用するのに好適な微生物は、単細胞、単一孢子又は単一ビリオン生物体である。加えて、本発明の範囲内に含まれるのは、関心あるポリペプチドを生成するように改変された多細胞生物体に由来する細胞である。

20

【0008】

特に好適な具体例において、細菌又は酵母を、アレルゲン性蛋白質を発現して個体に送達し、それらのアレルゲンに対するアレルギー応答（アナフィラキシー性アレルギー応答を含む）を治療し又は予防するための微生物として利用する。グラム陽性及びグラム陰性細菌を本発明において利用することができ、送達用ビヒクルを有する。これらの細菌により発現された抗原は、分泌可能であっても分泌されなくてもよい。タンパク質の分泌は、細胞培地への分泌を含むことができる。グラム陽性細菌及び酵母について、分泌は、ペリプラズムへの分泌を含みうる。ポリペプチドの分泌は、分泌シグナルペプチドにより促進されうる。

30

ある好適具体例において、アレルゲン性化合物を発現する微生物を、弱毒化微生物、非病原性微生物、非感染性微生物又は殺菌された微生物として、組成物にて、患者に投与することができる。好ましくは、これらの殺菌された微生物は、これらのポリペプチドの抗原性を低下させることなく殺菌される。

【0009】

他の好適具体例において、利用するアレルゲンは、食物、毒、薬物及びゴムベースの製品において見出されるアレルゲンである。特に好ましいタンパク質アレルゲンは、食物及び毒液の中に見出され、これらは、これらのアレルゲンに対してアレルギーである患者においてアナフィラキシー性アレルギー応答を誘出する。本発明に含まれるのは、アミノ酸配列が自然においてタンパク質中に見出されるペプチド及びポリペプチドである。やはり本発明に含まれるのは、これらのペプチド、ポリペプチド及びタンパク質のIgE抗体に結合して架橋する能力を減じる改変を有するアレルゲンである。やはり本発明に含まれるのは、微生物により生成される非ペプチド性アレルゲンであって、例えば、ペニシリンなどの抗生物質が含まれる。

40

【0010】

この発明の他の面において、患者におけるアレルギー及びアナフィラキシー性アレルギー応答の治療又は予防において使用するための組成物は、人の手によって処理された微生物、好ましくは、本発明によるアレルゲンを生成するように導入される核酸の導入により処

50

理された微生物を含む。ある好適具体例において、生成されるアレルゲンは、導入された核酸によりコードされるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質である。

【0011】

定義

「アレルゲン」：「アレルゲン」は、(i) 個体において I g E 応答を誘出し；且つ / 又は (ii) 喘息反応（例えば、好酸球により特徴付けられる慢性の気道炎症、気道の過敏性、及び過剰な粘液産生）にかかる反応は、検出可能な I g E 応答を含んでも含まなくてもよい）を誘出する抗原である。本発明の目的につき好適なアレルゲンは、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質アレルゲンである。タンパク質アレルゲンの典型的なリストを、付表として与える。このリストは、公知のアレルゲンのリストを提供している [f t p : / / b i o b a s e . d k / p u b / w h o - i u i s / a l l e r g e n . l i s t](http://biobase.dk/pub/who-iuis/allergen.list) (2000年3月1日更新) から改作したものである。他の好適アレルゲンは、タンパク質により生成される小分子などの化学化合物である。

10

【0012】

「アレルギー反応」：アレルギー反応は、アレルゲンに対する個体の臨床的応答である。アレルギー反応の症状は、皮膚（例えば、蕁麻疹、血管浮腫、そう痒症）、呼吸器系（例えば、あえぎ、咳、喉頭浮腫、鼻漏、なみだ眼 / かゆい眼）、胃腸（例えば、嘔吐、腹痛、下痢）、及び / 又は心臓血管系（全身反応が起きた場合）に影響しうる。本発明の目的につき、喘息反応は、アレルギー反応の一形態であると考えられる。

【0013】

「アナフィラキシー性抗原」：本発明による「アナフィラキシー性抗原」は、アレルギーの個体において、自然条件下で、自然状態において遭遇したときに、アナフィラキシー反応の危険を与えると認められる抗原（又は、アレルゲン）である。例えば、本発明の目的につき、花粉及び動物の鱗屑又は排泄物（例えば、唾液、尿）は、アナフィラキシー性抗原であるとは考えられない。他方、食物抗原、昆虫抗原、薬物及びゴム（例えば、ラテックス）抗原ラテックスは、一般に、アナフィラキシー性抗原であると考えられる。食物抗原は、本発明の実施における利用に特に好適なアナフィラキシー性抗原である。特に興味深いアナフィラキシー性抗原は、それに対する反応が一般に死亡の危険を生じるほど激しいものである（例えば、堅果、種子及び魚）。

20

【0014】

「アナフィラキシー」又は「アナフィラキシー反応」は、ここで用いる場合、マスト細胞及び好塩基球上の高親和性の I g E レセプターの抗原に誘導された架橋に続くマスト細胞の脱顆粒とその後のメディエーターの放出及び標的器官例えば気道、皮膚消化管及び心臓血管系における病理学的応答の生成により特徴付けられる免疫応答をいう。当分野で知られているように、アナフィラキシー反応の激しさは、例えば、皮膚の反応、眼及び口の周りののはれ、及び / 又は下痢、及びその後の呼吸の反応例えばあえぎ及び呼吸困難をアッセイすることによりモニターすることができる。最も激しいアナフィラキシー反応は、意識の喪失及び / 又は死に至りうる。

30

【0015】

「抗原」：「抗原」は、(i) 免疫応答を誘出する任意の化合物又は組成物；及び / 又は (ii) T細胞レセプターに結合し（例えば、MHC分子により提示された場合に）若しくはB細胞により産生された抗体に結合する任意の化合物である。当業者は、一の抗原は、種々の化学化合物の集合（例えば、粗抽出物又は調製物）であっても単一の化合物（例えば、タンパク質）であってもよいということを認めるであろう。好適な抗原は、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質抗原である。

40

【0016】

「抗原提示細胞」：「抗原提示細胞」又はA P Cには、公知のA P C例えばランゲルハンス細胞、輸入リンパ管のベール細胞、樹状細胞及びリンパ器官の鉗合細胞が含まれる。この用語は又、この発明によるポリペプチド及びタンパク質を取り込む単核細胞例えばリンパ球及びマクロファージをも包含する。

50

【0017】

「減弱」：微生物の「減弱」は、ここで用いる場合、微生物が個体又は実験室の試験動物において有意の毒性反応を誘発しないように該微生物を操作することをいう。これらの操作は、遺伝的方法を包含し、当分野で周知である。

【0018】

「I g E 結合部位」：I g E 結合部位は、抗抗原性 I g E 分子により認識される抗原の一領域である。かかる領域は、(i) 抗原の I g E への結合；(i i) 抗抗原性 I g E の架橋；(i i i) 表面に結合した抗抗原性 I g E を含むマスト細胞の脱顆粒；及び/又は(i v) アレルギー症状の発生（例えば、ヒスタミンの放出）を生じるのに必要且つ/又は十分なものである。一般に、I g E 結合部位は、特定の抗原又は抗原断片につき、その抗原又は断片をアレルギーの個体（好ましくは、発明の組成物を投与される種の個体）に由来する血清にさらすことによって規定される。種々の個体は、同じ抗原上の種々のエピトープを認識する I g E を生成することができるということは認められよう。従って、抗原又は断片を血清試料の代表的プールにさらすことは、典型的に、望ましいことである。例えば、ヒトの I g E により認識される部位が所定の抗原又は断片において同定されることが望ましい場合には、血清を、好ましくは、その抗原に対して示されたアレルギーを有する少なくとも 5 ~ 10 の好ましくは少なくとも 15 の個体からプールする。当業者は、他のコンテキストにおける有用なプールの戦略をよく知っている。

10

【0019】

「免疫学的誘導剤」：用語「免疫学的誘導剤」は、ここでは、T 細胞による T h 1 刺激サイトカインの発現を促進する薬剤として用いられ、C D 4 0、C D 4 0 リガンド、C p G モチーフ含有オリゴヌクレオチド、T N F 及び微生物抽出物例えば黄色ブドウ球菌調製物、熱殺菌したリステリア菌及び改変コレラ毒素などの因子を包含する。

20

【0020】

「誘導性プロモーター」：用語「誘導性プロモーター」は、ここで用いる場合、化学剤の存否によって直接活性化され又は温度変化などの環境刺激によって間接的に活性化されるプロモーター部位を意味する。プロモーターは、酵素 R N A ポリメラーゼが結合して遺伝子転写プロセスを開始する D N A の領域である。

【0021】

「マスト細胞」：文脈から明らかなように、用語「マスト細胞」は、ここでは、しばしば、マスト細胞、好塩基球、及び I g E レセプターを有し、結合された I g E 分子の架橋によって活性化されたときにヒスタミン、血管拡張物質及び/若しくは他のアレルギー応答メディエーターを放出する他の細胞の少なくとも一つを指すために用いられる。

30

【0022】

「微生物」：「微生物」は、ここで用いる場合、細胞、細菌、カビ、ウイルス、藻類及び原生動物である。好適な微生物は、遺伝子操作をして所望のポリペプチドを生成させることのできるものである。

【0023】

「ペプチド」：本発明によれば、「ペプチド」は、ペプチド結合により一緒に結合された少なくとも 3 つのアミノ酸のストリングを含む。発明のペプチドは、非天然アミノ酸（即ち、自然に存在しないがポリペプチド鎖に組み込むことのできる化合物；例えば、機能的イオンチャンネルに上首尾に組み込まれた非天然アミノ酸の構造を表示している <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruc.t.gif> 参照）及び/又はアミノ酸類似体（当業者に公知）を代わりに用いることはできるが、好ましくは、天然のアミノ酸のみを含む。発明のペプチド中の少なくとも 1 つのアミノ酸を、例えば、化学的存在物例えば炭水化物基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、結合体形成、官能化又は他の改変のためのリンカーなどの付加によって改変することもできる。

40

【0024】

ペプチド又はポリペプチドは、もしそのペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列がタン

50

パク質のアミノ酸配列中に見出されるならば、そのタンパク質から導かれる。これらの配列は、好ましくは、同一であるが、約80～100%の配列相同性を有してよい。アミノ酸残基が、他の類似の物理的特性（例えば、疎水性、親水性、電荷、芳香族的構造及び極性）を有するアミノ酸残基で置換されうるということも又、認められる。

【0025】

「減少したIgE結合」：発明の組成物又は薬剤は、任意の利用可能なアッセイにおいて、未改変の抗原と比較して、IgEとの低レベルの相互作用を示すならば、「減少したIgE結合」を有すると考えられる。例えば、改変した抗原は、もし(i)抗抗原IgEに対する親和性（例えば、直接結合の研究又は間接的競争の研究を用いてアッセイしたもの）が、完全な抗原と比較して、少なくとも約2～5倍、好ましくは少なくとも約10、20、50若しくは100倍減少し；(ii)改変した抗原の、抗抗原IgEの架橋を支持する能力が、完全な抗原と比較して、少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5、10、20、50若しくは100倍減少し；(iii)表面結合した抗抗原IgEを含むマスト細胞が、改変した抗原と接触した際に、未改変抗原と比較して、脱顆粒が一層少なく（少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約3、5、10、20、50若しくは100倍少ない）；及び/又は(iv)改変抗原と接触した個体が、未改変抗原と比較して一層少ない（少なくとも約2倍、好ましくは約3、5、10、20、50若しくは100倍少ない）アレルギー症状を起こし若しくは改変抗原にさらされた際に起きた症状の程度が未改変抗原と比較して低いならば、減少したIgE結合を有すると考えられる。

10

【0026】

「分泌シグナル」：分泌シグナルは、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に結合された場合に、その結合体融合タンパク質の細胞膜を横切る輸送を促進する任意のアミノ酸配列である。微生物における分泌シグナルの利用に関して、融合タンパク質の輸送は、ペリプラスムへの内膜の横断を包含する。分泌シグナルが、融合タンパク質の外膜を横切る細胞外培地への輸送をも促進することは好ましい。タンパク質の細胞外培地への分泌は、「排出」と考えられる。

20

【0027】

「感作されたマスト細胞」：「感作された」マスト細胞は、表面結合した抗原特異的なIgE分子を有するマスト細胞である。この用語は、必然的に、抗原特異的である。即ち、任意所定の時間において、特定のマスト細胞は、ある種の抗原（その表面上のIgEにより認識されるもの）に対しては「感作される」が、他の抗原に対しては感作されない。

30

【0028】

「小さい分子」：ここで用いる場合、用語「小さい分子」は、実験室で合成された化合物又は自然界で見出された化合物をいう。典型的には、小さい分子は、有機分子であって、幾つかの炭素-炭素結合を含み、そして1500ダルトン未満の分子量を有することを特徴とする（もっとも、この特性表示は、本発明のために制限することを意図するものではない）。アレルギーである「小さい分子」の例には、制限はしないが、ペニシリン、アルコール及びアスピリンが含まれる。非有機の小さい分子のアレルギーには、例えば、ワイン中に存在する亜硫酸塩が含まれる。

【0029】

「影響を受けやすい個体」：本発明によって、個人は、もし(i)所定の抗原にさらされた後にアレルギーの症状を示したことがあり；(ii)その個人の遺伝的な家族のメンバーが、その抗原に対するアレルギーの症状を示しており（特に、もしそのアレルギーが遺伝的要素を有することが知られているならば）；及び/又は(iii)抗原特異的なIgEがその個人において、血清中又はマスト細胞において見出されているのであるならば、アレルギー反応に影響を受けやすい。

40

【0030】

「Th1応答」及び「Th2応答」：本発明のある種の好適なペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び組成物は、それらの、Th2応答を抑制し及び/又はTh1応答を刺激する能力によって特徴付けられる（好ましくは、Th2応答を刺激するそれらの能力と比較

50

して)。Th1及びTh2応答は、サイトカイン及び/又は補因子の種々のコレクションの生成により特徴付けられるよく確立された択一的免疫系応答である。例えば、Th1応答は、一般に、IL-1、IL-2、IL-12、IL-18、IFN、IFN、TNFなどのサイトカインの生成と関係しており；Th2応答は、一般に、IL-4、IL-5、IL-10などのサイトカインの生成と関係している。T細胞サブセットの抑制又は刺激の程度は、例えば細胞質内サイトカイン測定法を含む任意の利用可能な手段によって測定することができる。この発明の好適具体例において、Th2抑制は、例えば、刺激されたT細胞培養上清におけるIL-4、IL-5及び/又はIL-13の定量又はT細胞の細胞質内IL-4、IL-5及び/又はIL-13の評価（例えば、タンパク質染色又はmRNAの分析による）によってアッセイされ；Th1刺激は、例えば、活性化T細胞培養上清におけるIFN、IFN、IL-2、IL-12及び/又はIL-18の定量又はこれらのサイトカインの細胞質内レベルの評価によってアッセイされる。

10

20

30

40

50

【0031】

ある好適具体例の説明

本発明は、患者における免疫応答を調節するための組成物及び方法を提供する。患者における抗原に対する望ましくないアレルギー性免疫応答を、関心あるアレルゲンを発現する改変した細胞、ウイルス又は孢子（「微生物」）を投与することによって治療することは、本発明の一つの面である。アレルゲンを発現して送達するように遺伝的に改変した微生物を利用することにより、それらのアレルゲンを患者のIgEにさらすことにより媒介されるアレルギー応答は、減少し又は排除される。提示する機構に限定はされないが、本発明の改変した微生物は抗原提示細胞（APC）例えばマクロファージ及び樹状細胞に取り込まれ、アレルゲンがIgE抗体にさらされることがないということが予想される。一度APCに入ったならば、発現されたアレルゲンは、それらの微生物の溶解により又はそれらの微生物による抗原の分泌によって放出される。これらのアレルゲンは、次いで、例えば、APCによる部分消化によって処理されてその細胞の表面に提示される。

【0032】

一度処理された抗原は、細胞表面に提示され、細胞傷害性T細胞応答及びヘルパーT細胞応答の活性化が、タンパク質アレルゲンに対する細胞性免疫応答及びTh1媒介のB細胞応答を促進する。加えて、処理された抗原は、マスト細胞及び好塩基球の表面に位置するIgE抗体と結合してそれらを架橋して、アレルギー性の及びときには致命的なアナフィラキシー応答の原因となるヒスタミン及び他の血管拡張物質の放出へと導く能力が減少している（又は、能力を有しない）。

【0033】

宿主微生物

アレルゲンを発現する（例えば、ポリペプチド若しくはタンパク質アレルゲンの発現により又は小さい分子のアレルゲンの合成に関与するポリペプチド若しくはタンパク質酵素の発現によって）ことのできる任意の微生物を、本発明による送達用ビヒクルとして利用することができる。かかる微生物には、細菌、ウイルス、カビ（酵母を含む）、藻類及び原生動物が含まれるが、これらに限らない。一般に、微生物は、単細胞であり、単一孢子又は単一ビリオン生物体である。加えて、本発明の範囲内に含まれるのは、関心あるポリペプチドを生成するように改変された多細胞生物である。遺伝的に操作して所望のポリペプチドを生成させることのできる微生物が、好適である。（Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, Inc., 1999, 参考として、本明細書中に援用する）遺伝的操作には、宿主ゲノムの突然変異、遺伝物質の宿主ゲノムへの挿入、宿主ゲノムの遺伝物質の欠失、宿主の染色体外遺伝物質による形質転換、線状プラスミドによる形質転換、環状プラスミドによる形質転換、遺伝物質の宿主への挿入（例えば、mRNAの注入）、トランスポゾンの挿入及び遺伝物質の化学的改変が含まれる。核酸（発現可能な遺伝子を含むもの）の構築方法及びかかる核酸を発現系に導入してコードされたタンパク質を発現させる方法は、当分野で十分に確立されている（例えば、Sambrook等、Molecular

r Cloning: A Laboratory Manual, 第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 参照、参考として本明細書中に援用する)。

【0034】

本発明によるアレルゲン送達のための微生物例えば細菌及び酵母の利用は、免疫療法のための微生物内にカプセル封入されてないアレルゲンの送達を超える多くの利点を提供する。一般に、細菌などの微生物は、アジュバントとして作用することが知られている(総説としては、例えば、Freitag等、Curr Top Microbiol Immunol 236: 215-36, 1999を参照されたい)。それ故、微生物の、アレルゲンを患者及び患者のAPCに送達するための利用は、アレルゲンのIgE媒介のアレルギー応答からの防護を与え且つアジュバント効果をも与える(これは、Th1型免疫応答をアレルギー応答の影響を受けやすい個体から誘出する)。加えて、非病原性、非感染性の減弱化及び/又は殺菌した微生物の利用は、アレルゲン送達用ビヒクルに結合しうる毒性を低減し又は排除する。

10

【0035】

好適具体例において、細菌を、タンパク質送達用ビヒクルとして利用する。一般に、細菌は、細胞壁の構造に依って、グラム陰性又はグラム陽性に分類される。当業者は、本発明によるタンパク質を発現するのに利用できるグラム陰性及びグラム陽性細菌を同定することができる。グラム陰性細菌の属及び種の非制限的例には、大腸菌、コレラ菌、サルモネラ属、リステリア属、レジオネラ属、志賀赤痢菌属、イエルセニア属、シトロバクター属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、モルガネラ属、プロテウス属、プロビデンシア属、セラチア属、プレシオモナス属、アエロモナス属が含まれる。本発明で利用することのできるグラム陽性細菌の属及び種の非制限的例には、枯草菌、スポロラクトバチルス属、クロストリジウム属、アルスロバクター属、ミクロコッカス属、ミコバクテリウム属、ペプトコッカス属、ペプトストレプトコッカス属及びラクトコッカス属が含まれる。

20

【0036】

送達ビヒクルとして利用するためのグラム陰性細菌システムは公知であり、本発明で利用することができる。例えば、大腸菌は、よく研究された細菌であり、大腸菌におけるタンパク質発現方法は、十分確立されている。大腸菌の殆どの株は、該菌は自然に消化管内で見出されるものであるもので、非病原性である利点を有している。それ故、大腸菌は、本発明における送達用ビヒクルとして好適である。加えて、Calderwood等(米国特許第5,747,028号)は、感染性微生物に対する生ワクチンとして利用するための抗原の製造のためにコレラ菌を送達用ビヒクルとして利用している。Miller及びMeekalanos(米国特許第5,731,196号)は、感染性微生物に対する生ワクチンとして利用するための抗原の製造のためにサルモネラ属を送達用ビヒクルとして利用している。Hess等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1458-1463, 1996)は、リステリアの抗原決定基を分泌する組換え減弱サルモネラを、リステリア症に対する防護のための生ワクチンとして利用している。Donner等(WO98/50067)は、減弱化ネズミチフス菌を、受精率を制御するためのポリペプチドの分泌のためのグラム陰性宿主として利用しており、イエルシニアを含む他の減弱化グラム陰性株を利用してかかるポリペプチドを発現させて分泌させることができることも教示している。

30

40

【0037】

グラム陽性細菌も又、患者における免疫応答を調節するためのタンパク質送達用ビヒクルとして研究されてきた。WO97/14806は、ポリペプチドに対する免疫応答を増進するためにそれらのポリペプチドを身体内に送達するためのラクトコッカス属の利用を記載している。しかしながら、WO97/14806は、アナフィラキシーを生じうる食物アレルギー及び毒液アレルギーを有する患者を治療するためのラクトコッカスの利用を教示していない。

【0038】

50

他の好適具体例においては、酵母が、タンパク質送達用微生物として利用される。酵母は、選択したタンパク質を発現させるために遺伝的操作をしやすいということは周知である（Ausubel等、前出）。その上、一般に、殆どの酵母は、非病原性である。2つのよく特性決定された酵母の種は、出芽酵母のサッカロミセス・セレビシエと、分裂酵母のシゾサッカロミセス・ポンベである（これらの種に限定はしないが）。その上、免疫応答を変えるためのタンパク質抗原を発現する酵母の投与は、研究されてきている。Duke等（米国特許第5,830,463号；「Duke」）は、哺乳動物への酵母の投与後にタンパク質を発現させるための酵母の利用を記載している。しかしながら、Dukeは、アナフィラキシーを生じうる食物アレルギー及び毒液アレルギーを有する患者を治療するための酵母の利用を教示していない。

10

【0039】

本発明の微生物は、生微生物又は死滅微生物として患者に投与することができる。好ましくは、もし微生物を生微生物として投与するならば、それらは、非病原性であるか又は減弱された病原性のものである。この発明の生微生物を個体に投与する適用のために、好ましくは、これらの微生物は、減弱され且つ／又は適当なカプセル封入用物質にて且つ／又は微生物及び／若しくはアレルギー性化合物に対する個々の免疫応答を減少させるためのワクチンとしての医薬組成物として投与される。一般に、減弱は、感染性の病原性微生物を遺伝的に改変してその微生物の感染能力を減じ又は除去することを含む。好ましくは、この微生物を、その微生物が接種された個体がその微生物の存在により何らの細胞傷害性効果をも受けないように減弱させる。特に好適な減弱化微生物は、感染性の細胞内病原体であり、それらは、その微生物にさらされた個体の抗原提示細胞により貪食される。細胞内病原体である微生物の例には、サルモネラ、ミコバクテリウム、リーシュマニア、レジオネラ、リステリア及び志賀赤痢菌属が含まれる。

20

【0040】

本発明の微生物は、それらの微生物を殺菌してから患者に投与することができる。これらの微生物の殺菌には、発現されたポリペプチドの抗原性を大きく変えない任意の方法を利用することができる。微生物の殺菌方法には、熱、抗生物質、化学薬品例えばヨウ素、漂白剤及びアルコール、放射能（即ち、照射）、UV光、電気及び圧力の利用が含まれるが、これらに限らない。微生物殺菌の好適方法は、再現可能で、少なくとも99%の微生物を殺菌するものである。特に好適なのは、99%より多くの好ましくは100%の細胞が死滅する時間にわたる、セ氏50度を超える熱の利用である。

30

【0041】

誘導システム

他の好適な具体例においては、この発明の微生物によるアレルギーの発現を、生微生物を個体に投与した後に合成が制御された時間に起きるように調節する。好ましくは、タンパク質合成の誘導を、微生物が抗原提示細胞（APC）によって取り込まれて貪食によりエンドソームに入った後に活性化が起きるように調節する。この調節の望ましい結果は、関心あるアレルギーの生成がAPC内で起き、それ故、そのアレルギーが、ヒスタミン放出性マスト細胞及び好塩基球の表面に結合したIgE分子にさらされるのを減じ又は排除することである。これは、アナフィラキシー抗原を生成する微生物の投与中のアナフィラキシーの危険を減じ又は排除する。

40

【0042】

微生物におけるタンパク質合成を制御する任意の方法を、本発明に従って利用することができる。好ましくは、タンパク質合成を制御する方法は、関心ある遺伝子（例えば、単一のペプチド及びタンパク質抗原をコードする遺伝子）に機能的に結合された誘導性プロモーターを利用する。誘導性プロモーターを利用して遺伝子の転写を制御するための多くの系が知られている（Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, New York, 1999）。一般に、誘導性の系は、遺伝子の活性化を利用するか又は遺伝子の抑制解除を利用する。本発明が遺伝子の活性化を利用して転写を誘導するということは好適である

50

。しかしながら、遺伝子の抑制解除を利用する誘導性の系も又、本発明において利用することができる。活性化を利用する系は、これらの系は、抑制解除はもしその抑制解除がきつくと低レベルの転写を生じうるので、不活性化を（従って、基底レベルの合成を）きつく制御することができるので好ましい。

【0043】

転写を誘導する方法には、化学剤の存否による誘導、栄養窮乏誘導性プロモーターを利用する誘導、ホスフェート窮乏誘導性プロモーターを利用する誘導及び温度感受性の誘導性プロモーターを利用する誘導が含まれるが、これらに限らない。遺伝子発現を調節するのに特に好適な系は、テトラサイクリン制御可能な発現系を利用するものである。テトラサイクリン制御可能な系を利用する系は、市販されている（例えば、Clontech, Palo Alto, CAを参照されたい）。

10

【0044】

他の遺伝子発現を調節するための特に好適な系は、やはり市販されているエクジソン誘導性発現系（Invitrogen, Carlsbad CA）を利用するものである。このエクジソン誘導性発現系は、昆虫ホルモンのエクジソンの、エクジソンレセプターに結合することによって遺伝子発現を活性化する能力に基づいている。この発現系は、エクジソンレセプターを含む改変された異種タンパク質、ウイルス性活性化ドメイン（VP16由来）及び、リガンド例えばエクジソン又は類似体（例えば、ムリストロンA、ポナステロンA）の存在下で改変エクジソンレセプターエレメントに結合する哺乳動物細胞から得られたレチノイドXレセプターを利用する。

20

【0045】

本発明で利用するための誘導性の系がヒトを含む哺乳動物細胞に対して非毒性である誘導剤を利用することは好ましいことである。その上、転写誘導剤が細胞膜を透過することは、好ましいことである。特に、APCによる貪食作用の後の微生物内でのタンパク質合成の活性化については、転写誘導剤は、APCの細胞膜及びその微生物の細胞膜を通過して、本発明によるタンパク質アレルゲンをコードしている遺伝子の発現を活性化することができなくてはならない。テトラサイクリン及びエクジソンの両方共が細胞膜を通過できて且つ非毒性なので、テトラサイクリン誘導性系及びエクジソン誘導性系は、本発明での利用に理想的に適している。しかしながら、本発明における誘導性の系の利用は、これらの系に限らない。

30

【0046】

貪食されなかった細菌が、関心あるポリペプチドアレルゲンを発現する遺伝子の誘導前に殺菌されることも又、好適である。細菌を殺菌する好適な方法は、哺乳動物細胞膜を透過できない抗生物質を利用し、それにより、貪食されなかった細菌だけが殺菌されるようにすることである。この具体例による抗生物質の利用は、抗原提示細胞の外側の細菌によるポリペプチドの生成を減らし又は排除する。アレルゲン生成細菌特に個体における潜在的に致死的なアナフィラキシー反応を誘出することのできるであろうポリペプチドを分泌する細菌が免疫系にさらされるのを減らし又は排除することは、重要である。当業者は、容易に、利用できる抗生物質を知る。かかる抗生物質には、ペニシリン、アンピシリン、セファロスポリン、グリセオフルピン、バシトラシン、ポリミキシンb、アンホテリシンb、エリスロマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、バンコマイシン、ゲンタマイシン及びリファマイシンが含まれるが、これらに限らない。

40

【0047】

分泌シグナル

本発明の他の具体例において、発現されたアレルゲン（及び/又は免疫調節分子例えばサイトカイン；下記参照）は、微生物によって分泌される。好ましくは、これらのアレルゲンの分泌は、哺乳動物細胞内で起きて、アレルゲンが宿主のアレルギー性免疫応答にさらされるのを減らし又は排除する。ポリペプチドの分泌は、細胞外培地への分泌並びにグラム陰性細菌及び酵母などの微生物のペリプラスムへの分泌を含む。アレルゲンのペリプラスムへの分泌の利点には、微生物の貪食の前のアレルゲンの漏出の減少が含まれる。この

50

利点は、非誘導性の系において、最も利用可能である。誘導性の系における細胞外培地へのアレルゲンの分泌の利点には、本発明の微生物の貪食後の抗原提示細胞によるプロセッシングに利用可能なアレルゲンの量の最大化が含まれる。

【0048】

選択したポリペプチドを細菌において発現させるために、当分野で公知の様々な細菌性分泌シグナルを利用することができる。例えば、大腸菌におけるSec-依存性プロセスは、周知のものである（総説としては、Driessen等、Curr. Opin. Microbiology 1: 216 - 22を参照されたい）。加えて、大腸菌におけるOmpAシグナルペプチドが、Wong及びSutherland（米国特許第5,223,407号）により記載されている。これらの分泌シグナルペプチドの何れかを含む融合タンパク質は、その細菌によって完全には分泌されないで、グラム陰性細菌の内膜を超えてペリプラスム内へ輸送される。これらの分泌シグナルを本発明において利用して、アレルゲン性ポリペプチド又は免疫調節性ポリペプチドを細菌のペリプラスム中に輸送することができる。これらの遺伝的に加工された細菌の個体への投与及びその後のAPCによる貪食の後に、ペリプラスム中のこれらのアレルゲン性又は免疫調節性ポリペプチドは、APCのエンドソーム内の酵素による外膜の分解後に放出される。好ましくは、細菌は、投与前に、これらのポリペプチドを合成してペリプラスム中へ分泌し、且つ熱殺菌される。しかしながら、減弱化細菌を用いて、発明のアレルゲンをペリプラスム中に分泌させて、個体に投与することができるということは認められる。

10

【0049】

分泌性タンパク質及びポリペプチドの他の好適具体例において、分泌シグナル配列とアレルゲン性又は免疫調節性配列を含む融合タンパク質は、そのタンパク質の合成後に微生物によって完全に細胞外培地中へ分泌される。かかる分泌シグナルには、溶血素及びリステリオリシンにおいて見出されるものが含まれる。特に好適な具体例においては、大腸菌の溶血素複合体を利用して、アレルゲン性又は免疫調節性ポリペプチドを微生物（例えば、大腸菌、サルモネラ菌属、志賀赤痢菌属、ビブリオ属、イエルシニア属、シトロバクター属、セラチア属、シュドモナス属）の内膜及び外膜を超えて細胞外の培地中へ輸送する（Spreng等、Mol. Microbiol. 31: 1589 - 1601, 1999及びその中の引用文献、これらのすべてを参考として本明細書中に援用する）。HlyAのタンパク質及びポリペプチドへの融合は、溶血素分泌系を利用してこれらの融合タンパク質の分泌を生じることが示されている（Blight及びHolland, Trends Biotechnol. 1994 Nov; 12(11): 450 - 5; Gentschev等、Behring Inst Mitt. 1994 Dec; (95): 57 - 66）。

20

30

【0050】

溶血素タンパク質（HlyA）は、約50～60アミノ酸長のC末端輸送シグナル（HlyAs）を含む（Hess等、Mol Gen Genet. 1990 Nov; 224(2): 201 - 8; Jarchau等、Mol Gen Gene. 1994 Oct 17; 245(1): 53 - 60）。HlyAタンパク質は、溶血素分泌系によって内外の細胞膜を超えて分泌される。この複合体は、3つの膜タンパク質を含んでいる。これらのタンパク質の内の2つのHlyB及びHlyDは、内膜に位置し、第三のTolCは、外膜に位置している。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、4つの遺伝子hlyC、hlyA、hlyB及びhlyDよりなる溶血素オペロンの部分である（Wagner等、J Bacteriol. 1983 Apr; 154(1): 200 - 10; Gentschev, Gene. 1996 Nov 7; 179(1): 1333 - 40）。

40

【0051】

Hly分泌系の利用の好適具体例においては、DNAプラスミド（ベクター）を用いて、HlyAsシグナルペプチドとアレルゲン性又は免疫調節性ポリペプチドを含む融合タンパク質を発現させる。この輸送複合体をコードする遺伝子（hlyB及びhlyD）は、同じベクターによりコードされる。複数のベクターを用いて、これらの遺伝子をコードし

50

て発現させることができるということ、又はこれらの遺伝子をコードする配列を発現用の宿主ゲノムに挿入することができるということは認められる。好ましくは、単一ベクターが、*hly* 特異的プロモーター及びエンハンサー型レギュレーター *hlyR* を含む完全な溶血素オペロン；融合タンパク質の輸送に必要な最小ポリペプチド配列のみが存在する *HlyA* 遺伝子；及び関心ある抗原を含む。 *TolC* タンパク質は、一般に、宿主の大腸菌の系により生成される。しかしながら、 *tolCDNA* が宿主生物によってコードされていない系においては、 *tolC* は、ベクターによってコードすることができる。

【0052】

特に好適な具体例においては、WO98/50067（「Donner」）に記載された分泌用プラスミド *pMohly1* を用いて、分泌シグナル配列及び個体におけるアナフィラキシーの誘導に係するポリペプチドを含む融合タンパク質を発現させることができる。分泌用ベクター *pMohly1* は、*hly* 特異的プロモーター及びエンハンサー型レギュレーター *hlyR* を含む完全な溶血素オペロンを含む。 *HlyA* 遺伝子の大部分は、 *HlyA* がアミノ末端の34アミノ酸とカルボキシル末端の61アミノ酸（*HlyAs*）のみをコードするように欠失している。 *HlyA* のアミノ末端残基とカルボキシル末端残基との間のユニークな *Nsi* 制限酵素部位は、異種遺伝子又は遺伝子断片の *HlyAs* のリーディングフレーム内への挿入を容易にする。10～1000アミノ酸の大きさの抗原についての遺伝情報を、この分泌用ベクター *pMohly1* 内に挿入することができ、これは、これらの抗原の減弱化サルモネラ属及び他のグラム陰性の減弱化した接種用の株（例えば、大腸菌、コレラ菌、エンテロコリチカ菌）における分泌を容易にする。他の分泌系と対照して、単一プラスミドを用いる融合タンパク質の分泌が、Donnerにより記載されている。溶血素分泌系の、慣用の輸送系と比較しての利点は、Donnerにおいて教示された方法によって合成されて分泌される融合タンパク質の大きい寸法である。抗原提示のための慣用の分泌系は、比較的短いペプチドを細菌細胞の外側部分に分泌することができるだけである（Cardenas及びClements, Clin Microbiol Rev. 1992 Jul; 5(3): 328-42）。

【0053】

抗原及びアレルゲン

一般に、任意のアレルゲンを、本発明に従って、微生物により生成することができる。好適なアレルゲンは、ある種の実物、毒液、薬物又はゴム中に見出され且つ個体においてアレルギー応答特にアナフィラキシー性アレルギー応答を誘出することができる。特に好適なアレルゲンは、タンパク質又はポリペプチドアレルゲンである。

【0054】

好適具体例において、本発明の微生物は、アレルギーを（ひょっとしたらアナフィラキシーを）誘出し、食物、毒液、薬物及びゴムベースの製品中に見出されるアレルゲン性タンパク質を生成する。アナフィラキシーを誘導する特に好適なアレルゲン性タンパク質例えば食物（南京豆、ミルク、卵、小麦）、昆虫毒液（即ち、蜜蜂、爬虫類）、薬物及びゴムにおいて見出される幾つかのタンパク質アレルゲン。食物中に見出されるタンパク質アレルゲンの非制限的例には、堅果（例えば、南京豆クルミ、アーモンド、ペカン、カシュー、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ、松果、ブラジルナッツ）、海産食物（例えば、エビ、カニ、ロブスター、二枚貝）、果物（例えば、スモモ、モモ、ズバイモモ；Ann Allergy Asthma Immunol 7(6): 504-8 (1996)；サクランボ、Allergy 51(10): 756-7 (1996)）、種子（胡麻、ケシ、芥子）及び大豆並びに酪農品（例えば、卵、ミルク）が含まれる。

【0055】

堅果中に見出される幾つかのタンパク質アレルゲンは、豆果アレルギーと関係し、豆果タンパク質の代わりに用いることができる（例えば、南京豆、大豆、レンズマメ；Ann Allergy Asthma Immunol 77(6): 480-2 (1996)）。やはり、花粉関連食物アレルギーにおいて見出されるタンパク質抗原も又、利用することができる（例えば、リンゴアレルギーに係するカバノキの花粉）。他の食物中に見出さ

10

20

30

40

50

れるタンパク質アレルゲンは、若いニンニク (Allergy 54 (6) : 626 - 9 (1999)) において見出されるもの及び室内塵ダニに対してアレルギー性の子供に対するもの、カタツムリにおいて見出されるアレルゲン (Arch Pediatr 4 (8) : 767 - 9 (1997)) を包含する。小麦中のタンパク質アレルゲンは、運動誘発性アレルギーを引き起こすことが知られている (J Allergy Clin Immunol 1999 May; 103 (5 Pt 1) : 912 - 7)。

【0056】

毒液を注入する生物に (例えば、昆虫の毒針で) 刺されることは、その毒液に対してアレルギーの個体においてアナフィラキシーを引き起こすことは公知である。一般に、昆虫の毒液には、膜翅目例えば蜜蜂、スズメバチ、ジガバチ、キイロスズメバチ、アリバチ及びフシアリの毒液が含まれる。特に、例えば、アピス属の蜜蜂の毒液は、毒針で刺されてアレルギーの者にアナフィラキシーを引き起こしうる (Weber 等、Allergy 42 : 464 - 470)。蜜蜂の毒液は、広く研究されて特性決定されている多くの成分を含んでいる (参考として、Banks 及び Shipolini, Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom, T. Piek 編、Academic Press, London, 1986 Venoms of the Hymenoptera の第7章を参照されたい)。蜜蜂毒液の2つの主要成分は、ホスホリパーゼA2及びメリチンであり、これらは、蜜蜂毒液に対するアレルギーを治療し、予防するために、本発明において利用するのに好適なタンパク質アレルゲンである。

【0057】

本発明のある種の利用において、単一化合物 (例えば、単一タンパク質) が殆どの認められるアレルギーの原因である系において研究することは望ましいことであろう。他の場合には、この発明を、一層複雑なアレルゲンに適用することができる。それ故、一つより多くのアレルゲンのコレクションを、複数の抗原に対する免疫応答が同時に調節されうるように利用することができる。

【0058】

付表Aは、ある種の公知のタンパク質アレルゲンの代表的な一覧を与えるものである。示したように、これらのタンパク質の多くの又はすべてのアミノ酸配列は、それらの同源遺伝子の配列の知識により若しくはタンパク質配列の直接的な知識によって、又は両方によって知られている。特に興味深いのは、アナフィラキシー性抗原である。

【0059】

アレルゲン性抗原の他の具体例においては、微生物を遺伝子工学的に加工して、アナフィラキシーショックを受けやすい個体にさらしたときにアナフィラキシーを誘出する改変されたアレルゲン性ポリペプチドを合成させ且つ分泌させる。好ましくは、これらのアレルゲンを、アナフィラキシーを誘出する能力を減じ又は排除するように改変する。前に論じたように、アレルゲンは、アレルギー応答を誘出し、それらは、時には、マスト細胞及び好塩基球の表面に結合したIgE抗体を架橋することによりアナフィラキシーショックを誘発するだけ十分に重いものである。このIgE架橋は、アレルギー及びアナフィラキシーショックと関連する症状を引き起こす化合物例えばヒスタミンを放出させる。本発明により、微生物を利用して、抗原性又は免疫調節活性を保持しつつIgE結合部位を減じ又は排除するように改変された抗原 (U.S.S.N. 09/141,220号、参考として本明細書中に援用する) を合成させて分泌させる。これは、これらの加工された微生物を含むワクチンで処置された個体におけるアレルギー応答又はアナフィラキシー応答の危険を減じる。

【0060】

任意の特定の組成物又は適用に用いるべき抗原の量は、その特定の抗原及びそれを用いる適用の性質に依存するが、これは、当業者によって容易に評価されるであろう。実施例1~4に記載した実験は、多量のポリペプチドがTh1応答の誘導に有用であるということを示唆する。抗原の量は、発現系、誘導性発現系、分泌及び排出のレベル、送達前の殺菌方法を含む様々な因子 (これらに限らない) によって制御することができる。当業者は、

10

20

30

40

50

細菌により生成して、個体に送達すべき抗原の望ましいレベルを決定することができる。

【0061】

本発明の方法によって、同時に複数の抗原性分子を細菌から送達することができるということは認められる。制限はしないが、一つの抗原性タンパク質について種々の抗原決定基が送達されうる。種々の抗原性タンパク質からも種々の抗原決定基が送達されうる。更に、複数の抗原性ポリペプチド及びタンパク質が、本発明によって送達されうる。単一又は複数の抗原性ポリペプチド及び単一又は複数のサイトカインが、本発明により、細菌によって個体に送達されうるということも又、認識される。例えば、制限はしないが、本発明のアレルゲン性抗原及び免疫調節性分子例えばインターロイキンを、本発明による分泌され又はされない方法を用いて、細菌によって送達することができる。

10

【0062】

アジュバント及び免疫調節剤

本発明の組成物及び方法は、個体の免疫応答を調節するためのアジュバント及び免疫調節性ポリペプチド又は免疫刺激因子の利用を含む。免疫学的アジュバントは、ワクチンに対する特異的な免疫応答を増強する薬剤である。強力なアジュバントを有するワクチンの配合は、抗原からなるワクチンの性能を改善するために望ましい。アジュバントは、種々の作用機構を有することができ、投与経路及び特定のワクチンに望まれる免疫応答の種類（抗体、細胞媒介又は粘膜性免疫）に基づいて利用のために選択すべきである。

【0063】

一般に、免疫調節性ポリペプチドには、小さいタンパク質又は生物学的因子であるサイトカイン（5～20 kDの範囲）が含まれ、これらは、細胞により放出されて、細胞-細胞相互作用、コミュニケーション及び他の細胞の挙動に特異的な効果を有する。前に記載の通り、本発明によるサイトカインは、T細胞に対して分泌されるタンパク質であり、Th1又はTh2応答を誘導する。好ましくは、投与すべきサイトカインは、アナフィラキシーと関係する抗原に対するTh2応答の生成を減少させるように選択する。Th2応答を減らす一つの好適な方法は、別の応答を誘導することによるものである。抗原の細胞への送達中に発現されるサイトカインは、T細胞においてTh1応答を誘導し（即ち、「Th1刺激性サイトカイン」）IL-12、IL-2、IL-18、IL-1又はこれらの断片、IFN及び/又はINFを含む。

20

【0064】

他の免疫調節性の化合物には、免疫学的誘導剤が含まれる。これらの誘導剤は、T細胞によるTh1刺激性サイトカインの発現を促進し、CD40、CD40リガンド、CpGモチーフ含有オリゴヌクレオチド、TNF及び微生物抽出物（例えば、黄色ブドウ球菌、熱殺菌したリステリア及び改変したコレラ毒素など）などの因子が含まれる。

30

【0065】

当業者は、特定の抗原組成物と共に用いるのに好適な種類のアジュバントを容易に認める。一般に、免疫学的アジュバントには、ゲル型アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム/リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム）、微生物アジュバント（例えば、CpGモチーフなどのDNA；モノホスホリルリピッドAなどの内毒素；コレラトキシン、大腸菌の熱不安定性毒素及び百日咳毒素などの外毒素；及びムラミルジペプチド）、油エマルジョン及び乳化剤ベースのアジュバント（例えば、フロイントの不完全アジュバント、MF59及びSAF）、特殊なアジュバント（例えば、リポソーム、生物分解性ミクロスフェア及びサポニン）及び合成アジュバント（例えば、非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルペプチド類似体、ポリホスファジン及び合成ポリヌクレオチド）が含まれる。

40

【0066】

好ましくは、Th2応答を刺激することが知られたアジュバントは、避ける。特に好適なアジュバントには、例えば、リステリア菌又は他の微生物（例えば、カルメット・ゲランウシ型結核菌[BCG]、コリネバクテリウム種、ミコバクテリウム種、ロドコッカス種、ユーバクテリア種、ボルタデラ種及びノカルジア種）などの微生物の任意の他の調製物、及びメチル化してないCpGモチーフを含む核酸の調製物が含まれる（例えば、米国特

50

許第5, 830, 877号; 及び発行されたPCT出願WO96/02555、WO98/18810、WO98/16247及びWO98/40100(これらの各々を参考として本明細書中に援用する)を参照されたい)。他のTh1型応答を誘導するがTh2型応答は誘導しないと報告された好適なアジュバントには、例えば、アピリジン(N, N-ジオクタデシル-N', N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)プロパンジアミン)及びCRL1005が含まれる。特に好適なのは、IL-12生成を誘導するものであり、固定した黄色ブドウ球菌、連鎖球菌標品、ヒト型結核菌、リポ多糖(LPS)、グラム陰性細菌のリポ多糖由来のモノホスホリルリピッドA(MPLA)(Richards等、Infect Immun 1998 Jun; 66(6): 2859-65)、リステリア・モノサイトゲネス、トキソプラズマ、メジャーリーシュマニアなどの微生物抽出物が含まれる。幾らかのポリマーも又、アジュバントである。例えば、ポリホスファジンが、Andriavnovの米国特許第5, 500, 161号に記載されている。これらは、微生物をカプセル封入するだけでなく、抗原に対する免疫応答を増強するためにも利用することができる。

10

20

30

40

50

【0067】

もしアジュバントが本発明によって微生物により合成されたものでないならば、サイトカインであるアジュバントは、不純な調製物として供給されうるが(例えば、内因性の又は外因性のサイトカイン遺伝子を発現している細胞の分離株)、好ましくは純粋な形態で供給される。精製された調製物は、好ましくは、少なくとも約90%の純度であり、一層好ましくは少なくとも約95%の純度であり、最も好ましくは少なくとも約99%の純度である。或は、サイトカイン又は免疫学的誘導剤をコードする遺伝子を、遺伝子発現が、治療される個体又は他の発現系(例えば、イン・ビトロ転写/翻訳系又は宿主細胞)において、サイトカイン又は免疫学的誘導剤の生成を生じるように供給することができる(該発現系からは、発現されたサイトカイン又は免疫学的誘導剤を、該個体に投与するために得ることができる)。本発明によるアレルゲン性及び/又は免疫調節性タンパク質の合成及び送達に利用される微生物がアジュバントとして作用しうること及び好適な微生物が免疫刺激性アジュバントであるということは認められる。

【0068】

この発明のサイトカイン及び/又はアレルゲンを発現する微生物の投与を、適宜、他の所望の免疫系調節因子例えばアジュバント又は他の免疫調節性化合物の投与と組み合わせることができるということは、当業者により認められよう。

【0069】

投与方法

配合物は、例えば腸内投与、非経口投与、局所投与(鼻、肺又は他の粘膜経路を含む)、口内投与又は局所的投与を含む任意の利用可能な経路によって患者に送達することができる。これらの組成物は、好ましくは、細胞性免疫及びTh1関連IgGの生成を誘出するのに十分な量であって同時にIgE媒介の応答を最小にする量で投与する。やはり好ましいのは、活性T細胞応答好ましくはTh1型応答に有効な量で投与する組成物である。細菌を含む本発明の組成物について、投与は、好ましくは、非経口的に送達する。

【0070】

医薬組成物

本発明による利用のための医薬組成物は、製薬上許容しうる賦形剤又はキャリアーを含むことができる。ここで用いる場合、用語「製薬上許容しうるキャリアー」は、非毒性の、不活性の固体、半固体若しくは液体充填剤、希釈剤、カプセル封入材又は任意の種類の補助的配合物を意味する。製薬上許容しうるキャリアーとして役立つ物質の幾つかの例は、糖例えばラクトース、グルコース及びシュクロース; 澱粉例えばトウモロコシ澱粉及びジャガイモ澱粉; セルロース及びその誘導体例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース及びセルロースアセテート; 粉末トラガント; ゼラチン; タルク; 賦形剤例えばココアバター及び坐薬ワックス; 油例えば南京豆油、綿実油; 紅花油; 胡麻油; オリーブ油; トウモロコシ油及び大豆油; グリコール; 例えばプロピレングリコ

ール；エステル例えばエチルオレート及びエチルラウレート；寒天；緩衝剤例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張塩溶液；リンゲル溶液；エチルアルコール及びリン酸緩衝溶液であり、並びに他の非毒性の適合性潤滑剤例えばラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウム並びに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、調味剤及び芳香剤、防腐剤及び抗酸化剤も又、配合者の判断によって、組成物中に存在してよい。この発明の医薬組成物は、ヒト及びノ又は他の動物に、経口投与により、直腸投与により、非経口投与により、大槽投与により、腔内投与により、腹腔内投与により、局所投与により（粉末、軟膏又は滴剤などにより）、頬内投与により、又は経口若しくは鼻スプレーによって投与することができる。

【0071】

経口投与のための液体投薬形態は、製薬上許容しうる乳液、ミクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルを含む。活性な化合物に加えて、これらの液体投薬形態は、当分野で普通に使用される不活性な希釈剤例えば水又は他の溶液、可溶化剤及び乳化剤例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、落花生、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油及び胡麻油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルピタンの脂肪酸エステル並びにこれらの混合物を含むことができる。不活性希釈剤以外に、経口用組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、調味剤及び芳香剤などの薬剤をも含むことができる。

10

20

【0072】

注射用調製物例えば無菌の注射用水性又は油性の懸濁液を、適当な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用いて、公知の技術によって配合することができる。無菌の注射用調製物は、非毒性の、非経口投与用に許容しうる希釈剤又は溶剤例えば1,3-ブタンジオール中の溶液としての、無菌の注射用溶液、懸濁液又は乳液であってもよい。用いることのできる許容しうるビヒクル及び溶剤には、リンゲル溶液、U.S.P.及び塩化ナトリウム等張溶液がある。加えて、無菌の、固定油は、慣用的に、溶剤又は懸濁用媒質として用いられている。この目的のためには、合成のモノ又はジグリセリドを含む任意の低刺激性の固定油を用いることができる。加えて、脂肪酸例えばオレイン酸が、注射用剤の調製に用いられる。

30

【0073】

薬剤の効果を長引かせるために、皮下注射又は筋肉内注射からの薬物の吸収を遅くすることは、しばしば望ましい。これは、水溶性の乏しい結晶性又は非晶質の物質の液体懸濁液を利用することによって達成することができる。そうすれば、薬剤の吸収速度は、その溶解速度に依存し、該速度は、更に、結晶サイズ及び結晶型に依存しうる。或は、非経口投与された薬物形態の遅延された吸収は、薬物を油性ビヒクルに溶解させ又は懸濁させることにより達成される。注射用デポー剤形態は、生物分解性ポリマー例えばポリラクチド-ポリグリコリド中に薬物のマイクロカプセル化材料を形成することにより生成される。薬剤のポリマーに対する比及び用いた特定のポリマーの性質に依存して、薬剤の放出速度を制御することができる。他の生物分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が含まれる。デポー剤用の注射可能な配合物は又、薬物を、身体組織に適合性のリポソーム又はミクロエマルジョン中に閉じ込めることによって製造することができる。

40

【0074】

直腸又は腔内投与用の組成物は、好ましくは、この発明の化合物を適当な非刺激性賦形剤又はキャリアー例えばココアバター、ポリエチレングリコール又は坐薬ワックス（周囲温度では固体であるが体温では液体であり、それ故、直腸又は腔内腔で融けて活性化合物を放出する）と混合することによって製造することのできる坐薬である。

【0075】

経口投与用の固体投薬形態には、カプセル、錠剤、丸薬、粉末及び顆粒が含まれる。かか

50

る固体投薬形態においては、活性化合物を、少なくとも一種の不活性な、製薬上許容しうる賦形剤又はキャリアー例えばクエン酸ナトリウム又はリン酸二カルシウム及び/又はa) 充填剤若しくは増量剤例えば澱粉、ラクトース、シュクロース、グルコース、マンニトール及び珪酸、b) バインダー例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、シュクロース及びアラビアゴム、c) 湿潤剤例えばグリセロール、d) 崩壊剤例えば寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ若しくはクズ澱粉、アルギン酸、ある種の珪酸塩及び炭酸ナトリウム、e) 溶解遅延剤例えばパラフィン、f) 吸収促進剤例えば第四アンモニウム化合物、g) 湿潤剤例えばセチルアルコール及びグリセロールモノステアレート、h) 吸収剤例えばカオリン及びベントナイト粘土、並びにi) 潤滑剤例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム並びにこれらの混合物と混合する。カプセル、錠剤及び丸薬の場合には、この投薬形態は、緩衝剤をも含むことができる。

10

【0076】

類似の型の固体組成物は又、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を用いて、ソフト及びハード充填ゼラチンカプセルにおいて充填剤としても利用することができる。

【0077】

錠剤、糖衣錠、丸薬及び顆粒の固体投薬形態は、製薬分野で周知のコーティング及びシェル例えば腸溶性コーティング及び他のコーティングを用いて製造することができる。それらは、適宜、乳白剤を含むことができ、適宜遅延した様式で腸管のある部分でのみ又は該部分で優先的に活性成分を放出する組成物であってもよい。利用できる包埋用組成物の例には、高分子物質及びワックスが含まれる。

20

【0078】

類似の型の固体組成物は又、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を用いて、ソフト及びハード充填ゼラチンカプセルにおいて充填剤としても利用することができる。

【0079】

これらの化合物は又、上記の一種以上の賦形剤を用いてマイクロカプセル封入した形態であってもよい。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬及び顆粒の固体投薬形態は、製薬分野で周知のコーティング及びシェル例えば腸溶性コーティング、放出制御用コーティング及び他のコーティングを用いて製造することができる。かかる固体投薬形態において、活性化合物は、少なくとも一種の不活性な希釈剤例えばシュクロース、ラクトース又は澱粉と混合することができる。かかる投薬形態は又、通常の実施であるが、不活性希釈剤以外の追加の物質例えば錠剤化用潤滑剤及び他の錠剤化助剤例えばステアリン酸マグネシウム及び微晶質セルロースをも含むことができる。カプセル、錠剤及び丸薬の場合には、これらの投薬形態は、緩衝剤をも含むことができる。それらは、適宜、乳白剤を含むことができ、適宜遅延した様式で腸管のある部分でのみ又は該部分で優先的に活性成分を放出する組成物であってもよい。利用できる包埋用組成物の例には、高分子物質及びワックスが含まれる。

30

【0080】

発明の医薬組成物の局所投与又は経皮的投与のための投薬形態には、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入薬又はパッチが含まれる。活性成分は、無菌条件下で、製薬上許容しうるキャリアー及び任意の必要な防腐剤又は緩衝剤と混合される。眼科用配合物、点耳剤、目薬も又、この発明の範囲内にあるとして企図される。

40

【0081】

軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、この発明の活性成分に加えて、賦形剤例えば動物及び植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、珪酸、タルク及び酸化亜鉛又はこれらの混合物を含むことができる。

50

【0082】

粉末及びスプレーは、この発明の化合物に加えて、賦形剤例えばラクトース、タルク、水酸化アルミニウム、珪酸カルシウム及びポリアミドポリマー又はこれらの物質の混合物を含むことができる。スプレーは、更に、通例の噴射剤例えばクロロフルオロハイドロカーボンを含むことができる。

【0083】

経皮用パッチは、身体への化合物の制御された送達を与える追加的利点を有する。かかる投薬形態は、化合物を適当な媒質に溶解し又は分配することによって生成することができる。吸収促進剤を利用して、化合物の皮膚を超える流れを増大させることもできる。この速度は、速度制御用膜を用意するか又は化合物を高分子マトリクス若しくはゲル中に分散させることによって制御することができる。

【0084】

カプセル封入

好適具体例において、生きた微生物を含む発明の組成物を、カプセル封入装置と共に与える（例えば、U.S.S.N. 60/169,330、表題「Controlled Delivery of Antigens」（1999年12月6日出願）（参考として本明細書中に援用する）を参照されたい）。好適なカプセル封入装置は、生体適合性であり、カプセル封入装置が意図する目的地点（例えば、消化管の粘膜内層、抗原提示細胞（APC）によるエンドサイトーシス）に到達するまで微生物が放出されないように身体内で安定である。例えば、カプセル封入の好適なシステムは生理的 pH で安定であり且つ消化管内又は APC のエンドソーム内で見出されるのに匹敵する酸性の pH レベルで分解する。特に好適なカプセル封入用組成物には、リポソーム、ポリラクチド-コグリコリド（PLGA）、キトサン、合成の生物分解性ポリマー、環境応答性ヒドロゲル及びゼラチン PLGA ナノ粒子を含むものが含まれるが、これらに限らない。発明の組成物は、少なくとも一種のアジュバント、ターゲティング実体、希釈剤、賦形剤、油などと共にカプセル封入することができる。別法として又は加えて、このカプセル封入装置自体をターゲティング実体及び/又はアジュバントと結合することができる。

【0085】

生きた細胞をカプセル封入する方法は公知であり、本発明によって抗原分泌性微生物を個体に送達するために利用することもできる。下記の参考文献は、生きた細胞のカプセル封入の例として与えるものである。しかしながら、生きた細胞をカプセル封入する如何なる方法でも、本発明において利用することができる。米国特許第 5,084,350 号；第 4,680,174 号；及び第 4,352,883 号（これらのすべてを参考として本明細書中に援用する）は、原核又は真核細胞又は細胞培養物のマイクロカプセル内へのカプセル封入を記載している。簡単にいえば、米国特許第 5,084,350 号；第 4,680,174 号；及び第 4,352,883 号は、カプセル封入すべき組織試料、細胞又は細胞培養物を先ず周知の技術に従って細かく分割された形態に調製し、そして維持管理及び含まれる特定の細胞の進行中の代謝プロセスを支持するのに適した水性媒質中に懸濁することを記載している。この目的に適した媒質は、一般に、市販されている。その後、生理的に細胞と適合性で且つ水不溶性となって形状維持する凝集性の球状マス（又は他の形状）を形成することのできる水溶性物質をこの媒質に加える。次いで、この溶液を、細胞をそれらの維持又は増殖のための媒質と共に含む液滴に形成して、直ちに、水溶性としそしてゲル化させて形状維持する、典型的には球状のマスを形成させる。

【0086】

培養培地のゲル化を誘導するのに用いられる物質は、周囲の温度、pH、イオン環境又は濃度の変化によって形状を維持するマスに変換されうる任意の非毒性の水溶性物質であってよい。好ましくは、この物質は、イオン化して反対の電荷の種を形成する複数の基を含むポリマーとの塩形成によって反応しうる複数の容易にイオン化される基例えばカルボキシル基又はアミノ基を含むものでもある。この型の物質の利用は、選択した多孔度の範囲の膜を不安定な細胞にダメージを与えずに付着させることを可能にする。現在ゲル化マス

の形成に好適な物質は、水溶性の天然又は合成の多糖類である。多くのかかる市販の物質は、典型的には、植物物質から抽出され、しばしば、様々な食品への添加物として使用される。アルギン酸ナトリウムは、現在好適な水溶性多糖類である。他の利用可能なアルギン酸塩には、グアーガムの酸性画分、アラビアゴム、カラギーナン、ペクチン、トラガカントゴム又はキサンタンゴムが含まれる。これらの物質は、多価イオンが酸性水素又はアルカリ金属イオン（通常、カルボキシル基と結合している）と交換されたときにゲル化する。

【0087】

利用

本発明の組成物を用いて、患者におけるアレルギー反応を治療し又は予防することができる。患者は、アレルギーの治療の必要のある動物及びヒトの患者である。好ましくは、この動物は、家畜である（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシなど）。動物は又、実験室用の動物例えばマウス、ラット、ハムスター、サル及びウサギをも包含する。アレルギーを患っているか又はアレルギーを起こし易い任意の個体を治療することができる。特定の問題の抗原に対するアレルギー反応に悩まされることなく個体がアレルギーを起こし易いと判断することができるということは、高く評価されよう。例えば、もし個体が、関連抗原（例えば、同じ起源に由来するもの又は共有するアレルギーが共通であるもの）に対するアレルギー反応を受けるならば、その個体は、その関連抗原に対するアレルギーを受け易いと考えられる。同様に、個体の家族のメンバーが、特定の抗原に対してアレルギーであるならば、その個体は、その抗原に対するアレルギーを受け易いと考えられる。一層好ましくは、食物アレルギー、毒液アレルギー又はゴムアレルギーにさらされた際にアナフィラキシーショックを受け易い任意の個体を、本発明によって治療することができる。

10

20

【0088】

本発明の組成物は、如何なる経路による送達用にも配合することができる。好ましくは、これらの組成物は、注射用、経口摂取用、又は吸入用に配合する。

【0089】

これらのここに記載の方法及び組成物の改変及び変法は、後記の請求の範囲の範囲内に入るものである。

【0090】

他の具体例

当業者は、容易に、前記のものは、単にこの発明のある特定の好適具体例を示したものであるということを認めるであろう。上記の手順及び組成物の様々な変化及び改変が、後記の請求の範囲に示した本発明の精神又は範囲から離れることなく為されうる。

30

【0091】

実施例

材料及び方法

微生物中でタンパク質を発現させるために用いられる一般的方法については、Ausubel等（前出）及びSambrook等（前出）（これら両者を参考として本明細書中に援用する）を参照されたい。加えて、本発明において利用するための発現ベクターは、広く商業的供給者（例えば、Clontech, Palo Alto, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega Corporation, Madison, WI; New England Biolabs, Beverly, MA）から入手可能である。

40

【0092】

下記の実験は、本発明の教示による、アレルギーの、免疫療法における送達用ビヒクル及び/又はアジュバントとして利用するための細菌内へのカプセル封入を記載するものである。組換え南京豆アレルギータンパク質（Arah1、Arah2及びArah2；Burk等、J Allergy Clin Immunol. 88（2）：172-9, 1991；Burks等、J Allergy Clin Immunol. 90（6 Pt

50

1) : 962 - 9 , 1992 ; R a b j o h n 等、 J C l i n I n v e s t . 103 (4) : 535 - 42 , 1999 ; 参考として本明細書中に援用する) を、大腸菌 B L 2 1 細胞内で、該細菌細胞を該タンパク質をコードする c D N A でトランスフォームすることにより生成した(付表 B ; p E T 24、N o v a g e n , M a d i s s o n , W I 中にクローン化した配列参照)。これらのトランスフォームされた細胞を、次いで、C 3 H / H E J マウスに注射して、このアレルゲンを発現する大腸菌が免疫応答を誘出するかどうかを測定した。

【0093】

実施例 1 . アレルゲンを生成する大腸菌の殺菌方法

アレルゲンを生成する大腸菌を殺菌する幾つかの方法を試験した。好ましくは、細菌を殺菌する方法は、それらの細菌により生成される組換えアレルゲンを変性したり分解したりしない。非制限的な例として、大腸菌を、熱(37 ~ 95 の温度)により殺菌し、エタノール(0.1 ~ 10%)を用いて殺菌しそしてヨウ素を含む溶液(0.1 ~ 10%)を用いて殺菌した。生存菌を、100 μ l の細胞を適当な寒天プレート上にプレートし、次いで、生成したコロニーをカウントすることにより測定した。最も再現性の高い方法は、熱殺菌であった。それ故、アレルゲンを生成する大腸菌を殺菌する好適な方法は、それらの細胞を60 で、20分間インキュベートすることであり、これで100%の死滅を生じる(即ち、コロニーが全く形成されない; 図#参照)。

【0094】

実施例 2 . 細菌の増殖

マウスに接種するためのアレルゲンを生成する大腸菌細胞の調製のために下記のプロトコルを開発した。

【0095】

第一日

5ミリリットル(ml)のカナマイシン含有(用いる各細胞株ごとに30マイクログラム/ml)LB(Luria-Bertaniブロス)の液体培養物を、50mlの無菌チューブ又はフラスコ内に調製した。所望の発現ベクターを含む所望の細菌細胞株の解凍したストックからの培養物を、約10マイクロリットルを用いて接種した。接種した培養物を、振盪しながら37 で一晩インキュベートした。

【0096】

第二日

次の朝に、カナマイシン(30マイクログラム/ml)を含む100mlの液体LB(500ml三角フラスコ中)に、前日からの5mlの生育した培養物からの1mlのアリコートを用いて接種した。(培養物の残りの4mlは、凍結させた。適宜、残りの4ミリリットルの培養物を、その後の培養物接種のために、4 で数週間保存することができる)

これらの接種した培養物を、振盪しながら37 で、600nmで測定した溶液の光学密度(OD_{660})が約0.6 ~ 0.9に達するまでインキュベートした。

【0097】

第三日

組換えタンパク質の生成を誘導するために、前日からの培養物を、 OD_{660} が約0.6 ~ 0.9に達したときにイソプロピル-ベータ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を1Mストック液から終濃度1mMまで(培養物100ml当たり100マイクロリットルの1M IPTG)加えることにより誘導した。これらの誘導した培養物を、一晩培養した。

【0098】

第四日

1.4mlの前日からの培養物から、それぞれにつき、アリコートを1.5mlのミクロ遠沈管に分取して、水浴中で60 で20分間殺菌した。これらの管を16,000 \times gで5分間室温で遠心分離して、上清を捨てた。ペレットを1 \times リン酸緩衝塩溶液(PBS)で洗い、16,000 \times gで5分間室温で遠心分離した。再び、上清を捨てて、ペレツ

10

20

30

40

50

トを250マイクロリットルの1×PBS中に再懸濁させた。同起源の試料からの再懸濁ペレットを合わせた。各試料につきOD₆₆₀を測定し、1×PBSを用いて所望のOD₆₆₀まで希釈した。

【0099】

実施例3．アレルゲンの生成及び放出

熱殺菌した細菌によるアレルゲンの放出

細胞が熱殺菌後に維持されているかどうかを測定するために、我々は、培地に放出されたアレルゲンの量を測定した。対照としてのフィルターに既知濃度で適用した精製組換えアレルゲン及び南京豆感受性の患者由来の血清IGEを利用するドットプロットアッセイを開発した。このアッセイは、熱殺菌した細菌のペレット化後の上清100マイクロリットル中に存在するアレルゲンを検出してその量を定量した。放出されるアレルゲンのレベルは、発現ベクター及び試験したタンパク質に依って変化した。一般に、Ara h 2は、Ara h 1及びAra h 3より一層放出された(Ara h 2 > Ara h 1 > Ara h 3)。

10

【0100】

アレルゲンの生成

大腸菌におけるアレルゲンの量を測定するために、我々は、我々の精製組換えアレルゲンのすべてに存在する6ヒスチジンタグ(HISタグ)を利用するイムノプロットアッセイ及びHISタグ抗体を開発して標準曲線を作った(これは、生成されたアレルゲンの量の評価に利用することができる)。細胞当たり生成されたアレルゲンの量は、何れのクローンを試験したかに依って変化した。一般に、Ara h 2及びAra h 1より一層Ara h 3が生成された(Ara h 3 > Ara h 2 > Ara h 1)。

20

【0101】

大腸菌の2.0のODの接種物100μlにおいて送達されたアレルゲンの量についての我々の最大の評価は、Ara h 1の約1μlからAra h 3の約20μlまで変化する。

【0102】

図2は、Ara h 2について生成した標準曲線の例である。HISタグ付きAra h 2アレルゲンの光学密度(OD)を、次いで、イムノプロットから決定する(種々の濃度の大腸菌抽出物をSDS-PAGEゲル上で電気泳動した)。次いで、アレルゲンのODを利用して、その抽出物により生成されたタンパク質の量を評価する。

30

【0103】

実施例4．マウスの免疫応答

以下のプロトコルを用いて、アレルゲンを生成する細菌を注射したマウスの免疫応答を測定した。最初の注射の前に、各マウスの尾の静脈から血液を集めた。各アレルゲン及び大腸菌タンパク質についての抗体ELISAのために十分な血液を集めた。0日目に、各マウスに、殺菌した大腸菌試料100マイクロリットルを左後部脇腹に皮下注射した。これらのマウスに、14日目に2回目に、0日目と同じ手順を用いて注射をした。21日目に、第2の血液試料を、各マウスから集めた。0日目と21日目の血液試料を、Ara h 1、Ara h 2又はAra h 3の何れかに対するIgG1及びIgG2a抗体につきELISAアッセイによってアッセイした。

40

【0104】

Ara h 1を生成する大腸菌を注射したマウスは、検出可能なレベルのAra h 1アレルゲンに対する如何なる免疫グロブリンをも与えなかったのもので、そのデータは示してない。理論に制限されはしないが、我々は、これは、これらの細胞に依り生成された比較的少量のAra h 1のためでありうると推測している(前の議論を参照されたい)。Ara h 2を生成する大腸菌を注射したマウスは、比較的高レベルのIgG1及びIgG2aを含んだ。やはり、原因に制限されはしないが、我々は、これは、これらの細胞から放出されたAra h 2の量のためでありうると推測した(上記の議論を参照されたい)。Ara h 3を生成する大腸菌を注射したマウスは、比較的高レベルのIgG2a(Th1型

50

応答を示す)を含み且つ比較的低レベルの I g G 1 (T h 2 型応答を示す)を誘出した。

【 0 1 0 5 】

結果の解釈

本願のデータは、注意深く解釈すべきである。図中のデータは、O . D . レベルを表すだけであって、免疫グロブリンの絶対量を表すものではない。それ故、グループ間の比較は、O . D . として与えられたデータを考慮に入れるべきである。しかしながら、一般的傾向は、例えば、A r a h 3 に対する I g G 1 応答を示すマウスよりも一層多くのマウスが A r a h 3 に対する I g G 2 a 応答を示したことを示唆している。

【 0 1 0 6 】

付 表 A

アレルゲン起源	系統名 及び 原名	MW kDa	SEQ	受理番号 又は 参照番号
雑 草 の 花 粉				
キク 目				
Ambrosia artemisiifolia (矮性ブタクサ)	Amb a 1; 抗原 E	38	C	8,20
	Amb a 2; 抗原 K	38	C	8,21
	Amb a 3; Ra3	11	C	22
	Amb a 5; Ra5	5	C	11,23
	Amb a 6; Ra6	10	C	24,25
	Amb a 7; Ra7	12	P	26
	Amb a ?	11	C	27
Ambrosia trifida (オオブタクサ)	Amb t 5; Ra5G	4.4	C	9,10,28
Artemisia vulgaris (ヨモギ)	Art v 1	27-29	C	28A
	Art v 2	35	P	29
Helianthus annuus (ヒマワリ)	Hel a 1	34	-	29a
	Hel a 2; プロフィリン	15.7	C	Y15210
Mercurialis annua	Mer a 1; プロフィリン	14-15	C	Y13271
牧 草 の 花 粉				
イネ 目				
Cynodon dactylon (行藨芝)	Cyn d 1	32	C	30,S83343
	Cyn d 7		C	31,X91256
	Cyn d 12; プロフィリン	14	C	31a,Y08390
Dactylis glomerata (カモガヤ)	Dac g 1; AgDg1	32	P	32
	Dac g 2	11	C	33,S45354
	Dac g 3		C	33a,U25343
	Dac g 5	31	P	34
Holcus lanatus (シラゲガヤ)	Hol l 1		C	Z27084,Z68893
Lolium perenne (ライグラス)	Lol p 1; グループ I	27	C	35,36
	Lol p 2; グループ II	11	C	37,37a,X73363
	Lol p 3; グループ III	11	C	38
	Lol p 5; Lol p IX, Lol p Ib	31/35		34,39
	Lol p 11; トリブシンインヒビター関連	16		39a
Phalaris aquatica (カナリアサード)	Pha a 1		C	40,S80654
Phleum pratense (オオアワガエリ)	Phl p 1	27	C	X78813
	Phl p 2		C	41,X75925
	Phl p 4		P	41A
	Phl p 5; Ag25	32	C	42
	Phl p 6		C	43,Z27082
	Phl p 12; プロフィリン		C	44,X77583
	Phl p 13; ポリガラクトンナーゼ	55-60	C	AJ238848
Poa pratensis (ナガハグサ)	Poa p 1; グループ I	33	P	46
	Poa p 5	31/34	C	34,47

10

20

30

40

<i>Sorghum halepense</i> (ヒメモロコシ)	Sor h 1		C	48
樹木の花粉				
ブナ目				
<i>Alnus glutinosa</i> (ハンノキ)	Aln g 1	17	C	S50892
<i>Betula verrucosa</i> (カバノキ)	Bet v 1	17	C	イソアレルゲンの リスト参照 M65179 X79267 X87153/S54819 AF135127
	Bet v 2; プロフィリン	15	C	
	Bet v 3	8	C	
	Bet v 4		C	
	Bet v 5; イソフラボンレダクターゼ同族体	33.5	C	
	Bet v 7; シクロフィリン	18	C	P P81531
<i>Carpinus betulus</i> (クマシデ)	Car b 1	17	C	51
<i>Castanea sativa</i> (クリ)	Cas s 1; Bet v 1 同族体 Cas s5; キチナーゼ	22	P	52
<i>Corylus avellana</i> (ハシバミ)	Cor a 1	17	C	53
<i>Quercus alba</i> (ホワイトオーク)	Que a 1	17	P	54
<i>Cryptomeria japonica</i> (スギ)	Cry j 1	41-45	C	55,56 57,D29772
	Cry j 2		C	
<i>Juniperus ashei</i> (ヒマラヤスギ)	Jun a 1	43	P	P81294
	Jun a 3	30	P	P81295
<i>Juniperus oxycedrus</i> (ビャクシン)	Jun o 2; カルモジュリン様	29	C	AF031471
<i>Juniperus sabinoides</i> (ヒマラヤスギ)	Jun s 1	50	P	58
<i>Juniperus virginiana</i> (エンビツビャクシン)	Jun v 1	43	P	P81825
モクセイ目				
<i>Fraxinus excelsior</i> (トネリコ)	Fra e 1	20	P	58A
<i>Ligustrum vulgare</i> (イボタノキ)	Lig v 1	20	P	58A
<i>Olea europea</i> (オリーブ)	Ole e 1;	16	C	59,60
	Ole e 2; プロフィリン	15-18	C	60A
	Ole e 3;	9.2		60B
	Ole e 4;	32	P	P80741
	Ole e 5; スーパーオキシドジスムターゼ	16	P	P80740
	Ole e 6;	10	C	U86342
<i>Syringa vulgaris</i> (ライラック)	Syr v 1	20	P	58A
ダニ類				
<i>Acarus siro</i> (ダニ)	Aca s 13; 脂肪酸結合タンパク質	14*	C	AJ006774

10

20

30

40

<i>Blomia tropicalis</i> (ダニ)	Blo t 5; Blo t 12; Bt11a Blo t 13; Bt6 脂肪酸結合タンパク質		C C C	U59102 U27479 U58106
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (ダニ)	Der p 1; 抗原 P1 Der p 2; Der p 3; トリプシン Der p 4; アミラーゼ Der p 5; Der p 6; キモトリプシン Der p 7; Der p 8; グルタチオントランスフェラーゼ Der p 9; コラーゲン分解性セリンプロテアーゼ Der p 10; トロポミオシン Der p 14; アポリボホリン様 P	25 14 28/30 60 14 25 22-28 36	C C C C P C C P C C	61 62 63 64 65 66 67 67A 67B Y14906 Epton p.c.
<i>Dermatophagoides microceras</i> (ダニ)	Der m 1;	25	P	68
<i>Dermatophagoides farinae</i> (ダニ)	Der f 1; Der f 2; Der f 3; Der f 10; トロポミオシン Der f 11; パラミオシン Der f 14; Mag3, アポリボホリン	25 14 30 98	C C C C C C	69 70,71 63 72 72a D17686
<i>Euroglyphus maynei</i> (ダニ)	Eur m 14; アポリボホリン	177	C	AF149827
<i>Lepidoglyphus destructor</i> (倉庫ダニ)	Lep d 2.0101; Lep d 2.0102;	15 15	C C	73,74,75 75
動物				
<i>Bos domesticus</i> (家畜用ウシ) (食物も参照のこと)	Bos d 2; Ag3, リボカイン Bos d 4; α -ラクトアルブミン Bos d 5; β -ラクトグロブリン Bos d 6; 血清アルブミン Bos d 7; 免疫グロブリン Bos d 8; カゼイン	20 14.2 18.3 67 160 20-30	C C C C	76,L42867 M18780 X14712 M73993 77 77
<i>Canis familiaris</i> (<i>Canis domesticus</i>) (イヌ)	Can f 1; Can f 2; Can f 3; アルブミン	25 27	C C C	78,79 78,79 S72946
<i>Equus caballus</i> (家畜用ウマ)	Equ c 1; リボカリン Equ c 2; リボカリ	25 18.5	C P	U70823 79A,79B
<i>Felis domesticus</i> (ネコの唾液)	Fel d 1; cat-1	38	C	15
<i>Mus musculus</i> (マウスの尿)	Mus m 1; MUP	19	C	80,81
<i>Rattus norvegicus</i> (ラットの尿)	Rat n 1	17	C	82,83
カビ				
子囊菌類				
クロイボタケ目				
アルテルナリア アルテルナータ	Alt a 1; Alt a 2; Alt a 3; 熱ショックタンパク質	28 25 70	C C C	U82633 U87807,U87808 X78222,

10

20

30

40

	Alt a 6; リボソームタンパク質	11	C	U87806
	Alt a 7; YCP4 タンパク質	22	C	X78225
	Alt a 10; アルデヒドデヒドロゲナーゼ	53	C	X78227, P42041
	Alt a 11; エノラーゼ	45	C	U82437
	Alt a 12; 酸性リボソームタンパク質 P1	11	C	X84216
クラドスポリウム ヘルバルム	Cla h 1;	13		83a,83b
	Cla h 2;	23		83a,83b
	Cla h 3; アルデヒドデヒドロゲナーゼ	53	C	X78228
	Cla h 4; リボソームタンパク質	11	C	X78223
	Cla h 5; YCP4 タンパク質	22	C	X78224
	Cla h 6; エノラーゼ	46	C	X78226
	Cla h 12; 酸性リボソームタンパク質 P1	11	C	X85180
ユーロチウム目				
	Asp fl 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	34		84
アルベルギルス フミガーツス	Asp f 1;	18	C	83781,S39330
	Asp f 2;	37	C	U56938
	Asp f 3; ペルオキシソームタンパク質	19	C	U20722
	Asp f 4;	30	C	AJ001732
	Asp f 5; メタロプロテアーゼ	42	C	Z30424
	Asp f 6; Mn スーパーオキシドジスムターゼ	26.5	C	U53561
	Asp f 7;	12	C	AJ223315
	Asp f 8; リボソームタンパク質 P2	11	C	AJ224333
	Asp f 9;	34	C	AJ223327
	Asp f 10; アスパラギン酸プロテアーゼ	34		X85092
	Asp f 11; ペプチジル-プロリルイソメラーゼ	24		84a
	Asp f 12; 熱ショックタンパク質 P70	65	C	U92465
	Asp f 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	34		84b
	Asp f 15;	16	C	AJ002026
	Asp f 16;	43	C	g3643813
	Asp f 17;	34	C	AJ224865
	Asp f 18; 液胞セリン	90		84c
	Asp f ?;	55	P	85
	Asp f ?;		P	86
アルベルギルス・ニガー	Asp n 14; β -キシロシダーゼ	105	C	AF108944
	Asp n 18;	34	C	84b
	液胞セリン プロテイナーゼ			
	Asp n ?;	85	C	Z84377
アルベルギルス・オリゼー	Asp o 2; TAKA- アミラーゼ A	53	C	D00434,M33218
	Asp o 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	34	C	X17561
ペニシリウム ブレビコンバクツム	Pen b 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	33		86a
ペニシリウム・シトリヌム	Pen c 1; 熱ショックタンパク質 P70	70	C	U64207
	Pen c 3; ペルオキシソーム膜タンパク質			86b
	Pen c 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	33		86a
ペニシリウム・ノターツム	Pen n 1; N- アセチル グルコサミニダーゼ	68		87
	Pen n 13; アルカリセリンプロテイナーゼ	34		89
	Pen n 18; 液胞セリンプロテイナーゼ	32		89
	Pen o 18; 液胞セリンプロテイナーゼ	34		89

10

20

30

40

ホネタケ目				
トリコフィトン・ルブラム	Tri r 2;		C	90
	Tri r 4; セリンプロテアーゼ		C	90
トリコフィトン トンスランズ	Tri t 1;	30	P	91
	Tri t 4; セリンプロテアーゼ	83	C	90
酵母菌目				
カンジダ・アルピカンス	Cand a 1	40	C	88
カンジダ・ボイジニ	Cand b 2	20	C	J04984,J04985
担子菌類門				
担子菌関連酵母				
マラセジア・フルフル	Mal f 1;	21	C	91a AB011804
	Mal f 2; MF1 ペルオキシソーム 膜タンパク質	20	C	AB011805
	Mal f 3; MF2 ペルオキシソーム 膜タンパク質	35	C	Takesako, p.c.
	Mal f 4;	18*	C	AJ011955
	Mal f 5;	17*	C	AJ011956
担子菌類綱				
サイロシブ・キューベンス	Psi c 1;	16		91b
	Psi c 2; シクロフィリン			
コプリヌス・コマツス (ササクレヒトヨタケ)	Cop c 1;	11	C	AJ132235
	Cop c 2;			
	Cop c 3;			Brander, p.c.
	Cop c 5;			Brander, p.c.
	Cop c 7;			Brander, p.c.
昆虫				
ネッタイシマカ (蚊)	Aed a 1; アピラーゼ	68	C	L12389
	Aed a 2;	37	C	M33157
ミツバチ (蜜蜂)	Api m 1; ホスホリパーゼ A2	16	C	92
	Api m 2; ヒアルロニダーゼ	44	C	93
	Api m 4; メリチン	3	C	94
	Api m 6;	7-8	P	Kettner, p.c.
マルハナバチ (マルハナバチ)	Bom p 1; ホスホリパーゼ	16	P	95
	Bom p 4; プロテアーゼ		P	95
チャバネゴキブリ (チャバネゴキブリ)	Bla g 1; Bd90k		C	96
	Bla g 2; アスパラギン酸プロテアーゼ	36	C	
	Bla g 4; カリシン	21	C	97
	Bla g 5; グルタチオントランスフェラーゼ	22	C	98
	Bla g 6; トロポニン C	27	C	98
ワモンゴキブリ (ワモンゴキブリ)	Per a 1; Cr-PH	72-78	C	98A
	Per a 3; Cr-PI		C	
	Per a 7; トロポミオシン	37	C	Y14854
ユスリカ (ユスリカ)	Chi t 1-9; ヘモグロビン	16	C	99
	Chi t 1.01; コンポーネント III	16	C	P02229
	Chi t 1.02; コンポーネント IV	16	C	P02230
	Chi t 2.0101; コンポーネント I	16	C	P02221
	Chi t 2.0102; コンポーネント IA	16	C	P02221

10

20

30

40

	Chi t 3; コンポーネント II-ベータ Chi t 4; コンポーネント IIIA Chi t 5; コンポーネント VI Chi t 6.01; コンポーネント VIIA Chi t 6.02; コンポーネント IX Chi t 7; コンポーネント VIIB Chi t 8; コンポーネント VIII Chi t 9; コンポーネント X	16 16 16 16 16 16 16 16	C C C C C C C C	P02222 P02231 P02224 P02226 P02223 P02225 P02227 P02228
Dolichovespula maculata (米国産クロスズメバチ)	Dol m 1; ホスホリバーゼ A1 Dol m 2; ヒアルロニダーゼ Dol m 5; 抗原 5	35 44 23	C C C	100 101 102,103
Dolichovespula arenaria (キイロスズメバチ)	Dol a 5; 抗原 5	23	C	104
Polistes annularis (スズメバチ)	Pol a 1; ホスホリバーゼ A1 Pol a 2; ヒアルロニダーゼ Pol a 5; 抗原 5	35 44 23	P P C	105 105 104
Polistes dominulus (地中海スズメバチ)	Pol d 1; Pol d 4; セリンプロテアーゼ Pol d 5;	32-34	C	DR Hoffman DR Hoffman P81656
Polistes exclamans (スズメバチ)	Pol e 1; ホスホリバーゼ A1 Pol e 5; 抗原 5	34 23	P C	107 104
Polistes fuscatus (スズメバチ)	Pol f 5; 抗原 5	23	C	106
Polistes metricus (スズメバチ)	Pol m 5; 抗原 5	23	P	106
Vespa crabro (ヨーロッパスズメバチ)	Vesp c 1; ホスホリバーゼ Vesp c 5.0101; 抗原 5 Vesp c 5.0102; 抗原 5	34 23 23	P C C	107 106 106
Vespa mandarina (大型アジアスズメバチ)	Vesp m 1.01; Vesp m 1.02; Vesp m 5;			DR Hoffman DR Hoffman P81657
Vespula flavopilosa (スズメバチ)	Ves f 5; 抗原 5	23	C	106
Vespula germanica (スズメバチ)	Ves g 5; 抗原 5	23	C	106
Vespula maculifrons (スズメバチ)	Ves m 1; ホスホリバーゼ A1 Ves m 2; ヒアルロニダーゼ Ves m 5; 抗原 5	33.5 44 23	C P 23	108 109 104
Vespula pennsylvanica (スズメバチ)	Ves p 5; 抗原 5	23	C	106
Vespula squamosa (スズメバチ)	Ves s 5; 抗原 5	23	C	106
Vespula vidua (スズメバチ)	Ves vi 5;	23	C	106
Vespula vulgaris (スズメバチ)	Ves v 1; ホスホリバーゼ A1 Ves v 2; ヒアルロニダーゼ Ves v 5; 抗原 5	35 44 23	C P C	105A 105A 104
Myrmecia pilosula (オーストラリア ブルドッグアリ)	Myr p 1, Myr p 2;		C C	X70256 S81785

10

20

30

40

Solenopsis geminata (熱帯フシアリ)	Sol g 2; Sol g 4			DR Hoffman DR Hoffman
Solenopsis invicta (フシアリ)	Sol i 2; Sol i 3; Soli 4;	13 24 13	C C C	110,111 110 110
Solenopsis saevissima (ブラジルフシアリ)	Sols 2;			DR Hoffman
食物				
Gadus callarias (タラ)	Gad c 1; アレルゲン M	12	C	112,113
Salmo salar (タイセイヨウサケ)	Sals 1; パルプアルブミン	12	C	X97824,X97825
Bos domesticus (畜牛)	Bos d 4; α-ラクトアルブミン Bos d 5; β-ラクトグロブリン Bos d 6; 血清アルブミン Bos d 7; 免疫グロブリン Bos d 8; カゼイン	14.2 18.3 67 160 20-30	C C C	M18780 X14712 M73993 77 77
Gallus domesticus (ニワトリ)	Gal d 1; オボムコイド Gald 2; オバアルブミン Gald 3; コナルブミン (Ag22) Gald 4; リゾチーム Gal d 5; 血清アルブミン	28 44 78 14 69	C C C C C	114,115 114,115 114,115 114,115 X60688
Metapenaeus ensis (エビ)	Met e 1; トロポミオシン		C	U08008
Penaeus aztecus (エビ)	Pen a 1; トロポミオシン	36	P	116
Penaeus indicus (エビ)	Pen i 1; トロポミオシン	34	C	117
Todarodes pacificus (イカ)	Tod p 1; トロポミオシン	38	P	117A
Haliotis Midae (アワビ)	Hal m 1	49	-	117B
Apium graveolens (セロリ)	Api g 1; Bet v 1 同族体 Api g 4; プロフィリン Api g 5;	16* 55/58	C P	Z48967 AF129423 P81943
Brassica juncea (オリエンタル マスタード)	Bra j 1; 2S アルブミン	14	C	118
Brassica rapa (カブ)	Bra r 2; プロヘベイン様タンパク質	25	?	P81729
Hordeum vulgare (大麦)	Hor v 1; BMAI-1	15	C	119
Zea mays (トウモロコシ)	Zea m 14; 脂質輸送タンパク質	9	P	P19656
Corylus avellana (ハシバミ)	Cor a 1.0401; Bet v 1 同族体	17	C	AF136945
Malus domestica (リンゴ)	Mal d 1; Bet v 1 同族体 Mal d 3; 脂質輸送タンパク質	9	C C	X83672 Pastorello
Pyrus communis (西洋ナシ)	Pyr c 1; Bet v 1 同族体 Pyr c 4; プロフィリン Pyr c 5; イソフラボンレダクターゼ同族体	18 14 33.5	C C C	AF05730 AF129424 AF071477

10

20

30

40

<i>Oryza sativa</i> (イネ)	Ory s 1;		C	U31771
<i>Persea americana</i> (アボカド)	Pers a 1; エンドキチナーゼ	32	C	Z78202
<i>Prunus armeniaca</i> (ホンアズ)	Pru ar 1; Bet v 1 同族体 Pru ar 3; 脂質輸送タンパク質	9	C P	U93165
<i>Prunus avium</i> (セイヨウミザクラ)	Pru av 1; Bet v 1 同族体 Pru av 2; タウマチン同族体 Pru av 4; プロフィリン	15	C C C	U66076 U32440 AF129425
<i>Prunus persica</i> (モモ)	Pru p 3; 脂質輸送タンパク質	10	P	P81402
<i>Sinapis alba</i> (イエローマスタード)	Sin a 1; 2S アルブミン	14	C	120
<i>Glycine max</i> (大豆)	Gly m 1.0101; HPS Gly m 1.0102; HPS Gly m 2 Gly m 3; プロフィリン	7.5 7 8 14	P P P C	121 121 A57106 AJ223982
<i>Arachis hypogaea</i> (南京豆)	Ara h 1; ビシリン Ara h 2; コングルチン Ara h 3; グリシニン Ara h 4; グリシニン Ara h 5; プロフィリン Ara h 6; コングルチン同族体 Ara h 7; コングルチン同族体	63.5 17 14 37 15 15 15	C C C C C C C	L34402 L77197 AF093541 AF086821 AF059616 AF092846 AF091737
<i>Actinidia chinensis</i> (キウイ)	Act c 1; システインプロテアーゼ	30	P	P00785
<i>Solanum tuberosum</i> (ジャガイモ)	Sol t 1; パタチン	43	P	P15476
<i>Bertholletia excelsa</i> (ブラジルナッツ)	Ber e 1; 2S アルブミン	9	C	P04403,M17146
<i>Juglans regia</i> (ペルシアクルミ)	Jug r 1; 2S アルブミン Jug r 2; ビシリン	44	C C	U66866 AF066055
<i>Ricinus communis</i> (ヒマ)	Ric c 1; 2S アルブミン		C	P01089
その他				
<i>Anisakis simplex</i> (線虫)	Ani s 1 Ani s 2; パラミオシン	24 97	P C	A59069 AF173004
<i>Ascaris suum</i> (回虫)	Asc s 1;	10	P	122
<i>Aedes aegyptii</i> (蚊)	Aed a 1; アピラーゼ Aed a 2;	68 37	C C	L12389 M33157
<i>Hevea brasiliensis</i> (ゴム)	Hev b 1; 伸長因子 Hev b 2; (1,3- グルカナーゼ Hev b 2; (1,3- グルカナーゼ Hev b 3 Hev b 4; 微小らせんタンパク質複合体の コンポーネント	58 58 34/36 24 100/110/115	P P C P P	123,124 123,124 125 126,127 128

10

20

30

40

	Hev b 5	16	C	U42640
	Hev b 6.01 ヘベイン前駆体	20	C	M36986/p02877
	Hev b 6.02 ヘベイン	5	C	M36986/p02877
	Hev b 6.03 C- 末端断片	14	C	M36986/p02877
				U80598
	Hev b 7; パタチン同族体	46	C	Y15042
	Hev b 8; プロフィリン	14	C	AJ132580/AJ1
	Hev b 9; エノラーゼ	51	C	32581
				AJ249148
	Hev b 10; Mn- スーパーオキシド ジスムターゼ	26	C	
Ctenocephalides felis felis (ネコノミ)	Cte f 1; Cte f 2; M1b	- 27	- C	- AF231352
Homo sapiens (ヒトの 自己アレルゲン)	Hom s 1; Hom s 2; Hom s 3; Hom s 4; Hom s 5;	73* 10.3* 20.1* 36* 42.6*	C C C C C	Y14314 X80909 X89985 Y17711 P02538

10

【 0 1 0 7 】

20

1. Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an allergen database. IUIS, Baltimore, MD, Edition 1.0.
2. Marsh, D. G., L. Goodfriend, T. P. King, H. Lowenstein, and T. A. E. Platts-Mills. 1986. Allergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.
3. King, T.P., P.S. Norman, and J.T. Cornell. 1964. Isolation and characterization of allergen from ragweed pollen. II. Biochemistry 3:458-468.
4. Lowenstein, H. 1980. Timothy pollen allergens. Allergy 35:188-191.
5. Aukrust, L. 1980. Purification of allergens in Cladosporium herbarum. Allergy 35:206-207.
6. Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark, and P. E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics 54:61-75.
7. Bodmer, J. G., E. D. Albert, W. F. Bodmer, B. Dupont, H. A. Erlich, B. Mach, S. G. E. Marsh, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasuki, G. M. Th. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard, and P. I. Terasaki. 1991. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. Immunogenetics 33:301-309.
8. Griffith, I.J., J. Pollock, D.G. Klapper, B.L. Rogers, and A.K. Nault. 1991. Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in Ambrosia artemisiifolia (short ragweed). Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
9. Roebber, M., D. G. Klapper, L. Goodfriend, W. B. Bias, S. H. Hsu, and D. G. Marsh. 1985. Immunochemical and genetic studies of Amb t V (Ra5G), an Ra5 homologue from giant ragweed pollen. J. Immunol. 134:3062-3069.
10. Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roebber, M. Friedrichs, D. G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Solution structures of ragweed allergen Amb t V. Biochemistry 31:5117-5127.
11. Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roebber, D. G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Proton resonance assignments and three-dimensional solution structure of the ragweed allergen Amb a V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry 31:8697-8705.
12. Goodfriend, L., A.M. Choudhury, J. Del Carpio, and T.P. King. 1979. Cytochromes C: New ragweed pollen allergens. Fed. Proc. 38:1415.
13. Ekramoddoullah, A. K. M., F. T. Kasil, and A. H. Schon. 1982. Allergenic cross reactivity of cytochrome c from Kentucky bluegrass and perennial ryegrass pollens. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
14. Ansari, A. A., E. A. Killoran, and D. G. Marsh. 1987. An investigation of human response to perennial ryegrass (Lolium perenne) pollen cytochrome c (Lol p X). J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
15. Morgenstern, J.P., I.J. Griffith, A.W. Brauer, B.L. Rogers, J.F. Bond, M.D. Chapman, and M. Kuo. 1991. Amino acid sequence of Fel d I, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9690-9694.
16. Griffith, I.J., S. Craig, J. Pollock, X. Yu, J.P. Morgenstern, and B.L. Rogers. 1992. Expression and genomic structure of the genes encoding FdI, the major allergen from the domestic cat. Gene 113:263-268.
17. Weber, A., L. Marz, and F. Altmann. 1986. Characteristics of the asparagine-linked oligosaccharide from honey-bee venom phospholipase A2. Comp. Biochem. Physiol. 83B:321-324.
18. Weber, A., H. Schroder, K. Thalberg, and L. Marz. 1987. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. Allergy 42:464-470.
19. Stanworth, D. R., K. J. Dorrington, T. E. Hugli, K. Reid, and M. W. Turner. 1990. Nomenclature for synthetic peptides representative of immunoglobulin chain sequences. Bulletin WHO 68:109-111.
20. Rafnar, T., I. J. Griffith, M. C. Kuo, J. F. Bond, B. L. Rogers, and D.G. Klapper. 1991. Cloning of Amb a I (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. J. Biol. Chem. 266: 1229-1236.
21. Rogers, B.L., J.P. Morgenstern, I.J. Griffith, X.B. Yu, C.M. Counsell, A.W. Brauer, T.P. King, R.D. Garman, and M.C. Kuo. 1991. Complete sequence of the allergen Amb a II: recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. J. Immunol. 147:2547-2552.

30

40

22. Klapper, D.G., L. Goodfriend, and J.D. Capra. 1980. Amino acid sequence of ragweed allergen Ra3. *Biochemistry* 19:5729-5734.
23. Ghosh, B., M.P. Perry, T. Rafnar, and D.G. Marsh. 1993. Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Immunol.* 150:5391-5399.
24. Roebber, M., R. Hussain, D. G. Klapper, and D. G. Marsh. 1983. Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6. *J. Immunol.* 131:706-711.
25. Lubahn, B., and D.G. Klapper. 1993. Cloning and characterization of ragweed allergen Amb a VI (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.
26. Roebber, M., and D.G. Marsh. 1991. Isolation and characterization of allergen Amb a VII from short ragweed pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:324.
27. Rogers, B.L., J. Pollock, D.G. Klapper, and I.J. Griffith. 1993. Cloning, complete sequence, and recombinant expression of a novel allergen from short ragweed pollen (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
28. Goodfriend, L., A.M. Choudhury, D.G. Klapper, K.M. Coulter, G. Dorval, J. DelCarpio, and C.K. Osterland. 1985. Ra5G, a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: isolation, HLA-DR-associated activity and amino acid sequence. *Mol. Immunol.* 22:899-906.
- 28A. Breitenbach M, pers. comm.
29. Nilsen, B. M., K. Sletten, M. O'Neill, B. Smestad Paulsen, and H. van Halbeek. 1991. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris*). *J. Biol. Chem.* 266:2660-2668.
- 29A Jimenez A, Moreno C, Martinez J, Martinez A, Bartolome B, Guerra F, Palacios R 1994. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int Arch Allergy Immunol* 105:297-307.
30. Smith, P.M., Suphioglu, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B. and Singh, M.B. 1996. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:331-343.
31. Suphioglu, C., Ferreira, F. and Knox, R.B. 1997. Molecular cloning and immunological characterisation of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* 402:167-172.
- 31a. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, and Palacios R. 1997. Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Exp Allergy* 27:1307-1313.
32. Mecheri, S., G. Peltre, and B. David. 1985. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: The Ag Dg 1. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78:283-289.
33. Roberts, A.M., L.J. Bevan, P.S. Flora, I. Jepson, and M.R. Walker. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the Group II allergen of Cocksfoot/Orchard grass (*Dactylis glomerata*), Dac g II. *Allergy* 48:615-623.
- 33a. Guerin-Marchand, C., Senechal, H., Bouin, A.P., Leduc-Brodard, V., Taudou, G., Weyer, A., Peltre, G. and David, B. 1996. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol. Immunol.* 33:797-806.
34. Klysner, S., K. Welinder, H. Lowenstein, and F. Matthiesen. 1992. Group V allergens in grass pollen IV. Similarities in amino acid compositions and amino terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin. Exp. Allergy* 22:491-497.
35. Perez, M., G. Y. Ishioka, L. E. Walker, and R. W. Chesnut. 1990. cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. *J. Biol. Chem.* 265:16210-16215.
36. Griffith, I. J., P. M. Smith, J. Pollock, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, T. Hough, M. B. Singh, R. J. Simpson, L. D. Ward, and R. B. Knox. 1991. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. *FEBS Letters* 279:210-215.
37. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D.G. Marsh. 1989. Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* 264:11181-11185.
- 37a. Sidoli, A., Tamborini, E., Giuntini, J., Levi, S., Volonte, G., Pagni, C., De Lalla, C., Siccardi, A.G., Baralle, F.E., Galliani, S. and Arosio, P. 1993. Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* 268:21819-21825.
38. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D. G. Marsh. 1989. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: Comparison with known Lol p I and II sequences. *Biochemistry* 28:8665-8670.
39. Singh, M. B., T. Hough, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, P. M. Smith, P. Taylor, R. J. Simpson, L. D. Ward, J. McCluskey, R. Puy, and R.B. Knox. 1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1384-1388.
- 39a. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman CA, Grande M, van Leeuwen WA, Aalberse RC. 1995. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 95:970-978.
40. Suphioglu, C. and Singh, M.B. 1995. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Pha a I and four isoforms of Pha a 5, the major allergens of canary grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* 25:853-865.
41. Dolecek, C., Vrtala, S., Laffer, S., Steinberger, P., Kraft, D., Scheiner, O. and Valenta, R. 1993. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335:299-304.
- 41A. Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98:189-198.
42. Matthiesen, F., and H. Lowenstein. 1991. Group V allergens in grass pollens. I. Purification and characterization of the group V allergen from *Phleum pratense* pollen, Phl p V. *Clin. Exp. Allergy* 21:297-307.
43. Petersen, A., Bufer, A., Schramm, G., Schlaak, M. and Becker, W.M. 1995. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55-59.
44. Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchene, M., Kraft, D. and Scheiner, O. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:106-118.

10

20

30

40

46. Esch, R. E., and D. G. Klapper. 1989. Isolation and characterization of a major cross-reactive grass group I allergenic determinant. *Mol. Immunol.* 26:557-561.
47. Olsen, E., L. Zhang, R. D. Hill, F. T. Kisil, A. H. Schon, and S. Mohapatra. 1991. Identification and characterization of the Poa p IX group of basic allergens of Kentucky bluegrass pollen. *J. Immunol.* 147:205-211.
48. Avjioglu, A., M. Singh, and R.B. Knox. 1993. Sequence analysis of Sor h I, the group I allergen of Johnson grass pollen and its comparison to rye-grass Lol p I (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:340.
51. Larsen, J.N., P. Str man, and H. Ipsen. 1992. PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.* 29:703-711.
52. Kos T, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F, Hirschwehr R, Ahorn H, Horak F, Jager S, Sperr W, Kraft D, Scheiner O. 1993. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of a new major allergen from European chestnut pollen—Cas s I. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1086-92.
53. Breiteneder, H., F. Ferreira, K. Hoffmann-Sommergruber, C. Ebner, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft, and O. Scheiner. 1993. Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen. *Europ. J. Biochem.* 212:355-362.
54. Ipsen, H., and B.C. Hansen. 1991. The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g I, birch (*Betula verrucosa*) Bet v I, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b I and oak (*Quercus alba*) Que a I pollens. *Mol. Immunol.* 28:1279-1288.
55. Taniai, M., S. Ando, M. Usui, M. Kurimoto, M. Sakaguchi, S. Inouye, and T. Matuhasi. 1988. N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett.* 239:329-332.
56. Griffith, J.J., A. Lussier, R. Garman, R. Koury, H. Yeung, and J. Pollock. 1993. The cDNA cloning of Cry j I, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
57. Sakaguchi, M., S. Inouye, M. Taniai, S. Ando, M. Usui, and T. Matuhasi. 1990. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45:309-312.
58. Gross GN, Zimburean JM, Capra JD 1978. Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen. *Scand J Immunol* 8:437-41
- 58A. Obispo TM, Melero JA, Carpizo JA, Carreira J, Lombardero M 1993. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 23:311-316.
59. Cardaba, B., D. Hernandez, E. Martin, B. de Andres, V. del Pozo, S. Gallardo, J.C. Fernandez, R. Rodriguez, M. Villalba, P. Palomino, A. Basomba, and C. Lahoz. 1993. Antibody response to olive pollen antigens: association between HLA class II genes and IgE response to Ole e I (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.
60. Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otin, L.M. Sanchez, R.I. Monsalve, M.A. Gonzalez de la Pena, C. Lahoz, and R. Rodriguez. 1993. Amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen (*Olea europaea*). *Europ. J. Biochem.* 216:863-869.
- 60A. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R 1997. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e I) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 100:365-372.
- 60B. Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS, Rodriguez R. 1996. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 241: 772-778.
61. Chua, K. Y., G. A. Stewart, and W. R. Thomas. 1988. Sequence analysis of cDNA encoding for a major house dust mite allergen, Der p I. *J. Exp. Med.* 167:175-182.
62. Chua, K. Y., C. R. Doyle, R. J. Simpson, K. J. Turner, G. A. Stewart, and W. R. Thomas. 1990. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:118-123.
63. Smith WA, Thomas WR. 1996. Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 133-40.
64. Lake, F.R., L.D. Ward, R.J. Simpson, P.J. Thompson, and G.A. Stewart. 1991. House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterisation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1035-1042.
65. Tovey, E. R., M. C. Johnson, A. L. Roche, G. S. Cobon, and B. A. Baldo. 1989. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J. Exp. Med.* 170:1457-1462.
66. Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, and H. Yamakawa. 1991. Allergenic and proteolytic properties of fourth allergens from *Dermatophagoides* mites. In: "Dust Mite Allergens and Asthma. Report of the 2nd international workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium, pp. 63-64.
67. Shen, H.-D., K.-Y. Chua, K.-L. Lin, K.-H. Hsieh, and W.R. Thomas. 1993. Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin. Exp. Allergy* 23:934-40.
- 67A. O'Neil GM, Donovan GR, Baldo BA. 1994. Cloning and characterisation of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Acta*,1219:521-528.
- 67B. King C, Simpson RJ, Moritz RL, Reed GE, Thompson PJ, Stewart GA. 1996. The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 98:739-47.
68. Lind P, Hansen OC, Horn N. 1988. The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, Der p I of *D. pteronyssinus*. *J. Immunol.* 140:4256-4262.
69. Dilworth, R. J., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. 1991. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen Der f I. *Clin. Exp. Allergy* 21:25-32.
70. Nishiyama, C., T. Yunkai, T. Takai, Y. Okumura, and H. Okudaira. 1993. Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f II. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101:159-166.
71. Trudinger, M., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. 1991. cDNA encoding the major dust mite allergen Der f II. *Clin. Exp. Allergy* 21:33-38.
72. Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K. 1995. Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 96:74-83.
73. van Hage-Hamsten, M., T. Bergman, E. Johansson, B. Persson, H. Jornvall, B. Harfaut, and S.G.O. Johansson. 1993. N-terminal amino acid sequence of major allergen of the mite *lepidoglyphus destructor* (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:353.

10

20

30

40

74. Varela J, Ventas P, Carreira J, Barbas JA, Gimenez-Gallego G, Polo F. Primary structure of Lep d I, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. *Eur J Biochem* 225:93-98, 1994.
75. Schmidt M, van der Ploeg I, Olsson S, van Hage Hamsten M. The complete cDNA encoding the *Lepidoglyphus destructor* major allergen Lep d I. *FEBS Lett* 370:11-14, 1995.
76. Rautiainen J, Rytönen M, Pelkonen J, Penttinen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantylä R. BDA20, a major bovine dander allergen characterized at the sequence level is Bos d 2. Submitted.
77. Gjesing B, Lowenstein H. Immunochemistry of food antigens. *Ann Allergy* 53:602, 1984.
78. de Groot H, K.G.H. Goet, P. van Swieten, and R.C. Aalberse. 1991. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f I and Can f I-depleted extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1056-1065.
79. Konieczny, A. Personal communication; Immunologic Pharmaceutical Corp.
- 79A. Bulone, V. 1998. Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis. Molecular characterisation and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins. *Eur J Biochem* 253:202-211.
- 79B. Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
80. McDonald, B., M. C. Kuo, J. L. Ohman, and L. J. Rosenwasser. 1988. A 29 amino acid peptide derived from rat alpha 2 euglobulin triggers murine allergen specific human T cells (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:251.
81. Clarke, A. J., P. M. Cissold, R. A. Shawi, P. Beattie, and J. Bishop. 1984. Structure of mouse urinary protein genes: differential splicing configurations in the 3'-non-coding region. *EMBO J* 3:1045-1052.
82. Longbottom, J. L. 1983. Characterization of allergens from the urines of experimental animals. McMillan Press, London, pp. 525-529.
83. Laperche, Y., K. R. Lynch, K. P. Dolans, and P. Feigelsen. 1983. Tissue-specific control of alpha 2u globulin gene expression: constitutive synthesis in submaxillary gland. *Cell* 32:453-460.
- 83A. Aukrust L, Borch SM. 1979. Partial purification and characterization of two *Cladosporium herbarum* allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60:68-79.
- 83B. Sward-Nordmo M, Paulsen BS, Wold JK. 1988. The glycoprotein allergen Ag-54 (Cla h II) from *Cladosporium herbarum*. Structural studies of the carbohydrate moiety. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:288-294.
84. Shen, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:S157, 1999.
- 84A. Cramer R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. *Contrib. Microbiol.* Vol. 2, Karger, Basel (in press).
- 84B. Shen, et al. (manuscript submitted), 1999
- 84C. Shen HD, Ling WL, Tan MF, Wang SR, Chou H, Han SH. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.
85. Kumar, A., L.V. Reddy, A. Sochanik, and V.P. Kurup. 1993. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:1024-1030.
86. Teshima, R., H. Ikebuchi, J. Sawada, S. Miyachi, S. Kitani, M. Iwama, M. Irie, M. Ichinoe, and T. Terao. 1993. Isolation and characterization of a major allergenic component (gp55) of *Aspergillus fumigatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:698-706.
- 86A. Shen HD, Lin WL, Tsai JJ, Liaw SF, Han SH. 1996. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: crossreactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 26:444-451.
- 86B. Shen, et al. Abstract; The XVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.
87. Shen HD, Liaw SF, Lin WL, Ro LH, Yang HL, Han SH. 1995. Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of *Penicillium notatum* using MoAbs. *Clin Exp Allergy* 25:350-356.
88. Shen, H.D., K.B. Choo, H.H. Lee, J.C. Hsieh, and S.H. Han. 1991. The 40 kd allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 21:675-681.
89. Shen, et al. *Clin. Exp. Allergy* (in press), 1999.
90. Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. 1998. Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem* 273:29489-96.
91. Deuell, B., L.K. Arruda, M.L. Hayden, M.D. Chapman and T.A.E. Platts-Mills. 1991. Trichophyton tonsurans Allergen I. *J. Immunol.* 147:96-101.
- 91A. Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindborn L, Hellman U, Whitley P, van der Ploeg I, Harfast B, Scheynius A. 1997. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur J Biochem* 246:181-185.
- 91B. Horner WE, Reese G, Lehrer SB. 1995. Identification of the allergen Psi c 2 from the basidiomycete *Psilocybe cubensis* as a fungal cyclophilin. *Int Arch Allergy Immunol* 107:298-300.
92. Kuchler, K., M. Gmachl, M. J. Sippl, and G. Kreil. 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honey bee venom glands: The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184:249-254.
93. Gmachl, M., and G. Kreil. 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3569-3573.
94. Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177:314-322.
95. Jacobson, R.S., and D.R. Hoffman. 1993. Characterization of bumblebee venom allergens (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187.
96. Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, Hayden ML, Chapman MD. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 270:19563-19568, 1995.
97. Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calyces) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 270:31196-31201, 1995.
98. Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German Cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 107:295-297, 1995.

10

20

30

40

- 98A. Wu CH, Lee MF, Liao SC. 1995. Isolation and preliminary characterization of cDNA encoding American cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 96: 352-9.
99. Mazur, G., X. Baur, and V. Liebers. 1990. Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monog. Allergy* 28:121-137.
100. Soldatova, L., L. Kochoumian, and T.P. King. 1993. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS Letters* 320:145-149.
101. Lu, G., L. Kochoumian, and T.P. King. Whiteface hornet venom allergen hyaluronidase: cloning and its sequence similarity with other proteins (abst.). 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.
102. Fang, K. S. F., M. Vitale, P. Fehner, and T. P. King. 1988. cDNA cloning and primary structure of a white-faced hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.
103. King, T. P., D. C. Moran, D. F. Wang, L. Kochoumian, and B.T. Chait. 1990. Structural studies of a hornet venom allergen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266.
104. Lu, G., M. Villalba, M.R. Coscia, D.R. Hoffman, and T.P. King. 1993. Sequence analysis and antigen cross reactivity of a venom allergen antigen 5 from hornets, wasps and yellowjackets. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.
105. King, T. P. and Lu, G. 1997. Unpublished data.
- 105A. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N and Soldatova L. 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600.
106. Hoffman, D.R. 1993. Allergens in hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.
107. Hoffman, D.R. 1992. Unpublished data.
108. Hoffman, D. R. 1993. The complete amino acid sequence of a yellowjacket venom phospholipase (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187.
109. Jacobson, R.S., D.R. Hoffman, and D.M. Kemeny. 1992. The cross-reactivity between bee and vespid hyaluronidases has a structural basis (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292.
110. Hoffman, D.R. 1993. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: The amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:71-78.
111. Schmidt, M., R.B. Walker, D.R. Hoffman, and T.J. McConnell. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II. *FEBS Letters* 319:138-140.
112. Elsayed S, Bennis H. The primary structure of Allergen M from cod. *Scand J Immunol* 3:683-686, 1974.
113. Elsayed S, Aas K, Sletten K, Johansson SGO. Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochimistry* 9:647-661, 1972.
114. Hoffman, D. R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71:481-486.
115. Langeland, T. 1983. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. IV. specific IgE antibodies to individual allergens in hen's egg white related to clinical and immunological parameters in egg-allergic patients. *Allergy* 38:493-500.
116. Daul, C.B., M. Slattery, J.E. Morgan, and S.B. Lehrer. 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. In: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Schon, eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 291-293.
117. K.N. Shanti, B.M. Martin, S. Nagpal, D.D. Metcalfe, P.V. Subba Rao. 1993. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* 151:5354-5363.
- 117A. M. Miyazawa, H. Fukumachi, Y. Inagaki, G. Reese, C.B. Daul, S.B. Lehrer, S. Inouye, M. Sakaguchi. 1996. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:948-953.
- 117B. A. Lopata et al. 1997. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kDa IgE binding protein (Hal-m-1) in Abalone (*Haliotis midae*). *J. Allergy Clin. Immunol.* Submitted
118. Monsalve, R.L., M.A. Gonzalez de la Pena, L. Menendez-Arias, C. Lopez-Otin, M. Villalba, and R. Rodriguez. 1993. Characterization of a new mustard allergen, Bra j IE. Detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* 293:625-632.
119. Mena, M., R. Sanchez-Monge, L. Gomez, G. Salcedo, and P. Carbonero. 1992. A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Molec. Biol.* 20:451-458.
120. Menendez-Arias, L., I. Moneo, J. Dominguez, and R. Rodriguez. 1988. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *Eur. J. Biochem.* 177:159-166.
121. Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 346:48-49, 1995.
122. Christie, J. F., B. Dunbar, I. Davidson, and M. W. Kennedy. 1990. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology* 69:596-602.
123. Czuppon AB, Chen Z, Rennett S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 92:690-697, 1993.
124. Attanayaka DPSTG, Kekwick RGO, Franklin FCH. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 16:1079-1081.
125. Chye ML, Cheung KY. 1995. (1,3-glucanase is highly expressed in Laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 26:397-402.
126. Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Makinen-Kiljunen S, Turjanmaa K Fink J. 1993. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in Latex-allergic children with Spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 102:61-66.
127. Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ. 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. *J Allerg Clin Immunol* in press.
128. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardoso MJ. 1995. Latex B-serum (-1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major Latex allergens. *J nat Rubb Res* 10:82-99.

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

細菌（大腸菌）を殺菌するのに最適な温度を決定するためにデザインされた実験をグラフ形態で描いた図である。試料のアリコート中の生存コロニーの数を、温度（摂氏）の関数

50

として示してある。

【図 2】

細胞当たりのタンパク質生成の測定を示す図である。H I S タグを付けた A r a h 2 アレルゲンの光学密度 (O . D .) を、種々の濃度の大腸菌抽出物を S D S - P A G E ゲル上で電気泳動したイムノブロットから測定した。このアレルゲン O . D . を用いて、該抽出物により生成されたタンパク質の量を評価した。

【図 3】

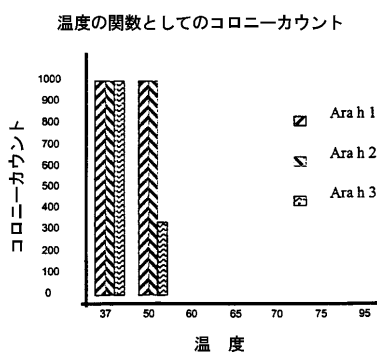
A r a h 2 を生成する大腸菌の注射後に、マウスにおいて生成された A r a h 2 特異的 I g G 抗体の E L I S A 分析の結果を示す図である。I g G 1 は、左側に、I g G 2 a は、右側にある。

【図 4】

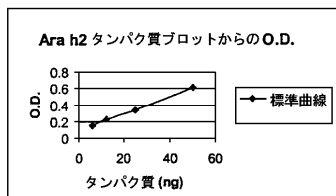
A r a h 3 を生成する大腸菌の注射後に、マウスにおいて生成された A r a h 3 特異的 I g G 抗体の E L I S A 分析の結果を示す図である。I g G 1 は、左側に、I g G 2 a は、右側にある。

10

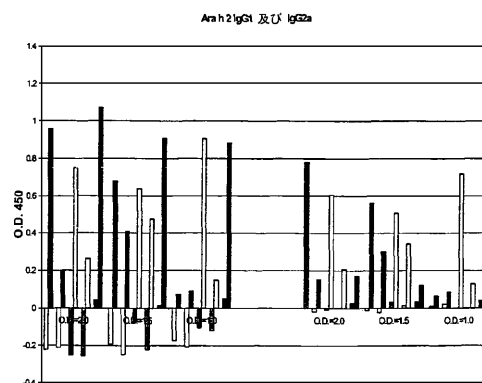
【図 1】



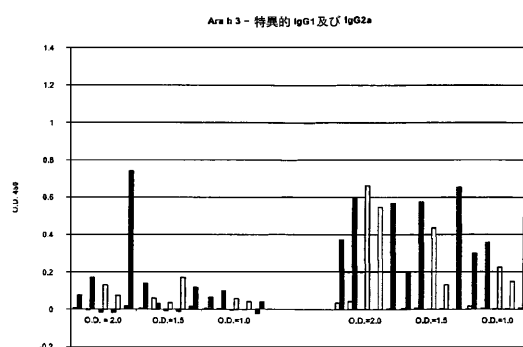
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 September 2001 (13.09.2001)

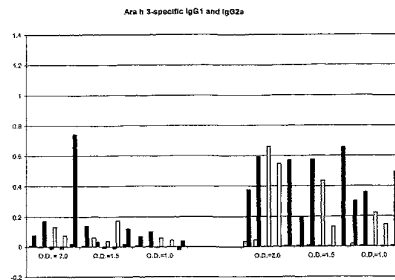
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/66136 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 39/00, 39/35, 35/66, A61P 37/08
- (21) International Application Number: PCT/US00/33121
- (22) International Filing Date: 6 December 2000 (06.12.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
6/0195,035 6 March 2000 (06.03.2000) US
Not furnished 6 December 2000 (06.12.2000) US
- (71) Applicant: PANACEA PHARMACEUTICALS, LLC.
[US/US]; 640 Sasco Hill Road, Fairfield, CT 06430-2038 (US).
- (72) Inventor: CAPLAN, Michael; 1217 Racebrook Road, Woodbridge, CT 06525 (US).
- (74) Agent: MAH, Stanley, C.; Choate, Hall & Stewart, 53 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MICROBIAL DELIVERY SYSTEM



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for treating or preventing allergic responses, particularly anaphylactic allergic responses, in subjects who are allergic to allergens or susceptible to allergies. Methods of the present invention utilize administration of microorganisms to subjects, where the microorganisms produce allergens and protect the subjects from exposure to the allergens until phagocytosed by antigen-presenting cells. Particularly preferred microorganisms are gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, and yeast. Particularly preferred allergens are proteins found in foods, venoms, drugs and latex that elicit allergic reactions and anaphylactic allergic reactions in individuals who are allergic to the proteins or are susceptible to allergies to the proteins. The proteins may also be modified to reduce the ability of the proteins to bind and crosslink IgE antibodies and thereby reduce the risk of eliciting anaphylaxis without affecting T-cell mediated Th1-type immunity.

WO 01/66136 A2

WO 01/66136

PCT/US00/33121

MICROBIAL DELIVERY SYSTEM

Priority Information

5 The present application claims priority under 35 U.S.C. 119(e) to the U.S. Provisional Patent Application Serial Number 60/195,035 entitled "Bacterial Polypeptide Delivery" filed March 6, 2000.

Related Applications

10 The present invention is generally in the area of controlled delivery of antigens for use in vaccination or induction of tolerance to allergens, and in particular relates to cellular delivery of proteins and polypeptides. This application is related to U.S.S.N. 60/169,330 entitled "Controlled Delivery of Antigens" filed Dec. 6, 1999; U.S.S.N. 15 09/141,220 entitled "Methods and Reagents for Decreasing Clinical Reaction to Allergy" filed Aug. 27, 1998; U.S.S.N. 09/455,294 entitled "Peptide Antigens" filed December 6, 1999; U.S.S.N. 09/494,096 filed January 28, 2000 entitled "Methods and Reagents for Decreasing Clinical Reaction to Allergy" by Bannon et al.; and U.S.S.N. 09/527,083 entitled "Immunostimulatory Nucleic Acids and Antigens" by Caplan 20 filed March 16, 2000; the teachings of which are all incorporated herein by reference in their entirety.

Background of the Invention

25 Allergic reactions pose serious public health problems worldwide. Pollen allergy alone (allergic rhinitis or hay fever) affects about 10-15% of the population, and generates huge economic costs. For example, reports estimate that pollen allergy generated \$1.8 billion of direct and indirect expenses in the United States in 1990 (*Fact Sheet*, National Institute of Allergy and Infectious Diseases; McMenamin, 30 *Annals of Allergy* 73:35, 1994). Asthma, which can be triggered by exposure to antigens, is also a serious public health problem, and like anaphylactic allergic reactions, can lead to death in extreme cases. Asthma currently accounts for millions

WO 01/66136

PCT/US00/33121

of visits yearly to hospitals and is increasing in frequency. The only treatment currently available is for alleviation of symptoms, for example, to relieve constriction of airways. More serious than the economic costs associated with pollen and other inhaled allergens (e.g., molds, dust mites, animal danders) is the risk of an
5 anaphylactic allergic reaction observed with allergens such as food allergens, insect venoms, drugs, and latex.

Allergic reactions result when an individual's immune system overreacts, or reacts inappropriately, to an encountered antigen. Typically, there is no allergic reaction the first time an individual is exposed to a particular antigen. However, it is
10 the initial response to an antigen that primes the system for subsequent allergic reactions. In particular, the antigen is taken up by antigen presenting cells (APC; e.g., macrophages and dendritic cells) that degrade the antigen and then display antigen fragments to T cells. T cells, in particular CD4⁺ "helper" T-cells, respond by secreting a collection of cytokines that have effects on other immune system cells.
15 The profile of cytokines secreted by responding CD4⁺ T cells determines whether subsequent exposures to the antigen will induce allergic reactions. Two classes of CD4⁺ T cells (Th1 and Th2) influence the type of immune response that is mounted against an antigen.

Th2 cells can secrete a variety of cytokines and interleukins including IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13. One effect of IL-4 is to stimulate the maturation of B
20 cells that produce IgE antibodies specific for the antigen. Allergic responses to allergens are characterized by the production of antigen-specific IgE antibodies which are dependent on help from IL-4 secreting CD4⁺ T cells. These antigen-specific IgE antibodies attach to receptors on the surface of mast cells, basophils and eosinophils,
25 where they act as a trigger to initiate a rapid allergic reaction upon the next exposure to antigen. When the individual encounters the antigen a second time, the antigen is quickly bound by these surface-associated IgE molecules. Each antigen typically has more than one IgE binding site, so that the surface-bound IgE molecules quickly become crosslinked to one another through their simultaneous (direct or indirect)
30 associations with antigen. Such cross-linking induces mast cell degranulation, resulting in the release of histamines and other substances that trigger allergic

WO 01/66136

PCT/US00/33121

reactions. Individuals with high levels of IgE antibodies are known to be particularly prone to allergies.

Current treatments for allergies involve attempts to "vaccinate" a sensitive individual against a particular allergen by periodically injecting or treating the individual with a crude suspension of the raw allergen. The goal, through controlled administration of known amounts of antigen, is to modulate the IgE response mounted in the individual. If the therapy is successful, the individual's IgE response is diminished, or can even disappear. However, the therapy requires several rounds of vaccination, over an extended time period (3-5 years), and very often does not produce the desired results. Moreover, certain individuals suffer anaphylactic reactions to the vaccines, despite their intentional, controlled administration.

Clearly, there is a need for treatments and preventive methods for patients with allergies to allergens that elicit serious allergic responses including anaphylaxis.

Summary of the Invention

The present invention provides methods and compositions for modulating the immune response in a subject. It is an aspect of the present invention to provide a method of treating or preventing undesirable allergic reactions and anaphylactic allergic reactions to allergens in a subject. Methods of the present invention involve administering to subjects, microorganisms that express or produce allergens of interest. Without being limited to the proposed mechanism of action, after administration the microorganisms are taken up by antigen-presenting cells in the subject where the expressed antigens are released. After being processed inside the antigen-presenting cells and displayed on the cell surface, the processed antigens activate T-cell mediated immune responses. Use of genetically modified microorganisms to express and deliver allergens to a subject therefore reduces the exposure of the allergens to the subject's IgE antibodies, which lead to allergic reactions and possibly anaphylaxis. The present invention therefore reduces the risk of anaphylaxis during immunotherapy. Furthermore, the microorganisms may act as a natural adjuvant to enhance desirable Th1-type immune responses.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

In a preferred embodiment, microorganisms are genetically modified to express selected polypeptides or proteins, and are used as delivery vehicles in accordance with the present invention. Such microorganisms include but are not limited to bacteria, viruses, fungi (including yeast), algae, and protozoa. Generally, preferred microorganisms for use in accordance with the present invention are single cell, single spore or single virion organisms. Additionally, included within the scope of the present invention are cells from multi-cellular organisms which have been modified to produce a polypeptide of interest.

In a particularly preferred embodiment, bacteria or yeast are used as microorganisms to express and deliver allergenic proteins to individuals to treat or prevent allergic responses, including anaphylactic allergic responses, to the allergens. Gram-positive and gram-negative bacteria may be used in the present invention as delivery vehicles. Antigens expressed by the bacteria may be secreted or non-secreted. Secretion of proteins may involve secretion into the cellular medium. For gram-negative bacteria and yeast, secretion may involve secretion into the periplasm. Secretion of polypeptides may be facilitated by secretion signal peptides. In certain preferred embodiments microorganisms expressing allergenic compounds may be administered to subjects in compositions as attenuated microorganisms, non-pathogenic microorganisms, non-infectious microorganisms, or as killed microorganisms. Preferably, the killed microorganisms are killed without degrading the antigenic properties of the polypeptides.

In another preferred embodiment, the allergens utilized are allergens found in foods, venom, drugs and a rubber-based products. Particularly preferred protein allergens are found in foods and venoms that elicit anaphylactic allergic responses in subjects who are allergic to the allergens. Included in the present invention are peptides and polypeptides whose amino acid sequences are found in the proteins allergens in nature. Also included in the present invention are allergens that have modifications that reduce the ability of the peptides, polypeptides and proteins to bind and crosslink IgE antibodies. Also included in the present invention are non-peptide allergens that are produced by microorganisms and include for example antibiotics such as penicillin.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

In another aspect of the invention, compositions for use in treating or prevent allergic and anaphylactic allergic responses in a subject comprise microorganisms that have been engineered by the hand of man, and preferably by the introduction of one or more introduced nucleic acids, to produce allergens in accordance with the present invention. In certain preferred embodiments, the produced allergens are peptides, polypeptides, or proteins encoded by the introduced nucleic acids(s).

Brief Description of Figures

- 10 Figure 1. Experiments designed to determine the optimal temperature for heat-killing bacteria (*E. coli*) are depicted in graphic form. The number of surviving colonies in aliquots of samples are shown as a function of temperature (Celsius).
- 15 Figure 2. Determination of protein produce per cell. The optical density (O.D.) of the HIS-tagged Ara h 2 allergen was determined from an immunoblot where different concentrations of *E. coli* extract has been electrophoresed on SDS-PAGE gels. The allergen O.D. was used to estimate the amount of protein produced by that extract.
- 20 Figure 3. Results of ELISA analysis of Ara h 2-specific IgG antibodies produced in mice following injection of *E. coli* producing Ara h 2. IgG1 is on the left and IgG2a is on the right.
- 25 Figure 4. Results of ELISA analysis of Ara h 3-specific IgG antibodies produced in mice following injection of *E. coli* producing Ara h 3. IgG1 is on the left and IgG2a is on the right.

Definitions

- 30 "Allergen": An "allergen" is an antigen that (i) elicits an IgE response in an individual; and/or (ii) elicits an asthmatic reaction (e.g., chronic airway inflammation

WO 01/66136

PCT/US00/33121

characterized by eosinophilia, airway hyperresponsiveness, and excess mucus production), whether or not such a reaction includes a detectable IgE response). Preferred allergens for the purpose of the present invention are peptide, polypeptide and protein allergens. An exemplary list of protein allergens is presented as an

5 Appendix. This list was adapted from [ftp://biobase.dk/pub/who-iuis/allergen.list](http://biobase.dk/pub/who-iuis/allergen.list) (updated on March 1, 2000), which provides lists of known allergens. Other preferred allergens are chemical compounds such as small molecules that are produced by proteins.

“Allergic reaction”: An allergic reaction is a clinical response by an

10 individual to an antigen. Symptoms of allergic reactions can affect cutaneous (e.g., urticaria, angioedema, pruritus), respiratory (e.g., wheezing, coughing, laryngeal edema, rhinorrhea, watery/itching eyes) gastrointestinal (e.g., vomiting, abdominal pain, diarrhea), and/or cardiovascular (if a systemic reaction occurs) systems. For the purposes of the present invention, an asthmatic reaction is considered to be a form of

15 allergic reaction.

“Anaphylactic antigen”: An “anaphylactic antigen” according to the present invention is an antigen (or allergen) that is recognized to present a risk of anaphylactic reaction in allergic individuals when encountered in its natural state, under natural conditions. For example, for the purposes of the present invention, pollens and

20 animal danders or excretions (e.g., saliva, urine) are not considered to be anaphylactic antigens. On the other hand, food antigens, insect antigens, drugs, and rubber (e.g., latex) antigens are generally considered to be anaphylactic antigens. Food antigens are particularly preferred anaphylactic antigens for use in the practice of the present invention. Particularly interesting anaphylactic antigens are those (e.g., nuts,

25 seeds, and fish) to which reactions are commonly so severe as to create a risk of death.

“Anaphylaxis” or “anaphylactic reaction”, as used herein, refers to an immune response characterized by mast cell degranulation secondary to antigen-induced cross-linking of the high-affinity IgE receptor on mast cells and basophils

30 with subsequent mediator release and the production of pathological responses in target organs, e.g., airway, skin digestive tract and cardiovascular system. As is known in the art, the severity of an anaphylactic reaction may be monitored, for

WO 01/66136

PCT/US00/33121

example, by assaying cutaneous reactions, puffiness around the eyes and mouth, and/or diarrhea, followed by respiratory reactions such as wheezing and labored respiration. The most severe anaphylactic reactions can result in loss of consciousness and/or death.

5 “Antigen”: An “antigen” is (i) any compound or composition that elicits an immune response; and/or (ii) any compound that binds to a T cell receptor (e.g., when presented by an MHC molecule) or to an antibody produced by a B-cell. Those of ordinary skill in the art will appreciate that an antigen may be collection of different chemical compounds (e.g., a crude extract or preparation) or a single compound (e.g.,
10 a protein). Preferred antigens are peptide, polypeptide or protein antigens.

 “Antigen presenting cells”: “Antigen presenting cells” or APCs” include known APCs such as Langerhans cells, veiled cells of afferent lymphatics, dendritic cells and interdigitating cells of lymphoid organs. The term also includes mononuclear cells such as lymphocytes and macrophages which take up polypeptides
15 and proteins according to the invention.

 “Attenuation”: “Attenuation” of microorganisms as used herein refers to the manipulation of the microorganisms so that the microorganisms do not induce significant toxic reactions in individuals or laboratory test animals. The manipulations include genetic methods and are well known in the art.

20 “IgE binding site”: An IgE binding site is a region of an antigen that is recognized by an anti-antigen IgE molecule. Such a region is necessary and/or sufficient to result in (i) binding of the antigen to IgE; (ii) cross-linking of anti-antigen IgE; (iii) degranulation of mast cells containing surface-bound anti-antigen IgE; and/or (iv) development of allergic symptoms (e.g., histamine release). In general,
25 IgE binding sites are defined for a particular antigen or antigen fragment by exposing that antigen or fragment to serum from allergic individuals (preferably of the species to whom inventive compositions are to be administered). It will be recognized that different individuals may generate IgE that recognize different epitopes on the same antigen. Thus, it is typically desirable to expose antigen or fragment to a
30 representative pool of serum samples. For example, where it is desired that sites recognized by human IgE be identified in a given antigen or fragment, serum is preferably pooled from at least 5-10, preferably at least 15, individuals with

WO 01/66136

PCT/US00/33121

demonstrated allergy to the antigen. Those of ordinary skill in the art will be well aware of useful pooling strategy in other contexts.

“Immunologic inducing agents”: The term “immunologic inducing agents” is used herein as agents that prompt the expression of Th1 stimulating cytokines by T-cells and include factors such as, CD40, CD40 ligand, oligonucleotides containing CpG motifs, TNF, and microbial extracts such as preparations of *Staphylococcus aureus*, heat killed *Listeria*, and modified cholera toxin.

“Inducible promoter”: The term “inducible promoter”, as used herein, means a promoter site which is activated directly by the presence or absence of a chemical agent or indirectly by an environmental stimulus such as temperature changes. A promoter is the region of DNA at which the enzyme RNA polymerase binds and initiates the process of gene transcription.

“Mast cell”: As will be apparent from context, the term “mast cell” is often used herein to refer to one or more of mast cells, basophils, and other cells having IgE receptors, which when activated by crosslinking bound IgE molecules, releases histamines, vasodilators, and/or other mediators of allergic responses.

“Microorganisms”: “Microorganisms” as used herein are cells, bacteria, fungi, viruses, algae, and protozoa. Preferred microorganisms can be genetically manipulated to produce a desired polypeptide(s).

“Peptide”: According to the present invention, a “peptide” comprises a string of at least three amino acids linked together by peptide bonds. Inventive peptides preferably contain only natural amino acids, although non-natural amino acids (i.e., compounds that do not occur in nature but that can be incorporated into a polypeptide chain; see, for example, <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif>, which displays structures of non-natural amino acids that have been successfully incorporated into functional ion channels) and/or amino acid analogs as are known in the art may alternatively be employed. Also, one or more of the amino acids in an inventive peptide may be modified, for example, by the addition of a chemical entity such as a carbohydrate group, a phosphate group, a farnesyl group, an isofarnesyl group, a fatty acid group, a linker for conjugation, functionalization, or other modification, etc.

WO 01/66136

PCT/US90/33121

A peptide or polypeptide is derived from a protein if the amino acid sequence of the peptide or polypeptide is found within the amino acid sequence of the protein. The sequences are preferably identical but may have a sequence homology between approximately 80-100%. It is also recognized that amino acid residues may be replaced with other amino acids residues with similar physical properties such as hydrophobicity, hydrophilicity, charge, aromatic structures and polarity.

“Reduced IgE binding”: An inventive composition or antigen is considered to have “reduced IgE binding” if it demonstrates a lower level of interaction with IgE when compared with unmodified antigen in any available assay. For example, a modified antigen is considered to have reduced IgE binding if (i) its affinity for anti-antigen IgE (assayed, for example, using direct binding studies or indirect competition studies) is reduced at least about 2-5 fold, preferably at least about 10, 20, 50, or 100 fold as compared with intact antigen ; (ii) ability of the modified antigen to support cross-linking of anti-antigen IgE is reduced at least about 2-fold, preferably at least about 5, 10, 20, 50, or 100 fold as compared with intact antigen; (iii) mast cells containing surface-bound anti-antigen IgE degranulate less (at least about 2 fold, preferably at least about 3, 5, 10, 20, 50, or 100 fold less) when contacted with modified as compared with unmodified antigen; and/or (iv) individuals contacted with modified antigen develop fewer (at least about 2 fold, preferably at least about 3, 5, 10, 20, 50, or 100 fold fewer) allergic symptoms, or developed symptoms are reduced in intensity when exposed to modified antigens as compared with unmodified antigens.

“Secretion signals”: A secretion signal is any amino acid sequence which when conjugated to a peptide, polypeptide or protein facilitates the transport of the conjugate fusion proteins across cell membranes. For uses of secretion signals in microorganisms, transport of fusion proteins involves crossing an inner membrane into the periplasm. It is preferred that secretion signals also facilitate transport of fusion proteins across an outer membrane into an extracellular medium. Secretion of proteins into the extracellular medium is considered “excretion”.

“Sensitized mast cell”: A “sensitized” mast cell is a mast cell that has surface-bound antigen specific IgE molecules. The term is necessarily antigen specific. That is, at any given time, a particular mast cell will be “sensitized” to

WO 01/66136

PCT/US00/33121

certain antigens (those that are recognized by the IgE on its surface) but will not be sensitized to other antigens.

“Small molecules”: As used herein, the term “small molecule” refers to a compound either synthesized in the laboratory or found in nature. Typically, a small molecule is organic and is characterized in that it contains several carbon-carbon bonds, and has a molecular weight of less than 1500 daltons, although this characterization is not intended to be limiting for the purposes of the present invention. Examples of “small molecules” that are allergens include without limitation penicillin, alcohols, and aspirin. Non-organic small molecule allergens include sulfites present in wine, for example.

“Susceptible individual”: According to the present invention, a person is susceptible to an allergic reaction if (i) that person has ever displayed symptoms of allergy after exposure to a given antigen; (ii) members of that person’s genetic family have displayed symptoms of allergy against the allergen, particularly if the allergy is known to have a genetic component; and/or (iii) antigen-specific IgE are found in the individual, whether in serum or on mast cells.

“Th1 response” and “Th2 response”: Certain preferred peptides, polypeptides, proteins and compositions of the present invention are characterized by their ability to suppress a Th2 response and/or to stimulate a Th1 response preferentially as compared with their ability to stimulate a Th2 response. Th1 and Th2 responses are well-established alternative immune system responses that are characterized by the production of different collections of cytokines and/or cofactors. For example, Th1 responses are generally associated with production of cytokines such as IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-18, IFN α , IFN γ , TNF β , etc; Th2 responses are generally associated with the production of cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10, etc. The extent of T cell subset suppression or stimulation may be determined by any available means including, for example, intra-cytoplasmic cytokine determination. In preferred embodiments of the invention, Th2 suppression is assayed, for example, by quantitation of IL-4, IL-5, and/or IL-13 in stimulated T cell culture supernatant or assessment of T cell intra-cytoplasmic (e.g., by protein staining or analysis of mRNA) IL-4, IL-5, and/or IL-13; Th1 stimulation is assayed, for example, by quantitation of IFN α , IFN γ , IL-2, IL-12,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

and/or IL-18 in activated T cell culture supernatant or assessment of intra-cytoplasmic levels of these cytokines.

Description of Certain Preferred Embodiments

5 The present invention provides compositions and methods for modulating the immune response in a subject. It is an aspect of the present invention that undesirable allergic immune responses to antigens in a subject are treated or prevented by administering modified cells, virions, or spores ("microorganisms") that express
10 allergens of interest. By using genetically modified microorganisms to express and deliver allergens, exposure of the allergens to the subject's IgE-mediated allergic immune response is reduced or eliminated. Without limitation to the mechanisms proposed, it is expected that the modified microorganisms of the present invention are engulfed by antigen-presenting cells (APCs) such as macrophages and dendritic cells
15 without exposing allergens to IgE antibodies. Once inside the APCs, the expressed allergens are released by lysis of the microorganisms or secretion of the antigen by the microorganisms. The allergens are then processed, for example through partial digestion by the APCs, and displayed on the cell surface.

Once the processed antigens are displayed on the cell surface, activation of the
20 cytotoxic T cell response and helper T cell response promotes cellular immune response and Th1-mediated B cell response to protein allergens. In addition, the processed antigens have a reduced ability (or no ability) to bind and crosslink IgE antibodies located on the surface of mast cells and basophils leading to the release of histamines and other vasodilators responsible for allergic and sometimes fatal
25 anaphylactic responses.

HOST MICROORGANISMS

Any microorganism capable of expressing (e.g., by expression of polypeptide or protein allergens, or by expression of polypeptide or protein enzymes involved in
30 synthesis of small molecule allergens) allergens may be used as delivery vehicles in accordance with the present invention. Such microorganisms include but are not limited to bacteria, viruses, fungi (including yeast), algae, and protozoa. Generally,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

microorganisms are single cell, single spore or single virion organisms. Additionally, included within the scope of the present invention are cells from multi-cellular organisms which have been modified to produce a polypeptide of interest.

Microorganisms that can be genetically manipulated to produce a desired polypeptide are preferred. (Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, Inc. 1999, incorporated herein by reference) Genetic manipulation includes mutation of the host genome, insertion of genetic material into the host genome, deletion of genetic material of the host genome, transformation of the host with extrachromosomal genetic material, transformation with linear plasmids, transformation with circular plasmids, insertion of genetic material into the host (e.g., injection of mRNA), insertion of transposons, and chemical modification of genetic material. Methods for constructing nucleic acids (including an expressible gene), and introducing such nucleic acids into an expression system to express the encoded protein are well established in the art (see, for example, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, incorporated herein by reference).

Use of microorganisms such as bacteria and yeast for allergen delivery in accordance with the present invention offers many advantages over delivery of allergens that are not encapsulated inside microorganisms for immunotherapy.

Generally, microorganisms, such as bacteria, are known to act as an adjuvant (for a review, see for example, Freytag et al. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:215-36, 1999). Therefore, use of microorganisms to deliver allergens to subjects, and APCs of subjects, provides protection of the allergen from IgE-mediated allergic responses and also provides an adjuvant effect which elicits a Th1-type immune response from an individual susceptible to allergic responses. In addition, use of non-pathogenic, non-infectious, attenuated and/or killed microorganisms reduces or eliminates toxicity which may be associated with allergen delivery vehicles.

In a preferred embodiment, bacteria are used as protein delivery microorganisms. Generally, bacteria are classified as gram-negative or gram-positive depending on the structure of the cell walls. Those skilled in the art are capable of identifying gram-negative and gram-positive bacteria which may be used to express proteins in accordance with the present invention. Non-limiting examples of genera

WO 01/66136

PCT/US00/33121

and species of gram-negative bacteria include *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Salmonella*, *Listeria*, *Legionella*, *Shigella*, *Yersenia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*. Non-limiting examples of genera and species of gram-positive bacteria which may be used in the present invention include *Bacillus subtilis*, *Sporolactobacillus*,
 5 *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, and *Lactococcus*.

Gram-negative bacterial systems for use as delivery vehicles are known and may be used in the present invention. For example, *E. coli* is a well-studied bacteria, and methods of protein expression in *E. coli* are well-established. Most strains of *E. coli* have the advantage of being non-pathogenic since *E. coli* is found naturally in the gut. Therefore, *E. coli* is preferred as a delivery vehicle in the present invention. In addition, Calderwood *et al.* (US Patent 5,747,028) utilize *Vibrio cholerae* as a delivery vehicle for production of antigens for use as a live vaccine against infectious organisms. Miller and Mekalanos (US Patent 5,731,196) utilize *Salmonella* as
 15 delivery vehicle for production of antigens for use as a live vaccine against infectious organisms. Hess *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1458-1463, 1996) utilize recombinant attenuated *Salmonella* which secretes antigenic determinants of *Listeria* as a live vaccine to protect against listeriosis. Donner *et al.* (WO 98/50067) utilize attenuated *Salmonella typhimurium* as a gram-negative host for secretion of
 20 polypeptides for controlling fertility and also teach that other attenuated gram-negative strains including *Yersinia* may be used to express and secrete such polypeptides.

Gram-positive bacteria have also been studied as delivery vehicles for proteins to modulate an immune response in a subject. WO 97/14806 describes the use of *Lactococcus* to deliver polypeptides into a body to enhance the immune response to the polypeptides. However, WO 97/14806 does not teach the use of *Lactococcus* to treat patients with food allergies and venom allergies which may result in anaphylaxis

In another preferred embodiment, yeast are used as protein delivery microorganisms. It is well known that yeast are amenable to genetic manipulation to express a protein or proteins of choice (Ausubel *et al. supra*). Furthermore, in general most yeast are non-pathogenic. Without limitation to these species, two well-

WO 01/66136

PCT/US00/33121

characterized species of yeast are the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Moreover, the administration of yeast that express protein antigens to alter an immune response has been studied. Duke et al. (US Patent No. 5,830,463; "Duke") describe the use of yeast to express proteins after administration of the yeast to a mammal. However, Duke does not teach the use of yeast to treat patients with food allergies and venom allergies which may result in anaphylaxis.

Microorganisms of the present invention may be administered to a subject as live or dead microorganisms. Preferably if the microorganisms are administered as live microorganisms, they are non-pathogenic or attenuated pathogenic microorganisms. For applications of the invention where live microorganisms are administered to individuals, preferably the microorganisms are attenuated and/or are administered in suitable encapsulation materials and/or as pharmaceutical compositions as vaccines to decrease an individual's immune response to the microorganism and/or allergenic compounds. Generally, attenuation involves genetically modifying the infectious pathogenic microorganism to reduce or eliminate the infectious ability of the microorganism. Preferably, the microorganism is attenuated such that an individual inoculated with the microorganism does not suffer any cytotoxic effects from the presence of the microorganism. Particularly preferred attenuated microorganisms are infectious intracellular pathogens which are phagocytosed by antigen-presenting cells in individuals who are exposed to the microorganism. Examples of microorganisms which are intracellular pathogens include *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Legionella*, *Listeria*, and *Shigella*.

Microorganisms of the present invention may be administered to subjects after killing the microorganisms. Any method of killing the microorganisms may be utilized that does not greatly alter the antigenicity of the expressed polypeptides. Methods of killing microorganism include but are not limited to using heat, antibiotics, chemicals such as iodine, bleach, ozone, and alcohols, radioactivity (i.e. irradiation), UV light, electricity, and pressure. Preferred methods of killing microorganisms are reproducible and kill at least 99% of the microorganisms. Particularly preferred is the use of heat above 50 degrees Celsius for a period of time that kills greater than 99% of the cells and preferably 100% of the cells.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

INDUCIBLE SYSTEMS

In another preferred embodiment, the inventive expression of allergens by microorganisms is regulated so that synthesis occurs at a controlled time after the live microorganism is administered to an individual. Preferably the induction of protein synthesis is regulated so that activation occurs after the microorganism(s) is taken up by antigen-presenting cells (APCs) and phagocytosed into the endosome. A desirable result of this regulation is that production of the allergen of interest occurs inside the APCs and therefore reduces or eliminates the exposure of the allergen to IgE molecules bound to the surface of histamine-releasing mast cells and basophils. This reduces or eliminates the risk of anaphylaxis during administration of microorganisms that produce anaphylactic antigens.

Any method of controlling protein synthesis in the microorganism may be used in accordance with the present invention. Preferably, the method of controlling protein synthesis utilizes an inducible promoter operatively-linked to the gene of interest (e.g., a gene which encodes a signal peptide and protein antigen). Many systems for controlling transcription of a gene using an inducible promoter are known (Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley and Sons, New York, 1999). Generally, inducible systems either utilize activation of the gene or derepression of the gene. It is preferred that the present invention utilizes activation of a gene to induces transcription. However, inducible systems using derepression of a gene may also be used in the present invention. Systems using activation are preferred because these systems are able to tightly control inactivation (and hence basal level synthesis) since derepression may result in low levels of transcription if the derepression is not tight.

Methods of inducing transcription include but are not limited to induction by the presence or absence of a chemical agent, induction using a nutrient starvation inducible promoter, induction using a phosphate starvation inducible promoter and induction using a temperature sensitive inducible promoter. A particularly preferred system for regulating gene expression utilizes tetracycline controllable expression system. Systems which utilize the tetracycline controllable expression system are commercially available (see for example, Clontech, Palo Alto, CA).

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Another particularly preferred system for regulating gene expression utilizes an ecdysone-inducible expression system which is also commercially available (Invitrogen, Carlsbad CA). The ecdysone-inducible expression system is based on the ability of ecdysone which is an insect hormone, to activate gene expression by
5 binding to the ecdysone receptor. The expression system utilizes a modified heterologous protein containing the ecdysone receptor, a viral transactivation domain (from VP16) and the retinoid X receptor derived from mammalian cells to bind to a modified ecdysone response element in the presence of a ligand such as ecdysone or an analog (e.g. muristerone A, ponasterone A).

10 It is preferred that inducible systems for use in the present invention utilize inducing agents that are non-toxic to mammalian cells including humans. Furthermore, it is preferred that transcriptional inducing agents permeate cells membranes. More specifically for activation of protein synthesis in microorganisms after phagocytosis by APCs, transcriptional inducing agents must be able to pass
15 through cells membranes of the APC and cell membranes of the microorganism to activate the expression of genes encoding protein allergens in accordance with the present invention. Since both tetracycline and ecdysone are able to pass through cell membranes and are non-toxic, tetracycline-inducible systems and ecdysone-inducible systems are ideally suited for use in the present invention. However, the use of
20 inducible systems in the present invention is not limited to those systems.

It is also preferred that bacteria that have not been phagocytosed are killed before induction of genes expressing polypeptide allergens of interest. A preferred method of killing bacteria is to use antibiotics which are not permeable to mammalian cell membranes such that only bacteria that are not phagocytosed are killed. The use
25 of antibiotics in accordance with the present embodiment reduces or eliminates the production of polypeptides by bacteria outside antigen presenting cells. It is important to reduce or eliminate exposure of allergen-producing bacteria to the immune system, especially bacteria that secrete polypeptides, which could elicit a potentially lethal anaphylactic reaction in an individual. Those having ordinary skill
30 in the art are readily aware of antibiotics which may be used. Such antibiotics include but are not limited to penicillin, ampicillin, cephalosporin, griseofulvin, bacitracin,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

polymyxin b, amphotericin b, erythromycin, neomycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin, gentamicin, and rifamycin

SECRETION SIGNALS

5 In another embodiment of the present invention, expressed allergens (and/or immunomodulatory molecules, such as cytokines; see below) are secreted by the microorganisms. Preferably, secretion of the allergens occurs inside a mammalian cell to reduce or eliminate exposure of allergens to a subject's allergic immune response. Secretion of polypeptides includes secretion into the extracellular medium
10 and secretion of polypeptides into the periplasm of microorganisms such as gram-negative bacteria and yeast. Advantages of secreting allergens into the periplasm include reducing leakage of the allergens prior to phagocytosis of the microorganism. This advantage is most applicable in non-inducible systems. Advantages of secreting allergens into the extracellular medium in inducible systems include maximizing the amount of allergens available for processing by antigen-presenting cells after
15 phagocytosis of the microorganisms of the present invention.

To express secreted polypeptides in bacteria, a variety of bacterial secretion signals known in the art may be used. For example, the Sec-dependent process in *E. coli* is one which is well known (for a review see Driessen et al. *Curr. Opin. Microbiology* 1:216-22). In addition, the OmpA signal peptide in *E. coli* has been described by Wong and Sutherland (US Patent 5,223,407). Fusion proteins containing either of these secretion signal peptides are not fully secreted by the bacteria, but rather transported across the inner membrane of the gram-negative bacteria into the periplasm. These secretion signals may be used in the present
25 invention to transport allergenic or immunomodulatory polypeptides into the periplasm of bacteria. After administration of the genetically engineered bacteria to an individual and subsequent phagocytosis by APCs, the allergenic or immunomodulatory polypeptides in the periplasm are released after degradation of the outer membrane by enzymes in the endosome of the APCs. Preferably, the bacteria
30 synthesize and secrete the polypeptides into the periplasm and are killed, preferably heat-killed, before administration. However, it is recognized that attenuated bacteria

WO 01/66136

PCT/US00/33121

may be used to secrete inventive allergens into the periplasm and administered to individuals.

In another preferred embodiment of secreted proteins or polypeptides, fusion proteins containing secretion signal sequences and allergenic or immunomodulatory sequences are fully secreted into the extracellular medium by a microorganism after synthesis of the protein. Such secretion signals include those found in hemolysin and listeriolysin. In a particularly preferred embodiment, the hemolysin complex of *E. coli* is used to transport allergenic or immunomodulatory polypeptides across the inner and outer membrane of a microorganism (e.g. *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*) into the extracellular medium (Spreng et al. *Mol. Microbiol.* 31:1589-1601, 1999, and references therein all of which are incorporated herein by reference). Fusion of HlyAs to proteins and polypeptides has been shown to result in secretion of these fusion proteins utilizing the hemolysin secretion system (Blight and Holland, *Trends Biotechnol.* 1994 Nov;12(11):450-5; Gentschev et al., *Behring Inst Mitt.* 1994 Dec;(95):57-66)

The hemolysin protein (HlyA) contains a C-terminal transport signal (HlyAs) which is approximately 50-60 amino acids in length (Hess et al., *Mol Gen Genet.* 1990 Nov;224(2):201-8; Jarchau et al., *Mol Gen Genet.* 1994 Oct 17;245(1):53-60). The HlyA protein is secreted across the inner and outer cellular membranes by the hemolysin secretion system. This complex contains three membrane proteins. Two of these proteins, HlyB and HlyD, are located in the inner membrane, and the third TolC, is located at the outer membrane. Genes encoding these proteins are part of the hemolysin operon which consists of four genes *hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, and *hlyD* (Wagner et al., *J Bacteriol.* 1983 Apr;154(1):200-10; Gentschev. *Gene.* 1996 Nov 7;179(1):133-40).

In a preferred embodiment for use of the Hly secretion system, DNA plasmids (vectors) are used to express fusion proteins containing the HlyAs signal peptide and allergenic or immunomodulatory polypeptides. The genes encoding the transport complex (hlyB, and hlyD) are encoded by the same vector. It is recognized that multiple vectors can be used to encode and express these genes, or that sequences encoding these genes can be inserted into the host genome for expression. Preferably, a single vector contains the complete hemolysin operon including the hly specific

WO 01/66136

PCT/US00/33121

promoter and an enhancer-type regulator hlyR; the HlyA gene where only the minimal polypeptide sequence necessary to transport a fusion protein is present; and the antigen of interest. TolC protein is generally produced by the host *E. coli* system. However, in systems where tolC DNA is not encoded by a host organism, tolC can be encoded by a vector.

In a particularly preferred embodiment, the secretion plasmid pMOhly1 described in WO 98/50067 ("Donner") is used to express fusion proteins containing secretion signal sequences and polypeptides related to inducing anaphylaxis in individuals. The secretion vector pMOhly1 contains the complete hemolysin operon including the *hly* specific promoter and an enhancer-type regulator hlyR. A majority of the *hlyA* gene has been deleted so that HlyA encodes only the 34 amino terminal and 61 carboxyl terminal amino acids (HlyA_s). A unique Nsi restriction enzyme site between the amino terminal and carboxyl terminal residues of HlyA facilitates the insertion of heterologous genes or gene fragments into the reading frame of HlyA_s. The genetic information for antigens the size of 10-1000 amino acids can be inserted into this secretion vector pMOhly1, which facilitates the secretion of these antigens in attenuated *Salmonella* and other gram-negative attenuated inoculation strains (e.g. *E. coli*, *Vibrio cholera*, *Yersina enterocolitica*). In contrast to other secretion systems, the secretion of fusion proteins using a single plasmid is described by Donner. An advantage of the hemolysin secretion system in comparison to conventional transport systems is the larger size of the fusion proteins synthesized and secreted according to the methods taught in Donner. Conventional secretion systems for the presentation of antigens are only capable of secreting relatively short peptides to the outer part of the bacterial cell (Cardenas and Clements, *Clin Microbiol Rev.* 1992 Jul;5(3):328-42).

ANTIGENS AND ALLERGENS

In general, any allergen may be produced by microorganisms in accordance with the present invention. Preferred allergens are found in certain foods, venom, drugs or rubber and are capable of eliciting allergic responses, and in particular anaphylactic allergic responses in an individual. Particularly preferred allergens are protein or polypeptide allergens.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

In a preferred embodiment, microorganisms of the present invention produce allergenic proteins that elicit allergies, possibly anaphylaxis, and are found in foods, venoms, drugs, and rubber-based products. Particularly preferred allergenic proteins that induce anaphylaxis, such as several protein allergens found in food (peanut, milk, egg, wheat), insect venom (i.e. bees, reptiles), drugs, and latex. Non-limiting examples of protein allergens found in food include proteins found in nuts (e.g., peanut walnut, almond, pecan, cashew, hazelnut, pistachio, pine nut, brazil nut), seafood (e.g. shrimp, crab, lobster, clams), fruit (e.g. plums, peaches, nectarines; *Ann Allergy Asthma Immunol* 7(6):504-8 (1996); cherries, *Allergy* 51(10):756-7 (1996)), seeds (sesame, poppy, mustard), and soy and dairy products (e.g., egg, milk).

Some protein allergens found in nuts are related to legume allergies and may be used instead of the legume proteins (e.g. peanuts, soybeans, lentils; *Ann Allergy Asthma Immunol* 77(6): 480-2 (1996)). Also, protein antigens found in pollen-related food allergies may be used (e.g. birch pollen related to apple allergies). Other protein allergens found in foods include those found in young garlic (*Allergy* 54(6):626-9 (1999)), and for children allergic to house dust mites, allergens found in snails (*Arch Pediatr* 4(8):767-9 (1997)). Protein allergens in wheat are known to cause exercise-induced allergies (*J Allergy Clin Immunol* 1999 May;103(5 Pt 1):912-7).

Stings from organisms that inject venoms, such as insect stings are known to cause anaphylaxis in individuals with allergies to the venom. In general, insect venom includes venom from Hymenoptera such as bees, hornets, wasps, yellow jackets, velvet ants, and fire ants. In particular for example, venom from honey bees of the genus *Apis* can cause anaphylaxis in stung victims who are allergic (Weber et al. *Allergy* 42:464-470). The venom from honey bees contains numerous compounds which have been extensively studied and characterized (see for a reference, Banks and Shipolini. *Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom*. Chapter 7 of Venoms of the Hymenoptera. Ed. T. Pick. Academic Press. London. 1986). The two main components of bee venom are phospholipase A2 and melittin and are preferred protein allergens for use in the present invention for treating and preventing allergies to bee venom.

In certain uses of the present invention, it will be desirable to work in systems in which a single compound (e.g., a single protein) is responsible for most observed

WO 01/66136

PCT/US00/33121

allergy. In other cases, the invention can be applied to more complex allergens. Therefore, collections of more than one antigen can be used so that immune responses to multiple antigens may be modulated simultaneously.

Appendix A presents a representative list of certain known protein antigens.

- 5 As indicated, the amino acid sequence is known for many or all of these proteins, either through knowledge of the sequence of their cognate genes or through direct knowledge of protein sequence, or both. Of particular interest are anaphylactic antigens.

- 10 In another embodiment of allergenic antigens, microorganisms are genetically engineered to synthesize and secrete modified allergenic polypeptides that elicit anaphylaxis when exposed to individuals who are susceptible to anaphylactic shock. Preferably, the allergens are modified such that the ability to elicit anaphylaxis is reduced or eliminated. As previously discussed allergens elicit allergic responses which are sometimes severe enough to induce anaphylactic shock by crosslinking IgE
- 15 antibodies bound to the surface of mast cells and basophils. The IgE crosslinking releases compounds such as histamines which causes symptoms related to allergies and anaphylactic shock. In accordance with the present invention, microorganisms are used to synthesize and secrete antigens which are modified to reduce or eliminate IgE binding sites while still maintaining antigenicity or immunomodulatory activity
- 20 (U.S.S.N. 09/141,220 incorporated herein by reference). This reduces the risk of allergic or anaphylactic responses in individuals treated with vaccines containing these engineered microorganisms.

- The amount of antigen to be employed in any particular composition or application will depend on the nature of the particular antigen and of the application
- 25 for which it is being used, as will readily be appreciated by those of ordinary skill in the art. The experiments described in Examples 1-4 suggest that larger amounts of polypeptides are useful for inducing Th1 responses. The amount of antigen can be controlled by a variety of factors including but not limited to expression systems, inducible expression systems, levels of secretion and excretion, methods of killing
- 30 bacteria before delivery. Those of ordinary skill in the art are capable of determining the desired levels of antigens to be produced by bacteria and delivered to individuals.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

It is recognized that multiple antigenic molecules may be delivered by bacteria simultaneously in accordance with the methods of the present invention. Without limitation, different antigenic determinants for one antigenic protein may be delivered. Different antigenic determinants from different antigenic proteins may also be delivered. Further, multiple antigenic polypeptides and proteins may be delivered in accordance with the present invention. It is also recognized that single or multiple antigenic polypeptides and single or multiple cytokines may be delivered to individuals by bacteria in accordance with the present invention. For example but without limitation, allergenic antigens of the present invention and immunomodulatory molecules such as interleukins may be delivered by bacteria using secreted or non-secreted methods in accordance with the present invention.

ADJUVANTS AND IMMUNOSTIMULATORY AGENTS

Compositions and methods of the present invention include the use of adjuvants and immunomodulatory polypeptides or immunostimulatory factors to modulate an individual's immune response. Immunologic adjuvants are agents that enhance specific immune responses to vaccines. Formulation of vaccines with potent adjuvants is desirable for improving the performance of vaccines composed of antigens. Adjuvants may have diverse mechanisms of action and should be selected for use based on the route of administration and the type of immune response (antibody, cell-mediated, or mucosal immunity) that is desired for a particular vaccine

In general, immunomodulatory polypeptides include cytokines which are small proteins or biological factors (in the range of 5-20 kD) that are released by cells and have specific effects on cell-cell interaction, communication and behavior of other cells. As previously described, cytokines in accordance with the present invention are proteins that are secreted to T-cells to induce a Th1 or Th2 response. Preferably, the cytokine(s) to be administered is/are selected to reduce production of a Th2 response to antigens associated with anaphylaxis. One preferred method of reducing a Th2 response is through induction of the alternative response. Cytokines that, when expressed during antigen delivery into cells, induce a Th1 response in T cells (i.e., "Th1 stimulating cytokines") include IL-12, IL-2, I-18, IL-1 or fragments thereof, IFN γ , and/or IFN γ .

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Other compounds that are immunomodulatory include immunological inducing agents. These inducing agents prompt the expression of Th1 stimulating cytokines by T-cells and include factors such as, CD40, CD40 ligand, oligonucleotides containing CpG motifs, TNF, and microbial extracts such as preparations of *Staphylococcus aureus*, heat killed *Listeria*, and modified cholera toxin, etc.

Those of ordinary skill in the art readily appreciate the preferred types of adjuvants for use with particular antigen compositions. In general, immunologic adjuvant include gel-type adjuvants (e.g. aluminum hydroxide/aluminum phosphate, calcium phosphate), microbial adjuvants (e.g. DNA such as CpG motifs; endotoxin such as monophosphoryl lipid A; exotoxins such as cholera toxin, *E. coli* heat labile toxin, and pertussis toxin; and muramyl dipeptide), oil-emulsion and emulsifier-based adjuvants (e.g. Freund's Incomplete Adjuvant, MF59, and SAF), particulate adjuvants (e.g. liposomes, biodegradable microspheres, and saponins), and synthetic adjuvants (e.g. nonionic block copolymers, muramyl peptide analogues, polyphosphazene, and synthetic polynucleotides).

Adjuvants that are known to stimulate Th2 responses are preferably avoided. Particularly preferred adjuvants include, for example, preparations (including heat-killed samples, extracts, partially purified isolates, or any other preparation of a microorganism or macroorganism component sufficient to display adjuvant activity) of microorganisms such as *Listeria monocytogenes* or others (e.g., Bacille Calmette-Guerin [BCG], *Corynebacterium* species, *Mycobacterium* species, *Rhodococcus* species, *Eubacteria* species, *Bordetella* species, and *Nocardia* species), and preparations of nucleic acids that include unmethylated CpG motifs (see, for example, U.S. Patent No. 5,830,877; and published PCT applications WO 96/02555, WO 98/18810, WO 98/16247, and WO 98/40100, each of which is incorporated herein by reference). Other preferred adjuvants reported to induce Th1-type responses and not Th2-type responses include, for example, Aviridine (N,N-di-octadecyl-N'-bis (2-hydroxyethyl) propanediamine) and CRL 1005. Particularly preferred are ones that induce IL-12 production, including microbial extracts such as fixed *Staphylococcus aureus*, *Streptococcal* preparations, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolysaccharide (LPS), monophosphoryl lipid A (MPLA) from gram negative bacterial

WO 01/66136

PCT/US00/33121

lipopolysaccharides (Richards et al. *Infect Immun* 1998 Jun;66(6):2859-65), *listeria monocytogenes*, *toxoplasma gondii*, *leishmania major*. Some polymers are also adjuvants. For example, polyphosphazenes are described in U.S. Patent No. 5,500,161 to Andriavnov, et al. These can be used not only to encapsulate the

5 microorganisms but also to enhance the immune response to the antigen.

If adjuvants are not synthesized by microorganisms in accordance with the present invention, adjuvants which are cytokines may be provided as impure preparations (e.g., isolates of cells expressing a cytokine gene, either endogenous or exogenous to the cell), but are preferably provided in purified form. Purified

10 preparations are preferably at least about 90% pure, more preferably at least about 95% pure, and most preferably at least about 99% pure. Alternatively, genes encoding the cytokines or immunological inducing agents may be provided, so that gene expression results in cytokine or immunological inducing agent production either in the individual being treated or in another expression system (e.g., an *in vitro*

15 transcription/translation system or a host cell) from which expressed cytokine or immunological inducing agent can be obtained for administration to the individual. It is recognized that microorganisms utilized to synthesize and deliver allergenic and/or immunomodulatory proteins according to the present invention can act as an adjuvant, and that preferred microorganisms are immunostimulatory adjuvants.

20 It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that the inventive administration of microorganisms expressing cytokines and/or allergens may optionally be combined with the administration of any other desired immune system modulatory factor such as, for example, an adjuvant or other immunomodulatory compound.

25

METHODS OF ADMINISTRATION

Formulations can be delivered to a patient by any available route including for example enteral, parenteral, topical (including nasal, pulmonary or other mucosal route), oral or local administration. The compositions are preferably administered in

30 an amount effective to elicit cellular immunity and production of Th1-related IgG while minimizing IgE mediated responses. Also preferred are compositions administered in an effective amount to active T-cell response, preferably Th1-type

WO 01/66136

PCT/US00/33121

responses. For compositions of the present invention containing bacteria, administration is preferably delivered parenterally.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

5 Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention may include a pharmaceutically acceptable excipient or carrier. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" means a non-toxic, inert solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. Some examples of materials which can serve as pharmaceutically acceptable carriers

10 are sugars such as lactose, glucose, and sucrose; starches such as corn starch and potato starch; cellulose and its derivatives such as sodium carboxymethyl cellulose, ethyl cellulose and cellulose acetate; powdered tragacanth; malt; gelatin; talc; excipients such as cocoa butter and suppository waxes; oils such as peanut oil, cottonseed oil; safflower oil; sesame oil; olive oil; corn oil and soybean oil; glycols;

15 such as propylene glycol; esters such as ethyl oleate and ethyl laurate; agar; buffering agents such as magnesium hydroxide and aluminum hydroxide; alginic acid; pyrogen-free water; isotonic saline; Ringer's solution; ethyl alcohol, and phosphate buffer solutions, as well as other non-toxic compatible lubricants such as sodium lauryl sulfate and magnesium stearate, as well as coloring agents, releasing agents,

20 coating agents, sweetening, flavoring and perfuming agents, preservatives and antioxidants can also be present in the composition, according to the judgment of the formulator. The pharmaceutical compositions of this invention can be administered to humans and/or to other animals, orally, rectally, parenterally, intracisternally, intravaginally, intraperitoneally, topically (as by powders, ointments, or drops),

25 bucally, or as an oral or nasal spray.

 Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, microemulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. In addition to the active compounds, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art such as, for example, water or other solvents, solubilizing

30 agents and emulsifiers such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, dimethylformamide, oils (in particular, cottonseed, groundnut, corn, germ, olive,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

castor, and sesame oils), glycerol, tetrahydrofurfuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan, and mixtures thereof. Besides inert diluents, the oral compositions can also include agents such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring, and perfuming agents.

5 Injectable preparations, for example, sterile injectable aqueous or oleaginous suspensions may be formulated according to the known art using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution, suspension or emulsion in a nontoxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butanediol. Among the
10 acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution, U.S.P. and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil can be employed including synthetic mono- or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid are used in the preparation of injectables.

15 In order to prolong the effect of an agent, it is often desirable to slow the absorption of the drug from subcutaneous or intramuscular injection. This may be accomplished by the use of a liquid suspension of crystalline or amorphous material with poor water solubility. The rate of absorption of the agent then depends upon its rate of dissolution which, in turn, may depend upon crystal size and crystalline form.
20 Alternatively, delayed absorption of a parenterally administered drug form is accomplished by dissolving or suspending the drug in an oil vehicle. Injectable depot forms are made by forming microcapsule matrices of the drug in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending upon the ratio of agent to polymer and the nature of the particular polymer employed, the rate of release of the
25 agent can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include poly(orthoesters) and poly(anhydrides) Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes or microemulsions which are compatible with body tissues.

 Compositions for rectal or vaginal administration are preferably suppositories
30 which can be prepared by mixing the compounds of this invention with suitable non-irritating excipients or carriers such as cocoa butter, polyethylene glycol or a suppository wax which are solid at ambient temperature but liquid at body

WO 01/66136

PCT/US00/33121

temperature and therefore melt in the rectum or vaginal cavity and release the active compound.

Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. In such solid dosage forms, the active compound is mixed with at least one inert, pharmaceutically acceptable excipient or carrier such as sodium citrate or dicalcium phosphate and/or a) fillers or extenders such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and silicic acid, b) binders such as, for example, carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinylpyrrolidone, sucrose, and acacia, c) humectants such as glycerol, d) disintegrating agents such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates, and sodium carbonate, e) solution retarding agents such as paraffin, f) absorption accelerators such as quaternary ammonium compounds, g) wetting agents such as, for example, cetyl alcohol and glycerol monostearate, h) absorbents such as kaolin and bentonite clay, and i) lubricants such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, and mixtures thereof. In the case of capsules, tablets and pills, the dosage form may also comprise buffering agents.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugar as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

The solid dosage forms of tablets, dragees, capsules, pills, and granules can be prepared with coatings and shells such as enteric coatings and other coatings well known in the pharmaceutical formulating art. They may optionally contain opacifying agents and can also be of a composition that they release the active ingredient(s) only, or preferentially, in a certain part of the intestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugar as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

The compounds can also be in micro-encapsulated form with one or more excipients as noted above. The solid dosage forms of tablets, dragees, capsules, pills and granules can be prepared with coatings and shells such as enteric coatings, release

WO 01/66136

PCT/US00/33121

controlling coatings and other coatings well known in the pharmaceutical formulating art. In such solid dosage forms the active compound may be admixed with at least one inert diluent such as sucrose, lactose or starch. Such dosage forms may also comprise, as is normal practice, additional substances other than inert diluents, e.g.,
5 tableting lubricants and other tableting aids such as magnesium stearate and microcrystalline cellulose. In the case of capsules, tablets and pills, the dosage forms may also comprise buffering agents. They may optionally contain opacifying agents and can also be of a composition that they release the active ingredient(s) only, or preferentially, in a certain part of the intestinal tract, optionally, in a delayed manner.
10 Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes.

Dosage forms for topical or transdermal administration of an inventive pharmaceutical composition include ointments, pastes, creams, lotions, gels, powders, solutions, sprays, inhalants or patches. The active component is admixed under sterile
15 conditions with a pharmaceutically acceptable carrier and any needed preservatives or buffers as may be required. Ophthalmic formulation, ear drops, eye drops are also contemplated as being within the scope of this invention.

The ointments, pastes, creams and gels may contain, in addition to an active compound of this invention, excipients such as animal and vegetable fats, oils, waxes,
20 paraffins, starch, tragacanth, cellulose derivatives, polyethylene glycols, silicones, bentonites, silicic acid, talc and zinc oxide, or mixtures thereof.

Powders and sprays can contain, in addition to the compounds of this invention, excipients such as lactose, talc, silicic acid, aluminum hydroxide, calcium silicates and polyamide powder, or mixtures of these substances. Sprays can
25 additionally contain customary propellants such as chlorofluorohydrocarbons.

Transdermal patches have the added advantage of providing controlled delivery of a compound to the body. Such dosage forms can be made by dissolving or dispensing the compound in the proper medium. Absorption enhancers can also be used to increase the flux of the compound across the skin. The rate can be controlled
30 by either providing a rate controlling membrane or by dispersing the compound in a polymer matrix or gel.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

ENCAPSULATION

In a preferred embodiment, inventive compositions comprising live microorganisms are provided in association with an encapsulation device (see, for example, U.S.S.N. 60/169,330 entitled "Controlled Delivery of Antigens" filed Dec. 6, 1999, incorporated by reference herewith). Preferred encapsulation devices are biocompatible, are stable inside the body so that microorganisms are not released until after the encapsulation device reaches its intended destination (e.g. mucosal lining of the gut, endocytosis by antigen-presenting cells (APC)). For example, preferred systems of encapsulation are stable at physiological pH and degrade at acidic pH levels comparable to those found in the digestive tract or endosomes of APCs. Particularly preferred encapsulation compositions include but are not limited to ones containing liposomes, polylactide-co-glycolide (PLGA), chitosan, synthetic biodegradable polymers, environmentally responsive hydrogels, and gelatin PLGA nanoparticles. Inventive compositions may be encapsulated in combination with one or more adjuvants, targeting entities, or other agents including, for example, pharmaceutical carriers, diluents, excipients, oils, etc. Alternatively or additionally the encapsulation device itself may be associated with a targeting entity and/or an adjuvant.

Methods of encapsulating live cells are known and may also be used in accordance with the present invention for delivering antigen-secreting microorganisms to individuals. The following references are provided as examples of encapsulation of live cells. However, any method of encapsulating live cells may be used in the present invention. US Patent 5,084,350; US Patent 4,680,174; and US Patent 4,352,883 (all of which are incorporated herein by reference) describe the encapsulation of a prokaryotic or eukaryotic cell or cell culture in microcapsules. Briefly, US Patent 5,084,350; 4,680,174; and 4,352,883 disclose that a tissue sample, cell, or cell culture to be encapsulated is first prepared in finely divided form in accordance with well-known techniques and suspended in an aqueous medium suitable for maintenance and for supporting the ongoing metabolic processes of the particular cells involved. Media suitable for this purpose generally are available commercially. Thereafter, a water-soluble substance which is physiologically compatible with the cells and which can be rendered water-insoluble to form a

WO 01/66136

PCT/US00/33121

shape-retaining coherent spheroidal mass or other shape is added to the medium. The solution is then formed into droplets containing cells together with their maintenance or growth medium and is immediately rendered water-insoluble and gelled to form shape-retaining, typically spheroidal coherent masses.

5 The material used to induce gelation of the culture medium may be any non-toxic water-soluble material which, by a change in the surrounding temperature, pH, ionic environment, or concentration, can be converted to shape-retaining masses. Preferably, the material also is one which comprises plural, easily ionized groups, e.g., carboxyl or amino groups, which can react by salt formation with polymers
10 containing plural groups which ionize to form species of the opposite charge. Use of this type of material enables the deposition of a membrane of a selected porosity range without damage to the labile cells. The presently preferred materials for forming the gelled masses are water-soluble natural or synthetic polysaccharides. Many such commercially available materials are typically extracted from vegetable
15 matter and are often used as additives in various foods. Sodium alginate is the presently preferred water-soluble polysaccharide. Other usable materials include acidic fractions of guar gum, gum arabic, carrageenan, pectin, tragacanth gum or xanthan gums. These materials may be gelled when multivalent ions are exchanged for the acidic hydrogen or alkali metal ion normally associated with the carboxyl
20 groups.

USES

The compositions of the present invention may be employed to treat or prevent allergic reactions in a subject. Subjects are animal and human patients in need of
25 treatment for allergies. Preferably, the animal is a domesticated mammal (e.g., a dog, a cat, a horse, a sheep, a pig, a goat, a cow, etc). Animals also include laboratory animals such as mice, rats, hamsters, monkeys, and rabbits. Any individual who suffers from allergy, or who is susceptible to allergy, may be treated. It will be appreciated that an individual can be considered susceptible to allergy without having
30 suffered an allergic reaction to the particular antigen in question. For example, if the individual has suffered an allergic reaction to a related antigen (e.g., one from the same source or one for which shared allergies are common), that individual will be

WO 01/66136

PCT/US00/33121

considered susceptible to allergy to the relevant antigen. Similarly, if members of an individual's family are allergic to a particular antigen, the individual may be considered to be susceptible to allergy to that antigen. More preferably, any individual who is susceptible to anaphylactic shock upon exposure to food allergens, venom allergens or rubber allergens may be treated according to the present invention.

The compositions of the present invention may be formulated for delivery by any route. Preferably, the compositions are formulated for injection, ingestion, or inhalation.

Modifications and variations of the methods and compositions described herein are intended to be within the scope of the following claims.

Other Embodiments

Those of ordinary skill in the art will readily appreciate that the foregoing represents merely certain preferred embodiments of the invention. Various changes and modifications to the procedures and compositions described above can be made without departing from the spirit or scope of the present invention, as set forth in the following claims.

Examples

Material and Methods

For general methods used to express proteins in microorganisms see Ausubel et al. (supra) and Sambrook et al. (supra) both of which are incorporated herein by reference. In addition, expression vectors for use in the present invention are widely available from commercial sources (see for example, Clontech, Palo Alto, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega Corporation, Madison, WI; New England Biolabs, Beverly, MA).

The following experiments describe the encapsulation of allergens in bacteria for use as a delivery vehicle and/or adjuvant in immunotherapy in accordance with the teachings of the present invention. Recombinant peanut allergen proteins (Ara h 1,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Ara h 2, and Ara h 3; Burks et al. *J Allergy Clin Immunol.* 88(2):172-9, 1991; Burks et al. *J Allergy Clin Immunol.* 90(6 Pt 1):962-9, 1992; Rabjohn et al. *J Clin Invest.* 103(4):535-42, 1999; incorporated herein by reference) were produced in *E. coli* BL21 cells by transforming the bacterial cells with cDNA clones encoding the proteins (see Appendix B; sequences cloned into pET24, Novagen, Madison, WI). The transformed cells were then injected into C3H/HEJ mice to determine if the allergen-expressing *E. coli* elicited an immune response.

Example 1. Methods of killing allergen-producing *E. coli*

Several methods of killing allergen-producing *E. coli* were tested. Preferably, the method of killing bacteria does not denature or proteolyze the recombinant allergen(s) produced by the bacteria. As non-limiting examples, *E. coli* were killed by heat (at temperatures ranging from 37 °C to 95 °C), by using ethanol (0.1% to 10%), and by using solutions containing iodine (0.1% to 10%). Survival was determined by plating 100 µl of cells onto the appropriate agar plates, and subsequently counting the resulting colonies. The most reproducible method was heat killing. Therefore, the preferred method of killing allergen-producing *E. coli* is to incubate the cells at 60 °C for 20 minutes which results in 100% death (i.e. no colonies formed; see Figure #).

Example 2. Growth of Bacteria.

The following protocol was developed for the preparation of allergen-producing *E. coli* cells for inoculation of mice.

DAY 1

Five milliliters (ml) of liquid cultures of LB (Luria-Bertani broth) containing kanamycin (30 micrograms/ml per each cell line used) were prepared in 50 ml sterile tubes or flasks. Cultures were inoculated with approximately 10 microliters from a frozen stock of the desired bacterial cell line containing the desired expression vectors. The inoculated cultures were incubated with shaking overnight at 37 °C.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

DAY 2

The following morning, 100 ml of liquid LB (500 ml Erlenmeyer flask) containing kanamycin (30 micrograms/ml) were inoculated using a 1 ml aliquot from the 5 ml culture grown from the previous day. (The remaining 4 mls of culture were frozen. Optionally, the remaining 4 milliliters of culture can be stored at 4 °C for several weeks for inoculating subsequent cultures) The inoculated cultures were incubate with shaking at 37 °C until the optical density of the solution measured at 600 nM (OD₆₀₀) reached approximately 0.6 to 0.9.

10 DAY 3

To induce production of recombinant proteins, the cultures from the previous day were induced by adding isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) from a 1 M stock to a final concentration of 1 mM (100 microliters of 1 M IPTG per 100 mls of culture) when the OD₆₀₀ of the culture reached approximately 0.6-0.9. The induced cultures were incubated overnight.

DAY 4

1.4 ml of culture from the previous day were aliquoted into each of five 1.5 ml microfuge tubes for each culture and heat killed at 60°C in a water bath for 20 minutes. The tubes were centrifuged at 16,000 x g for 5 minutes at room temperature and the supernatant discarded. The pellets were washed with 1X phosphate buffer saline (PBS) and centrifuged at 16,000 x g for 5 minutes at room temperature. Again, the supernatant was discarded and the pellets were resuspended in 250 microliters of 1X PBS. The resuspended pellets from the same original samples were combined.

25 The OD₆₀₀ were determined for each sample and diluted to the desired OD₆₀₀ using 1X PBS.

Example 3. Production and release of allergen.

30 *Release of allergen by heat-killed bacteria*

WO 01/66136

PCT/US00/33121

In order to determine if the cells remained intact after heat-killing we measured the amount of allergen released into the media. A dot-blot assay was developed that utilized as controls, purified recombinant allergens applied to a filter at known concentrations and serum IgE from peanut sensitive patients. The assay detected and quantified the amount of allergen present in 100 microliters of supernatant after pelleting heat-killed bacteria. The level of allergen released varied and was dependent on the expression vector and protein tested. In general, more Ara h 2 was released than Ara h 1 and Ara h 3 (Ara h 2>>Ara h 1>Ara h 3).

10 *Production of allergen.*

In order to measure amounts of allergen in *E. coli*, we developed an immunoblot assay that utilizes a six histidine tag (HIS tag) that is present on all of our purified recombinant allergens and a HIS tag antibody to build a standard curve that could then be used to estimate amounts of allergen produced. The amount of allergen produced on a per cell basis varied depending on which clone was tested. In general, more Ara h 3 was produced than Ara h 2 and Ara h 1 (Ara h 3>Ara h 2>>Ara h 1).

Our best estimates for amounts of allergen delivered in 100 μ l of a 2.0 O.D. inoculum of *E. coli* varies from about 1 μ g of Ara h 1 to about 20 μ g of Ara h 3.

Figure 2 is an example of a standard curve generated for Ara h 2. The optical density (O.D.) of the HIS-tagged Ara h 2 allergen is then determined from an immunoblot where different concentrations of *E. coli* extract has been electrophoresed on SDS-PAGE gels. The allergen O.D. is then used to estimate the amount of protein produced by that extract.

25

Example 4. Immune response of mice.

The following protocol was utilized to determine the immune response of mice injected with allergen-producing bacteria. Blood was collected from the tail vein of each mouse used before the first injection. Enough blood was collected for antibody ELISA for each allergen and *E. coli* proteins. On Day Zero each mouse was injected with 100 microliters of the killed *E. coli* samples subcutaneously in the left

WO 01/66136

PCT/US00/33121

hind flank. The mice were injected for the second time on Day 14 using the same procedure as Day Zero. On Day 21, a second blood sample was collected from each mouse. Blood samples at Day 0 and Day 21 were assayed for IgG1 and IgG2a antibodies to either Ara h 1, Ara h 2, or Ara h 3 by an ELISA assay.

5

Mice injected with *E. coli* producing Ara h 1 did not give detectable levels of any immunoglobulin to the Ara h 1 allergen and therefore, that data are not shown. Without limitation to theory, we speculate that this may be due to the relatively small amounts of Ara h 1 produced by these cells (see previous discussion). Mice injected with *E. coli* producing Ara h 2 contained relatively high levels of IgG1 and IgG2a. Again, without limitation to the cause, we speculated that this may be due to the amount of Ara h 2 released from these cells (see discussion above). Mice injected with *E. coli* producing Ara h 3 contained relatively high levels of IgG2a (indicative of a Th1-type response) and elicited relatively low levels of IgG1 (indicative of a Th2-type response).

10
15

Interpretation of results

The present data should be cautiously interpreted. The data in the Figures only represent O.D. levels and do not represent absolute amounts of immunoglobulin. Therefore comparisons between groups should take into consideration the data presented as O.D. However, the general trend suggests that for example, more mice exhibited an IgG2a response to Ara h 3 than mice that exhibit an IgG1 response to Ara h 3.

20

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Appendix A

ALLERGEN SOURCE	SYSTEMATIC AND ORIGINAL NAMES	MW kDa	SEQ	ACCESSION NO. OR REFERENCES
WEED POLLENS				
<i>Asterales</i>				
Ambrosia artemisiifolia (short ragweed)	Amb a 1; antigen E	38	C	8,20
	Amb a 2; antigen K	38	C	8,21
	Amb a 3; Ra3	11	C	22
	Amb a 5; Ra5	5	C	11,23
	Amb a 6; Ra6	10	C	24,25
	Amb a 7; Ra7	12	P	26
	Amb a ?	11	C	27
Ambrosia trifida (giant ragweed)	Amb t 5; Ra5G	4.4	C	9,10,28
Artemisia vulgaris (mugwort)	Art v 1	27-29	C	28A
	Art v 2	35	P	29
Helianthus annuus (sunflower)	Hel a 1	34	-	29a
	Hel a 2; profilin	15.7	C	Y15210
Mercurialis annua	Mer a 1; profilin	14-15	C	Y13271
GRASS POLLENS				
<i>Poales</i>				
Cynodon dactylon (Bermuda grass)	Cyn d 1	32	C	30,S83343
	Cyn d 7		C	31,X91256
	Cyn d 12; profilin	14	C	31a,Y08390
Dactylis glomerata (orchard grass)	Dac g 1; AgDg1	32	P	32
	Dac g 2	11	C	33,S45354
	Dac g 3		C	33a,U25343
	Dac g 5	31	P	34
Holcus lanatus (velvet grass)	Hol l 1		C	Z27064,Z68893
Lolium perenne (rye grass)	Lol p 1; group I	27	C	35,36
	Lol p 2; group II	11	C	37,37a,X73363
	Lol p 3; group III	11	C	38
	Lol p 5; Lol p IX,	31/35		34,39
	Lol p Ib			
	Lol p 11; trypsin inh. Related	16		39a
Phalaris aquatica (canary grass)	Pha a 1		C	40,S80654
Phleum pratense (timothy grass)	Phl p 1	27	C	X78813
	Phl p 2		C	41,X75925
	Phl p 4		P	41A
	Phl p 5; Ag25	32	C	42
	Phl p 6		C	43,Z27082
	Phl p 12; profilin		C	44,X77583
	Phl p 13; polygalacturonase	55-60	C	AJ238848
Poa pratensis (Kentucky blue grass)	Poa p 1; group I	33	P	46
	Poa p 5	31/34	C	34,47

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Sorghum halepense (Johnson grass)	Sor h 1		C	48
TREE POLLENS				
<i>Fagales</i>				
Alnus glutinosa (alder)	Aln g 1	17	C	S50892
Betula verrucosa (birch)	Bet v 1	17	C	see list of isoallergens
	Bet v 2; profilin	15	C	M65179
	Bet v 3	8	C	X79267
	Bet v 4		C	X87153/S54819
	Bet v 5; isoflavone reductase homologue	33.5	C	AF135127
	Bet v 7; cyclophilin	18	C	P P81531
Carpinus betulus (hornbeam)	Car b 1	17	C	51
Castanea sativa (chestnut)	Cas s 1; Bet v 1 homologue Cas s5; chitinase	22	P	52
Corylus avellana (hazel)	Cor a 1	17	C	53
Quercus alba (white oak)	Que a 1	17	P	54
Cryptomeria japonica (sugi)	Cry j 1	41-45	C	55,56
	Cry j 2		C	57,D29772
Juniperus ashei (mountain cedar)	Jun a 1	43	P	P81294
	Jun a 3	30	P	P81295
Juniperus oxycedrus (prickly juniper)	Jun o 2; calmodulin-like	29	C	AF031471
Juniperus sabinoides (mountain cedar)	Jun s 1	50	P	58
Juniperus virginiana (eastern red cedar)	Jun v 1	43	P	P81825
<i>Oleales</i>				
Fraxinus excelsior (ash)	Fra e 1	20	P	58A
Ligustrum vulgare (privet)	Lig v 1	20	P	58A
Olea europea (olive)	Ole e 1;	16	C	59,60
	Ole e 2; profilin	15-18	C	60A
	Ole e 3;	9.2		60B
	Ole e 4;	32	P	P80741
	Ole e 5; superoxide dismutase	16	P	P80740
	Ole e 6;	10	C	U86342
Syringa vulgaris (lilac)	Syr v 1	20	P	58A
MITES				
Acarus siro (mite)	Aca s 13; fatty acid-bind.prot.	14*	C	AJ006774

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Blomia tropicalis (mite)	Blo t 5; Blo t 12; Bt11a Blo t 13; Bt6 fatty acid-binding prot		C C C	U59102 U27479 U58106
Dermatophagoides pteronyssinus (mite)	Der p 1; antigen P1 Der p 2; Der p 3; trypsin Der p 4; amylase Der p 5; Der p 6; chymotrypsin Der p 7; Der p 8; glutathione transferase Der p 9; collagenolytic serine prot. Der p 10; tropomyosin Der p 14; apolipophorin like p	25 14 28/30 60 14 25 22-28 36	C C C C P C C P C C	61 62 63 64 65 66 67 67A 67B Y14906 Epton p.c.
Dermatophagoides microceras (mite)	Der m 1;	25	P	68
Dermatophagoides farinae (mite)	Der f 1; Der f 2; Der f 3; Der f 10; tropomyosin Der f 11; paranyosin Der f 14; Mag3, apolipophorin	25 14 30 98 C	C C C C C	69 70,71 63 72 72a D17686
Euroglyphus maynei (mite)	Eur m 14; apolipophorin	177	C	AF149827
Lepidoglyphus destructor (storage mite)	Lep d 2.0101; Lep d 2.0102;	15 15	C C	73,74,75 75
ANIMALS				
Bos domesticus (domestic cattle) (see also foods)	Bos d 2; Ag3, lipocalin Bos d 4; alpha-lactalbumin Bos d 5; beta-lactoglobulin Bos d 6; serum albumin Bos d 7; immunoglobulin Bos d 8; caseins	20 14.2 18.3 67 160 20-30	C C C C C	76, L42867 M18780 X14712 M73993 77 77
Canis familiaris (Canis domesticus (dog))	Can f 1; Can f 2; Can f 3; albumin	25 27 C	C C C	78,79 78,79 S72946
Equus caballus (domestic horse)	Equ e 1; lipocalin Equ e 2; lipocalin	25 18.5	C P	U70823 79A, 79B
Felis domesticus (cat saliva)	Fel d 1; cat-1	38	C	15
Mus musculus (mouse urine)	Mus m 1; MUP	19	C	80,81
Rattus norvegicus (rat urine)	Rat n 1	17	C	82,83
FUNGI				
Ascomycota				
Dothidiales				
Alternaria alternata	Alt a 1; Alt a 2; Alt a 3; heat shock protein	28 25 70	C C C	U82633 U87807, U87808 X78222,

WO 01/66136

PCT/US00/33121

	Alt a 6; ribosomal protein	11	C	U87806
	Alt a 7; YCP4 protein	22	C	X78225
	Alt a 10; aldehyde dehydrogenase	53	C	X78227, P42041
	Alt a 11; enolase	45	C	U82437
	Alt a 12; acid. ribosomal prot P1	11	C	X84216
Cladosporium herbarum	Cla h 1;	13		83a, 83b
	Cla h 2;	23		83a, 83b
	Cla h 3; aldehyde dehydrogenase	53	C	X78228
	Cla h 4; ribosomal protein	11	C	X78223
	Cla h 5; YCP4 protein	22	C	X78224
	Cla h 6; enolase	46	C	X78226
	Cla h 12; acid. ribosomal prot P1	11	C	X85180
Eurotiales				
	Asp fl 13; alkaline serine proteinase	34		84
Aspergillus Fumigatus	Asp f 1;	18	C	83781, S39330
	Asp f 2;	37	C	U56938
	Asp f 3; peroxisomal protein	19	C	U20722
	Asp f 4;	30	C	AJ001732
	Asp f 5; metalloprotease	42	C	Z30424
	Asp f 6; Mn superoxide dismutase	26.5	C	U53561
	Asp f 7;	12	C	AJ223315
	Asp f 8; ribosomal protein P2	11	C	AJ224333
	Asp f 9;	34	C	AJ223327
	Asp f 10; aspartic protease	34		X85092
	Asp f 11; peptidyl-prolyl isom	24		84a
	Asp f 12; heat shock prot. P70	65	C	U92465
	Asp f 13; alkaline serine proteinase	34		84b
	Asp f 15;	16	C	AJ002026
	Asp f 16;	43	C	g3643813
	Asp f 17;	34	C	AJ224865
	Asp f 18; vacuolar serine	90		84c
Aspergillus niger	Asp f ?;	55	P	85
	Asp f ?;		P	86
	Asp n 14; beta-xylosidase	105	C	AF108944
Aspergillus oryzae	Asp n 18; vacuolar serine proteinase	34	C	84b
	Asp n ?;	85	C	Z84377
	Asp o 2; TAKA-amylase A	53	C	D00434, M33218
Aspergillus brevicompactum	Asp o 13; alkaline serine proteinase	34	C	X17561
	Pen b 13; alkaline serine Proteinase	33		86a
Penicillium citrinum	Pen c 1; heat shock protein P70	70	C	U64207
	Pen c 3; peroxisomal membrane protein			86b
	Pen c 13; alkaline serine proteinase	33		86a
Penicillium notatum	Pen n 1; N-acetyl glucosaminidase	68		87
	Pen n 13; alkaline serine proteinase	34		89
	Pen n 18; vacuolar serine proteinase	32		89
Penicillium oxalicum	Pen o 18; vacuolar serine proteinase	34		89

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Onygenales				
Trichophyton rubrum	Tri r 2; Tri r 4; serine protease		C C	90 90
Trichophyton tonsurans	Tri t 1; Tri t 4; serine protease	30 83	P C	91 90
Saccharomycetales				
Candida albicans	Cand a 1	40	C	88
Candida boidinii	Cand b 2	20	C	J04984, J04985
Basidiomycota				
Basidiolaelastomycetes				
Malassezia furfur	Mal f 1;			91a
	Mal f 2; MF1 peroxisomal membrane protein	21	C	AB011804
	Mal f 3; MF2 peroxisomal membrane protein	20	C	AB011805
	Mal f 4;	35	C	Takesako, p.c.
	Mal f 5;	18*	C	AJ011955
	Mal f 6; cyclophilin homologue	17*	C	AJ011956
Basidiomycetes				
Psilocybe cubensis	Psi c 1;	16		91b
	Psi c 2; cyclophilin			
Coprinus comatus (shaggy cap)	Cop c 1;	11	C	AJ132235
	Cop c 2;			
	Cop c 3;			Brander, p.c.
	Cop c 5;			Brander, p.c.
	Cop c 7;			Brander, p.c.
INSECTS				
Aedes aegyptii (mosquito)	Aed a 1; apyrase	68	C	L12389
	Aed a 2;	37	C	M33157
Apis mellifera (honey bee)	Api m 1; phospholipase A2	16	C	92
	Api m 2; hyaluronidase	44	C	93
	Api m 4; melittin	3	C	94
	Api m 6;	7-8	P	Kettner, p.c.
Bombus pennsylvanicus (bumble bee)	Bom p 1; phospholipase	16	P	95
	Bom p 4; protease		P	95
Blattella germanica (German cockroach)	Bla g 1; B490k		C	96
	Bla g 2; aspartic protease	36	C	
	Bla g 4; calyculin	21	C	97
	Bla g 5; glutathione transf.	22	C	98
	Bla g 6; troponin C	27	C	98
Periplaneta americana (American cockroach)	Per a 1; Cr-P11	72-78	C	98A
	Per a 3; Cr-P1		C	
	Per a 7; tropomyosin	37	C	Y14854
Chironomus thummi thummi (midges)	Chi t 1-9; hemoglobin	16	C	99
	Chi t 1.01; component III	16	C	P02229
	Chi t 1.02; component IV	16	C	P02230
	Chi t 2.0101; component I	16	C	P02221
	Chi t 2.0102; component IA	16	C	P02221

WO 01/66136

PCT/US00/33121

	Chi t 3; component II-beta	16	C	P02222
	Chi t 4; component IIIA	16	C	P02231
	Chi t 5; component VI	16	C	P02224
	Chi t 6.01; component VIIA	16	C	P02226
	Chi t 6.02; component IX	16	C	P02223
	Chi t 7; component VIIIB	16	C	P02225
	Chi t 8; component VIII	16	C	P02227
	Chi t 9; component X	16	C	P02228
Dolichovespula maculata (white face hornet)	Dol m 1; phospholipase A1	35	C	100
	Dol m 2; hyaluronidase	44	C	101
	Dol m 5; antigen 5	23	C	102,103
Dolichovespula arenaria (yellow hornet)	Dol a 5; antigen 5	23	C	104
Polistes annularis (wasp)	Pol a 1; phospholipase A1	35	P	105
	Pol a 2; hyaluronidase	44	P	105
	Pol a 5; antigen 5	23	C	104
Polistes dominulus (Mediterranean paper wasp)	Pol d 1; Pol d 4; serine protease Pol d 5;	32-34	C	DR Hoffman DR Hoffman P81656
Polistes exclamans (wasp)	Pol e 1; phospholipase A1	34	P	107
	Pol e 5; antigen 5	23	C	104
Polistes fuscatus (wasp)	Pol f 5; antigen 5	23	C	106
Polistes metricus (wasp)	Pol m 5; antigen 5	23	P	106
Vespa crabro (European hornet)	Vesp c 1; phospholipase	34	P	107
	Vesp c 5.0101; antigen 5	23	C	106
	Vesp c 5.0102; antigen 5	23	C	106
Vespa mandarina (giant asian hornet)	Vesp m 1.01; Vesp m 1.02; Vesp m 5;			DR Hoffman DR Hoffman P81657
Vespula flavopilosa (yellowjacket)	Ves f 5; antigen 5	23	C	106
Vespula germanica (yellowjacket)	Ves g 5; antigen 5	23	C	106
Vespula maculifrons (yellowjacket)	Ves m 1; phospholipase A1	33.5	C	108
	Ves m 2; hyaluronidase	44	P	109
	Ves m 5; antigen 5	23	23	104
Vespula pennsylvanica (yellowjacket)	Ves p 5; antigen 5	23	C	106
Vespula squamosa (yellowjacket)	Ves s 5; antigen 5	23	C	106
Vespula vidua (wasp)	Ves vi 5;	23	C	106
Vespula vulgaris (yellowjacket)	Ves v 1; phospholipase A1	35	C	105A
	Ves v 2; hyaluronidase	44	P	105A
	Ves v 5; antigen 5	23	C	104
Myrmecia pilosula (Australian jumper)	Myr p 1;		C	X70256

WO 01/66136

PCT/US00/33121

ant)	Myr p 2;		C	S81785
Solenopsis geminata (tropical fire ant)	Sol g 2; Sol g 4			DR Hoffman DR Hoffman
Solenopsis invicta (fire ant)	Sol i 2; Sol i 3; Soli 4;	13 24 13	C C C	110,111 110 110
Solenopsis saevissima (brazilian fire ant)	Sols 2;			DR Hoffman
FOODS				
Gadus callarias (cod)	Gad c 1; allergen M	12	C	112,113
Salmo salar (Atlantic salmon)	Sals 1; parvalbumin	12	C	X97824,X97825
Bos domesticus (domestic cattle)	Bos d 4; alpha-lactalbumin Bos d 5; beta-lactoglobulin Bos d 6; serum albumin Bos d 7; immunoglobulin Bos d 8; caseins	14.2 18.3 67 160 20-30	C C C C C	M18780 X14712 M73993 77 77
Gallus domesticus (chicken)	Gal d 1; ovomucoid Gal d 2; ovalbumin Gal d 3; conalbumin (Ag22) Gal d 4; lysozyme Gal d 5; serum albumin	28 44 78 14 69	C C C C C	114,115 114,115 114,115 114,115 X60688
Metapenaeus ensis (shrimp)	Met e 1; tropomyosin		C	U08008
Penaeus aztecus (shrimp)	Pen a 1; tropomyosin	36	P	116
Penaeus indicus (shrimp)	Pen i 1; tropomyosin	34	C	117
Todarodes pacificus (squid)	Tod p 1; tropomyosin	38	P	117A
Haliotis Midas (abalone)	Hal m 1	49	-	117B
Apium graveolens (celery)	Api g 1; Bet v 1 homologue Api g 4; profilin Api g 5;	16* 55/58	C P	Z48967 AF129423 P81943
Brassica juncea (oriental mustard)	Bra j 1; 2S albumin	14	C	118
Brassica rapa (turnip)	Bra r 2; probevein-like protein	25	?	P81729
Hordeum vulgare (barley)	Hor v 1; BMAL-1	15	C	119
Zea mays (maize, corn)	Zea m 14; lipid transfer prot.	9	P	P19656
Corylus avellana (hazelnut)	Cor a 1.0401; Bet v 1 homologue	17	C	AF136945
Malus domestica (apple)	Mal d 1; Bet v 1 homologue Mal d 3; lipid transfer protein	9	C C	X83672 Pastorello
Pyrus communis	Pyr c 1; Bet v 1 homologue	18	C	AF05730

WO 01/66136

PCT/US00/33121

(pear)	Pyr c 4; profilin Pyr c 5; isoflavone reductase homologue	14 33.5	C C	AF129424 AF071477
Oryza sativa (rice)	Ory s 1;		C	U31771
Persea americana (avocado)	Pers a 1; endochitinase	32	C	Z78202
Prunus armeniaca (apricot)	Pru ar 1; Bet v 1 homologue Pru ar 3; lipid transfer protein	9	C P	U93165
Prunus avium (sweet cherry)	Pru av 1; Bet v 1 homologue Pru av 2; thaumatin homologue Pru av 4; profilin	15	C C C	U66076 U32440 AF129425
Prunus persica (peach)	Pru p 3; lipid transfer protein	10	P	P81402
Sinapis alba (yellow mustard)	Sin a 1; 2S albumin	14	C	I20
Glycine max (soybean)	Gly m 1.0101; HPS Gly m 1.0102; HPS Gly m 2 Gly m 3; profilin	7.5 7 8 14	P P P C	I21 I21 A57106 AJ223982
Arachis hypogaea (peanut)	Ara h 1; vicilin Ara h 2; conglutin Ara h 3; glycinin Ara h 4; glycinin Ara h 5; profilin Ara h 6; conglutin homolog Ara h 7; conglutin homolog	63.5 17 14 37 15 15 15	C C C C C C C	L34402 L77197 AF093541 AF086821 AF059616 AF092846 AF091737
Actinidia chinensis (kiwi)	Act c 1; cysteine protease	30	P	P00785
Solanum tuberosum (potato)	Sol t 1; patatin	43	P	P15476
Bertholletia excelsa (Brazil nut)	Ber e 1; 2S albumin	9	C	P04403; M17146
Juglans regia (English walnut)	Jug r 1; 2S albumin Jug r 2; vicilin	44	C C	U66866 AF066055
Ricinus communis (Castor bean)	Ric c 1; 2S albumin		C	P01089
OTHERS				
Anisakis simplex (nematode)	Ani s 1 Ani s 2; paramyosin	24 97	P C	A59069 AF173004
Ascaris suum (worm)	Asc s 1;	10	P	I22
Aedes aegyptii (mosquito)	Aed a 1; apyrase Aed a 2;	68 37	C C	L12389 M33157
Hevea brasiliensis (rubber)	Hev b 1; elongation factor Hev b 2; (1,3-glucanase Hev b 2; (1,3-glucanase Hev b 3 Hev b 4; component of microbhelix protein complex	58 58 34/36 24 100/110/115	P P C P P	123,124 123,124 125 126,127 128

WO 01/66136

PCT/US00/33121

	Hev b 5	16	C	U42640
	Hev b 6.01 hevein precursor	20	C	M36986/p02877
	Hev b 6.02 hevein	5	C	M36986/p02877
	Hev b 6.03 C-terminal fragment	14	C	M36986/p02877 U80598
	Hev b 7; patatin homologue	46	C	Y15042
	Hev b 8; profilin	14	C	AJ132580/AJ1 32581
	Hev b 9; enolase	51	C	AJ249148
	Hev b 10; Mn-superoxide dismut	26	C	
Ctenocephalides felis felis (cat flea)	Cte f 1; Cte f 2; M1b	27	C	AF231352
Homo sapiens (human autoallergens)	Hom s 1; Hom s 2; Hom s 3; Hom s 4; Hom s 5;	73* 10.3* 20.1* 36* 42.6*	C C C C C	Y14314 X80909 X89985 Y17711 P02538

1. Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an allergen database. ILIS, Baltimore, MD, Edition 1.0.
2. Marsh, D.G., L. Goodfriend, T.P. King, H. Lowenstein, and T.A.E. Platts-Mills. 1986. Allergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.
3. King, T.P., P.S. Norman, and J.T. Cornell. 1964. Isolation and characterization of allergen from ragweed pollen. II. Biochemistry 3:458-468.
4. Lowenstein, H. 1980. Timothy pollen allergens. Allergy 35:188-191.
5. Aukrust, L. 1980. Purification of allergens in *Cladosporium herbarum*. Allergy 35:206-207.
6. Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark, and P.E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics 54:61-75.
7. Bodmer, J.G., E.D. Albert, W.F. Bodmer, B. Dupont, H.A. Erlich, B. Mach, S.G.E. Marsh, W.R. Mayr, P. Parham, T. Sasaki, G.M. Th. Schroeder, J.L. Strominger, A. Svegaard, and P.I. Terasaki. 1991. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. Immunogenetics 33:301-309.
8. Griffith, I.J., J. Pollock, D.G. Klapper, B.L. Rogers, and A.K. Nault. 1991. Sequence polymorphism of Amb a 1 and Amb a 11, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
9. Roebber, M., D.G. Klapper, L. Goodfriend, W.B. Bias, S.H. Hsu, and D.G. Marsh. 1985. Immunochromatological and genetic studies of Amb t V (RaSG), an RaS homologue from giant ragweed pollen. J. Immunol. 134:3062-3069.
10. Metzler, W.J., K. Valentine, M. Roebber, M. Friedrichs, D.G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Solution structures of ragweed allergen Amb t V. Biochemistry 31:5117-5127.
11. Metzler, W.J., K. Valentine, M. Roebber, D.G. Marsh, and L. Mueller. 1992. Proton resonance assignments and three-dimensional solution structure of the ragweed allergen Amb a V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry 31:8697-8705.
12. Goodfriend, L., A.M. Choudhury, J. Del Carpio, and T.P. King. 1979. Cytochromes C: New ragweed pollen allergens. Fed. Proc. 38:1415.
13. Ekramoddoullah, A.K.M., F.T. Kistil, and A.H. Seheri. 1982. Allergic cross reactivity of cytochrome c from Kentucky bluegrass and perennial ryegrass pollens. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
14. Anari, A.A., E.A. Kiloran, and D.G. Marsh. 1987. An investigation of human response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p 5). J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
15. Morgenstern, J.P., I.J. Griffith, A.W. Brauer, B.L. Rogers, J.F. Bond, M.D. Chapman, and M. Kuo. 1991. Amino acid sequence of Fel d 1, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9690-9694.
16. Griffith, I.J., S. Craig, J. Pollock, X. Yu, J.P. Morgenstern, and B.L. Rogers. 1992. Expression and genomic structure of the genes encoding Fd1, the major allergen from the domestic cat. Gene 113:263-268.
17. Weber, A., L. Marz, and F. Altmann. 1986. Characteristics of the asparagine-linked oligosaccharide from honey-bee venom phospholipase A2. Comp. Biochem. Physiol. 83B:321-324.
18. Weber, A., H. Schroeder, K. Thalberg, and L. Marz. 1987. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. Allergy 42:464-470.
19. Stanworth, D.R., K.J. Dornington, T.E. Hugh, K. Reid, and M.W. Turner. 1990. Nomenclature for synthetic peptides representative of immunoglobulin chain sequences. Bulletin WHO 68:109-111.
20. Rafnar, T., I.J. Griffith, M.C. Kuo, J.F. Bond, B.L. Rogers, and D.G. Klapper. 1991. Cloning of Amb a 1 (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. J. Biol. Chem. 266:1229-1236.
21. Rogers, B.L., J.P. Morgenstern, I.J. Griffith, X.B. Yu, C.M. Counsell, A.W. Brauer, T.P. King, R.D. Garman, and M.C. Kuo. 1991. Complete sequence of the allergen Amb a 11: recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. J. Immunol. 147:2547-2552.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

22. Klapper, D.G., L. Goodfriend, and J.D. Capra. 1980. Amino acid sequence of ragweed allergen Ra3. *Biochemistry* 19:5729-5734.
23. Ghosh, B., M.P. Perry, T. Rafnar, and D.G. Marsh. 1993. Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Immunol.* 150:5391-5399.
24. Roebber, M., R. Hussain, D. G. Klapper, and D. G. Marsh. 1983. Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6. *J. Immunol.* 131:706-711.
25. Lubahn, B., and D.G. Klapper. 1993. Cloning and characterization of ragweed allergen Amb a VI (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.
26. Roebber, M., and D.G. Marsh. 1991. Isolation and characterization of allergen Amb a VII from short ragweed pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:324.
27. Rogers, B.L., J. Pollock, D.G. Klapper, and J.J. Griffith. 1993. Cloning, complete sequence, and recombinant expression of a novel allergen from short ragweed pollen (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
28. Goodfriend, L., A.M. Choudhury, D.G. Klapper, K.M. Coulter, G. Dorval, J. DelCarpio, and C.K. Osterland. 1985. Ra5G, a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: isolation, HLA-DR-associated activity and amino acid sequence. *Mol. Immunol.* 22:899-906.
- 28A. Breitenbach M. pers. comm.
29. Nilsen, B. M., K. Sletten, M. O'Neill, B. Smestad Paulsen, and H. van Halbeek. 1991. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris*). *J. Biol. Chem.* 266:2660-2668.
- 29A. Jimenez A, Moreno C, Martinez J, Martinez A, Bartolome B, Guerra F, Palacios R. 1994. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int Arch Allergy Immunol* 105:297-307.
30. Smith P.M., Suphioglu, C., Griffith, J., Therasaki, K., Knox, R.B. and Singh, M.B. 1996. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:331-343.
31. Suphioglu, C., Ferreira, F. and Knox, R.B. 1997. Molecular cloning and immunological characterisation of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* 402:167-172.
- 31A. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, and Palacios R. 1997. Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Exp Allergy* 27:1307-1313.
32. Mecheri, S., G. Peltre, and B. David. 1985. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: The Ag Dg I. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78:283-289.
33. Roberts, A.M., L.J. Bevan, P.S. Flora, I. Jepson, and M.R. Walker. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the Group II allergen of Cocksfoot/Orchard grass (*Dactylis glomerata*), Dac g II. *Allergy* 48:615-623.
- 33A. Guerin-Marchand, C., Senechal, H., Bouin, A.P., Leduc-Brodard, V., Taudou, G., Weyer, A., Peltre, G. and David, B. 1996. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol. Immunol.* 33:797-806.
34. Klynes, S., K. Welinder, H. Lowenstein, and F. Mathiesen. 1992. Group V allergens in grass pollen IV. Similarities in amino acid compositions and amino terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin. Exp. Allergy* 22: 491-497.
35. Perez, M., G. Y. Ishioka, L. E. Walker, and R. W. Chesnut. 1990. cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. *J. Biol. Chem.* 265:16210-16215.
36. Griffith, I. J., P. M. Smith, J. Pollock, P. Theodorakopoulou, A. Avilogh, S. Davies, T. Hough, M. B. Singh, R. J. Simpson, L. D. Ward, and R. B. Knox. 1991. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. *FEBS Letters* 279:210-215.
37. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D.G. Marsh. 1989. Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* 264:11181-11185.
- 37A. Sidali, A., Tamborini, E., Giuntoni, J., Levi, S., Volante, G., Paoletti, C., De Lalla, C., Siccardi, A.G., Baralle, F.E., Galliani, S. and Arosio, P. 1993. Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* 268:21819-21825.
38. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D. G. Marsh. 1989. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III. Comparison with known Lol p I and II sequences. *Biochemistry* 28:8665-8670.
39. Singh, M. B., T. Hough, P. Theodorakopoulou, A. Avilogh, S. Davies, P. M. Smith, P. Taylor, R. J. Simpson, L. D. Ward, J. McCluskey, R. Puy, and R. B. Knox. 1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1384-1388.
- 39A. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koelman CA, Grande M, van Leeuwen WA, Aalberse RC. 1995. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 95:970-978.
40. Suphioglu, C. and Singh, M.B. 1995. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Pha a 1 and four isoforms of Pha a 5, the major allergens of canary grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* 25:853-865.
41. Dolecek, C., Vrtala, S., Laffer, S., Steinberger, P., Kraft, D., Scheiner, O. and Valenta, R. 1993. Molecular characterization of Phi p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335:299-304.
- 41A. Fischer, S., Grosse M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. 1996. Characterization of Phi p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98:189-198.
42. Mathiesen, F., and H. Lowenstein. 1991. Group V allergens in grass pollens. I. Purification and characterization of the group V allergen from *Phleum pratense* pollen, Phi p V. *Clin. Exp. Allergy* 21:297-307.
43. Petersen, A., Bufe, A., Schramm, G., Schlaak, M. and Becker, W.M. 1995. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phi p 6). II. cDNA cloning of Phi p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55-59.
44. Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchene, M., Kraft, D. and Scheiner, O. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:106-118.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

46. Esch, R. E., and D. G. Klapper. 1989. Isolation and characterization of a major cross-reactive grass group I allergenic determinant. *Mol. Immunol.* 26:557-561.
47. Olsen, E., L. Zhang, R. D. Hill, F. T. Kissil, A. H. Schon, and S. Mohapatra. 1991. Identification and characterization of the Poa p IX group of basic allergens of Kentucky bluegrass pollen. *J. Immunol.* 147:205-211.
48. Ayjoglu, A., M. Singh, and R. B. Knox. 1993. Sequence analysis of Sec h I, the group I allergen of Johnson grass pollen and its comparison to rye-grass Lol p I (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:340.
51. Larsen, J.N., P. Ström, and H. Ipsen. 1992. PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.* 29:703-711.
52. Kos T, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F, Hirschwehr R, Ahorn H, Horak F, Jäger S, Sperr W, Kraft D, Scheiner O. 1993. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of a new major allergen from European chestnut pollen—Cas s 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 196:1086-92.
53. Breiteneder, H., F. Ferreira, K. Hoffmann-Sommergruber, C. Ehner, M. Breitenbach, H. Purnpold, D. Kraft, and O. Scheiner. 1993. Four recombinant isoforms of Cor a 1, the major allergen of hazel pollen. *Europ. J. Biochem.* 212:355-362.
54. Ipsen, H., and B.C. Hansen. 1991. The NH2-terminal amino acid sequence of the immunologically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g I, birch (*Betula verrucosa*) Bet v I, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b I and oak (*Quercus alba*) Que a I pollens. *Mol. Immunol.* 28:1279-1288.
55. Tanai, M., S. Ando, M. Usui, M. Kurimoto, M. Sakaguchi, S. Inouye, and T. Matuhasi. 1988. N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett.* 239:329-332.
56. Griffith, I.J., A. Lussier, R. Garman, R. Koury, H. Yeung, and J. Pollock. 1993. The cDNA cloning of Cry j I, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
57. Sakaguchi, M., S. Inouye, M. Tanai, S. Ando, M. Usui, and T. Matuhasi. 1990. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45:309-312.
58. Gross GN, Zimbureau JM, Capra JD 1978. Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen. *Scand J Immunol* 8:437-441.
- 58A. Obispo TM, Meiero JA, Carpizo JA, Carreira J, Lomhardero M 1993. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 23:311-316.
59. Cardaba, B., D. Hernandez, E. Martin, B. de Andres, V. del Pozo, S. Gallardo, J.C. Fernandez, R. Rodriguez, M. Villalba, P. Palomero, A. Basomba, and C. Lahoz. 1993. Antibody response to olive pollen antigens: association between HLA class II genes and IgE response to Ole e 1 (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.
60. Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otin, L.M. Sanchez, R.I. Monsalve, M.A. Gonzalez de la Pena, C. Lahoz, and R. Rodriguez. 1993. Amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen (*Olea europaea*). *Europ. J. Biochem.* 216:863-869.
- 60A. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R 1997. Cloning and expression of the paralleren profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 100:365-372.
- 60B. Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puenie XS, Rodriguez R. 1996. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 241: 772-778.
61. Chua, K. Y., G. A. Stewart, and W. R. Thomas. 1988. Sequence analysis of cDNA encoding for a major house dust mite allergen, Der p 1. *J. Exp. Med.* 167:175-182.
62. Chua, K. Y., C. R. Doyle, R. J. Simpson, K. J. Turner, G. A. Stewart, and W. R. Thomas. 1990. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:118-123.
63. Smith WA, Thomas WR. 1996. Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinace*. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 133-40.
64. Lake, F.R., L.D. Ward, R.J. Simpson, P.J. Thompson, and G.A. Stewart. 1991. House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterisation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1035-1042.
65. Tovey, E. R., M. C. Johnson, A. L. Roche, G. S. Cobon, and B. A. Baldo. 1989. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J. Exp. Med.* 170:1457-1462.
66. Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, and H. Yamakawa. 1991. Allergenic and proteolytic properties of fourth allergens from *Dermatophagoides* mites. In: "Dust Mite Allergens and Asthma. Report of the 2nd international workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium, pp. 63-64.
67. Shen, H.-D., K.-Y. Chua, K.-L. Lin, K.-H. Hsieh, and W.R. Thomas. 1993. Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin. Exp. Allergy* 23:934-40.
- 67A. O'Neil GM, Donovan GR, Baldo BA. 1994. Cloning and characterisation of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Acta*,1219:521-528.
- 67B. King C, Simpson RJ, Moritz RL, Reed GE, Thompson PJ, Stewart GA. 1996. The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J. Allergy Clin Immunol* 98:739-47.
68. Lind P, Hansen OC, Horn N. 1988. The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, Der p I of *D. pteronyssinus*. *J. Immunol.* 140:4256-4262.
69. Dilworth, R. J., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. 1991. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen Der f I. *Clin. Exp. Allergy* 21:25-32.
70. Nishiyama, C., T. Yuki, T. Takai, Y. Okumura, and H. Okudaira. 1993. Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f II. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101:159-166.
71. Trädinger, M., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. 1991. cDNA encoding the major dust mite allergen Der f II. *Clin. Exp. Allergy* 21:33-38.
72. Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Munooka Y, Oka S, Ono K. 1995. Immunochromatological characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinace*. *J Allergy Clin Immunol* 96:74-83.
73. van Hage-Hamsten, M., T. Bergman, E. Johansson, B. Persson, H. Jönvall, B. Håkansson, and S.G.O. Johansson. 1993. N-terminal amino acid sequence of major allergen of the mite *lepidoglyphus destructor* (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:353.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

74. Varela J, Vontas P, Carreira J, Barbas JA, Gimenez-Gallego G, Polo F. Primary structure of Lep d I, the main Lepidoglyphus destructor allergen. *Eur J Biochem* 225:93-98, 1994.
75. Schmidt M, van der Ploeg I, Olsson S, van Hage Hamsten M. The complete cDNA encoding the Lepidoglyphus destructor major allergen Lep d I. *FEBS Lett* 370:11-14, 1995.
- 5 76. Rautiainen J, Rytönen M, Pelkonen J, Penttinen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantylä R. BDA20, a major bovine dander allergen characterized at the sequence level is Bos d 2. Submitted.
77. Gjesting B, Løwenstein H. Immunohistochemistry of food antigens. *Ann Allergy* 53:602, 1984.
78. de Groot, H., K.G.H. Goel, P. van Swieten, and R.C. Aalberse. 1991. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract. Serologic activity of affinity-purified Can f I and Can f I-depleted extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1056-1065.
- 10 79. Koniczny, A. Personal communication; Immunologic Pharmaceutical Corp.
- 79A. Bulone, V. 1998. Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis. Molecular characterization and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins. *Eur J Biochem* 253:202-211.
- 79B. Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
- 15 80. McDonald, B., M. C. Kuo, J. L. Ohman, and L. J. Rosenwasser. 1988. A 29 amino acid peptide derived from rat alpha 2 euglobulin triggers murine allergen specific human T cells (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:251.
81. Clarke, A. J., P. M. Cissold, R. A. Shaw, P. Beattie, and J. Bishop. 1984. Structure of mouse urinary protein genes: differential splicing configurations in the 3'-non-coding region. *EMBO J* 3:1045-1052.
- 20 82. Longbottom, J. L. 1983. Characterization of allergens from the urines of experimental animals. McMillan Press, London, pp. 525-529.
83. Laperche, Y., K. R. Lynch, K. P. Dolans, and P. Feigelsen. 1983. Tissue-specific control of alpha 2u globulin gene expression: constitutive synthesis in submaxillary gland. *Cell* 32:453-460.
- 83A. Aukrust L, Borch SM. 1979. Partial purification and characterization of two Cladosporium herbarum allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60:68-79.
- 25 83B. Sward-Nordmo M, Paulsen BS, Wold JK. 1988. The glycoprotein allergen Ag-54 (Cla h II) from Cladosporium herbarum. Structural studies of the carbohydrate moiety. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:288-294.
84. Shen, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:5157, 1999.
- 84A. Crameri R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of Aspergillus fumigatus in allergic diseases. *Contrib. Microbiol.* Vol. 2, Karger, Basel (in press).
- 30 84B. Shen, et al. (manuscript submitted), 1999.
- 84C. Shen HD, Ling WL, Tan MF, Wang SF, Chou H, Han SH. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of Aspergillus fumigatus. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.
85. Kumar, A., L.V. Reddy, A. Sochanik, and V.P. Kurup. 1993. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of Aspergillus fumigatus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:1024-1030.
- 35 86. Teshima, R., H. Ikebuchi, J. Sawada, S. Miyachi, S. Kitani, M. Iwama, M. Irie, M. Ichinoe, and T. Terao. 1993. Isolation and characterization of a major allergenic component (gp55) of Aspergillus fumigatus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:698-706.
- 86A. Shen HD, Lin WL, Tsai J, Liaw SF, Han SH. 1996. Allergenic components in three different species of Penicillium: cross-reactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 26:444-451.
- 40 86B. Shen, et al. Abstract, The XVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.
87. Shen HD, Liaw SF, Lin WL, Ro LH, Yang HL, Han SH. 1995. Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of Penicillium notatum using MoAbs. *Clin Exp Allergy* 25:350-356.
88. Shen, H.D., K.B. Choo, H.H. Lee, J.C. Hsieh, and S.H. Han. 1991. The 40 kd allergen of Candida albicans is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 21:675-681.
- 45 89. Shen, et al. *Clin. Exp. Allergy* (in press), 1999.
90. Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. 1998. Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem* 273:29489-96.
91. Deuel, B., L.K. Arruda, M.L. Hayden, M.D. Chapman and T.A.E. Platts-Mills. 1991. Trichophyton tonsurans Allergen I. *J. Immunol.* 147:96-101.
- 50 91A. Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindbom L, Hellman U, Whitley P, van der Ploeg I, Harfast B, Scheynias A. 1997. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of Malassezia furfur, Mal f 1. *Eur J Biochem* 246:181-185.
- 91B. Horner WE, Reese G, Lehrer SB. 1995. Identification of the allergen Psi c 2 from the basidiomycete Psilocybe cubensis as a fungal cyclophilin. *Int Arch Allergy Immunol* 107:298-300.
- 55 92. Kuchler, K., M. Gmachl, M. J. Stipp, and G. Kreil. 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honey bee venom glands: The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184:249-254.
93. Gmachl, M., and G. Kreil. 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3569-3573.
- 60 94. Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177:314-322.
95. Jacobsen, R.S., and D.R. Hoffman. 1993. Characterization of bumblebee venom allergens (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187.
96. Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, Hayden ML, Chapman MD. Molecular cloning of a major cockroach (Blattella germanica) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 270:19563-19568, 1995.
- 65 97. Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calyculin) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 270:31196-31201, 1995.
98. Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German Cockroach (Blattella germanica) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 107:295-297, 1995.
- 70

WO 01/66136

PCT/US00/33121

- 98A. Wu CH, Lee MF, Liao SC. 1995. Isolation and preliminary characterization of cDNA encoding American cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 96: 352-9.
99. Mazur, G., X. Baur, and V. Liebers. 1990. Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monog. Allergy* 28:121-137.
100. Soldatova, L., L. Kochoumian, and T.P. King. 1993. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS Letters* 320:145-149.
101. Lu, G., L. Kochoumian and T.P. King. Whiteface hornet venom allergen hyaluronidase: cloning and its sequence similarity with other proteins (abst.). 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.
102. Fang, K. S. F., M. Vitale, P. Fehner, and T. P. King. 1988. cDNA cloning and primary structure of a white-faced hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.
103. King, T. P., D. C. Morun, D. F. Wang, L. Kochoumian, and B.T. Chait. 1990. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266.
104. Lu, G., M. Villalba, M.R. Coscia, D.R. Hoffman, and T.P. King. 1993. Sequence analysis and antigen cross reactivity of a venom allergen antigen 5 from hornets, wasps and yellowjackets. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.
105. King, T. P. and Lu, G. 1997. Unpublished data.
- 105A. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N and Soldatova L. 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600.
106. Hoffman, D.R. 1993. Allergens in hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.
107. Hoffman, D.R. 1992. Unpublished data.
108. Hoffman, D. R. 1993. The complete amino acid sequence of a yellowjacket venom phospholipase (abst.). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:387.
109. Jacobson, R.S., D.R. Hoffman, and D.M. Kemeny. 1992. The cross-reactivity between bee and vespid hyaluronidases has a structural basis (abst.). *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292.
110. Hoffman, D.R. 1993. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: The amino acid sequences of imported fire ant venom allergen Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:71-78.
111. Schmidt, M., R.B. Walker, D.R. Hoffman, and T.J. McConnell. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II. *FEBS Letters* 319:138-140.
112. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of Allergen M from cod. *Scand J Immunol* 3:683-686, 1974.
113. Elsayed S, Aue K, Sletten K, Johansson SGO. Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochimistry* 9:647-661, 1972.
114. Hoffman, D. R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71:481-486.
115. Langeland, T. 1983. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. IV. specific IgE antibodies to individual allergens in hen's egg white related to clinical and immunological parameters in egg-allergic patients. *Allergy* 38:493-500.
116. Daul, C.B., M. Slattey, J.E. Morgan, and S.B. Lehrer. 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. In: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Schon, eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 291-293.
117. K.N. Shanti, B.M. Martin, S. Nagpal, D.D. Metcalfe, P.V. Subba Rao. 1993. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* 151:5354-5363.
- 117A. M. Miyazawa, H. Fukumachi, Y. Inagaki, G. Reese, C.B. Daul, S.B. Lehrer, S. Inouye, M. Sakaguchi. 1996. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:948-953.
- 117B. A. Lopata et al. 1997. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kDa IgE binding protein (Hal-m-1) in *Abalone* (*Haliotis midiae*). *J. Allergy Clin. Immunol.* Submitted.
118. Mensalves, R.I., M.A. Gonzalez de la Pena, L. Mendez-Arias, C. Lopez-Otin, M. Villalba, and R. Rodriguez. 1993. Characterization of a new mustard allergen, Bra j II. Detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* 293:625-632.
119. Mena, M., R. Sanchez-Monge, L. Gomez, G. Salcedo, and P. Carbonero. 1992. A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Molec. Biol.* 20:451-458.
120. Mendez-Arias, L., I. Jonez, I. Dominguez, and R. Rodriguez. 1988. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *Eur. J. Biochem.* 177:159-166.
121. Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 346:48-49, 1995.
122. Christie, J. F., B. Dunbar, I. Davidson, and M. W. Kennedy. 1990. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology* 69:596-602.
123. Crumpton AB, Chen Z, Renert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 92:690-697, 1993.
124. Atanazyak DPSTG, Kekwick RGO, Franklin FCH. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 16:1079-1081.
125. Chye ML, Cheung KY. 1995. (1,3)-glucanase is highly expressed in Laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 26:397-402.
126. Aletius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Makinen-Kiljunen S, Turjanmaa K Fink J. 1993. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in Latex-allergic children with Spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 102:61-66.
127. Yeang HY, Cheong KP, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ. 1996. The 14.6 kD (REF. Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* in press.
128. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardoso MJ. 1995. Latex B-serum (-1,3)-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major Latex allergens. *J nat Rubb Res* 10:82-99.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

Claims

We claim:

1. A method of treating an allergy in a subject susceptible to an anaphylactic
5 allergic response to an allergen, the method comprising steps of:
 providing a composition comprising microorganisms that produce the
 allergen; and
 administering the composition to the subject at an effective and non-toxic
 dose.
10
2. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the microorganism is
selected from the group consisting of: bacteria, fungi, viruses, algae, and protozoa.
3. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the microorganism is
15 selected from the group consisting of: gram-negative bacteria, gram-positive bacteria,
and yeast.
4. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the microorganism is
selected from the group consisting of: *E. coli*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Vibrio*,
20 *Salmonella* and *S. cerevisiae*.
5. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is found
in foods, venoms, or latex.
- 25 6. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is a
protein found in peanuts, milk, eggs, seafood, nuts, dairy products and fruit.
7. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is a
protein found in bee venom.
30
8. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is Ara h
1, Ara h 2, Ara h 3, or a polypeptide portion thereof.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

9. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is protein modified to have a reduced ability to bind and crosslink IgE antibodies.
- 5 10. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the microorganisms produce a portion of the allergen.
11. The method of claim 10, wherein in the step of providing, the portion of the allergen produced has a reduced number of IgE binding sites as compared to the allergen.
- 10 12. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is a polypeptide and production of the allergen is inducible; and wherein after the step of administering, the method further comprises the step of inducing expression of the polypeptide.
- 15 13. The method of claim 12, wherein in the step of inducing, the polypeptide is secreted into a periplasm or secreted outside the cell.
- 20 14. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing a composition comprising gram-negative bacteria or yeast that secretes the allergen into a periplasm.
15. The method of claim 1, wherein in the step of providing, the allergen is a small molecule.
- 25 16. A composition comprising a microorganism that produces an allergen that elicits an anaphylactic allergic reaction in a subject allergic to the allergen.
- 30 17. The composition of claim 16, wherein the allergen is a polypeptide or small molecule.

WO 01/66136

PCT/US00/33121

18. The composition of claim 16, wherein the microorganism is selected from the group consisting of: bacteria, fungi, viruses, algae, and protozoa.
19. The composition of claim 16, wherein the microorganism is selected from the group consisting of: gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, and yeast.
20. The composition of claim 16, wherein the microorganism is selected from the group consisting of: *E. coli*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Vibrio*, *Salmonella* and *S. cerevisiae*.
21. The composition of claim 16, wherein the allergen found in foods, venoms, or latex.
22. The composition of claim 16, wherein the allergen is an allergen found in peanuts, milk, eggs, seafood, nuts, dairy products and fruit.
23. The composition of claim 16, wherein the allergen found in bee venom.
24. The composition of claim 16, wherein the protein is Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, or a polypeptide portion thereof.
25. The composition of claim 16, wherein the allergen is modified to have a reduced ability to bind and crosslink IgE antibodies.
26. The composition of claim 16, wherein the microorganism produces a portion of the allergen.
27. The composition of claim 16, wherein the portion of the allergen produced has a reduced number of IgE binding sites as compared to the allergen.
28. The composition of claim 16, wherein production of the allergen is inducible.

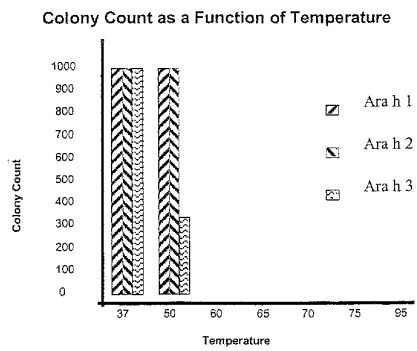
WO 01/66136

PCT/US00/33121

29. The composition of claim 16, wherein the allergen is a polypeptide which is secreted into a periplasm or secreted outside the cell.
30. The composition of claim 16, wherein the microorganism is a gram-negative
5 bacteria or yeast that secretes the allergen into a periplasm.
31. A pharmaceutical composition comprising microorganisms that produce an allergen that elicits an anaphylactic allergic response in a subject susceptible to the anaphylactic allergic response, and further comprises an pharmaceutically acceptable
10 carrier.
32. The pharmaceutical composition of claim 31, wherein the allergen is a polypeptide or a small molecule.
- 15 33. The pharmaceutical composition of claim 31, wherein the microorganisms produce a portion of an allergen that elicits an anaphylactic allergic response in a subject susceptible to the anaphylactic allergic response.

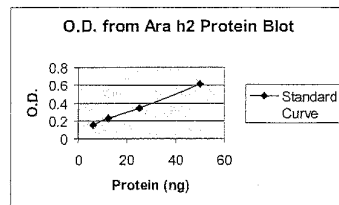
WO 01/66136

PCT/US00/33121



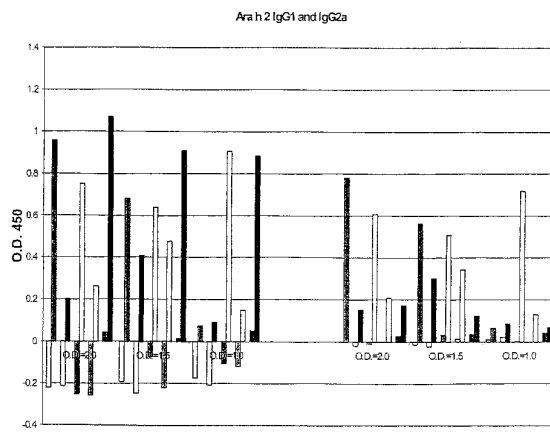
WO 01/66136

PCT/US00/33121



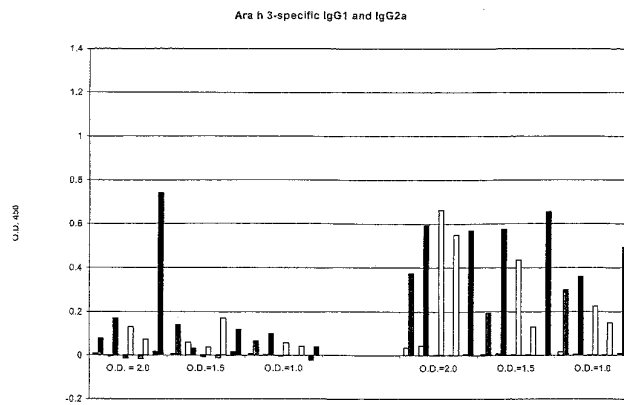
WO 01/66136

PCT/US00/33121



WO 01/66136

PCT/US00/33121



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 September 2001 (13.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/66136 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/00, 39/35, 35/66, A61P 37/08
- (21) International Application Number: PCT/US00/33121
- (22) International Filing Date: 6 December 2000 (06.12.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/195,035 6 April 2000 (06.04.2000) US
09/731,375 6 December 2000 (06.12.2000) US
- (71) Applicant: PANACEA PHARMACEUTICALS, LLC.
[US/US]; 640 Sasco Hill Road, Fairfield, CT 06430-2038 (US).
- (72) Inventor: CAPLAN, Michael; 1217 Racebrook Road, Woodbridge, CT 06525 (US).
- (74) Agent: MAH, Stanley, C.; Choate, Hall & Stewart, 53 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— upon request of the applicant, before the expiration of the time limit referred to in Article 21(2)(a)
- (88) Date of publication of the international search report: 27 December 2001
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/66136 A3

(54) Title: MICROBIAL DELIVERY SYSTEM

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for treating or preventing allergic responses, particularly anaphylactic allergic responses, in subjects who are allergic to allergens or susceptible to allergies. Methods of the present invention utilize administration of microorganisms to subjects, where the microorganisms produce allergens and protect the subjects from exposure to the allergens until phagocytosed by antigen-presenting cells. Particularly preferred microorganisms are gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, and yeast. Particularly preferred allergens are proteins found in foods, venoms, drugs and latex that elicit allergic reactions and anaphylactic allergic reactions in individuals who are allergic to the proteins or are susceptible to allergies to the proteins. The proteins may also be modified to reduce the ability of the proteins to bind and crosslink IgE antibodies and thereby reduce the risk of eliciting anaphylaxis without affecting T-cell mediated Th1-type immunity.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No. PCT/US 00/33121
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 A61K39/35 A61K35/66 A61P37/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 25387 A (CURTISS ROY III ;UNIV WASHINGTON (US); NICKERSON CHERYL A (US)) 27 May 1999 (1999-05-27) page 26, line 10 -page 27, line 28; claims 1-23	1-7,10, 14-23, 26,28-33
Y		8,9, 11-13, 24,25,27
X	US 5 888 799 A (GURTISS III ROY) 14 February 1995 (1995-02-14) column 6, line 40 - line 54 column 8, line 30 -column 10, line 6	1-7,10, 14-23, 26,28-33
Y		8,9, 11-13, 24,25,27

	--- --	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2001		Date of mailing of the international search report 05/10/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2940, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fernandez y Branas, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/33121

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 830 463 A (BELLGRAU DONALD ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 8, line 55 - column 11, line 53	1-7, 10, 14-23, 26, 28-33
Y	----- -----	8, 9, 11-13, 24, 25, 27
X	US 5 389 368 A (GURTISS III ROY) 14 February 1995 (1995-02-14) column 4, line 22 - line 27 column 7, line 4 - line 16 column 10, line 41 - line 59	1-7, 10, 14-23, 26, 28-33
Y	----- -----	8, 9, 11-13, 24, 25, 27
Y	WO 99 38978 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ; UNIV ARKANSAS (US); SOSIN HOWARD (US)) 5 August 1999 (1999-08-05) page 3, line 9 - page 4, line 7; claims 1-36 page 13, line 20 - line 23	8, 9, 11-13, 24, 25, 27
X	MEDAGLINI, D. ET AL: "Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium Streptococcus gordonii after oral colonization." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1995) VOL. 92, NO. 15, PP. 6868-6872. , XP002177838 the whole document	16-19, 21, 26
X	VRTALA S ET AL: "Humoral immune responses to recombinant tree pollen allergens (Bet v I and Bet v II) in mice: construction of a live oral allergy vaccine." INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, (1995 MAY-JUN) 107 (1-3) 290-4. REF: 15 , XP001024439 the whole document	1-7, 10, 14-23, 26, 28-33
Y	----- -----	8, 9, 11-13, 24, 25, 27
X, P	WO 00 54803 A (PANACEA PHARM LLC) 21 September 2000 (2000-09-21) whole document, especially page 32 line 25 - page 35 line 22 -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				International Application No PCT/US 00/33121	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9925387	A	27-05-1999	US	6024961 A	15-02-2000
			AU	736242 B2	26-07-2001
			AU	1459599 A	07-06-1999
			EP	1030690 A1	30-08-2000
			WO	9925387 A1	27-05-1999
US 5888799	A	30-03-1999	US	4888170 A	19-12-1989
			AT	44765 T	15-08-1989
			CA	1338705 A1	12-11-1996
			DE	3279824 D1	24-08-1989
			EP	0080806 A1	08-06-1983
			GR	76769 A1	03-09-1984
			IE	55478 B1	26-09-1990
			JP	2777622 B2	23-07-1998
			JP	6165688 A	14-06-1994
			JP	8011735 B	07-02-1996
			JP	58126815 A	28-07-1983
US 5830463	A	03-11-1998	US	5413914 A	09-05-1995
			AU	4283596 A	06-06-1996
			CA	2205379 A1	23-05-1996
			EP	0789593 A1	20-08-1997
			JP	10510246 T	06-10-1998
			WO	9614876 A1	23-05-1996
			US	5691183 A	25-11-1997
			US	5866351 A	02-02-1999
			US	5981259 A	09-11-1999
			AU	7254694 A	06-02-1995
			WO	9502065 A1	19-01-1995
US 5389368	A	14-02-1995	US	5468485 A	21-11-1995
			WO	8809669 A1	15-12-1988
			US	5387744 A	07-02-1995
			US	5855879 A	05-01-1999
			US	5855880 A	05-01-1999
			US	5294441 A	15-03-1994
			AT	98870 T	15-01-1994
			AU	1955088 A	04-01-1989
			AU	623599 B2	21-05-1992
			CA	1338957 A1	04-03-1997
			CN	1030018 A ,B	04-01-1989
			DE	3886506 D1	03-02-1994
			DE	3886506 T2	19-05-1994
			DK	52789 A	03-02-1989
			EP	0315682 A1	17-05-1989
			IE	63905 B1	14-06-1995
			JP	1503442 T	22-11-1989
			JP	2640525 B2	13-08-1997
			KR	139950 B1	01-06-1998
WO 9938978	A	05-08-1999	AU	2350599 A	16-08-1999
			EP	1051494 A1	15-11-2000
WO 0054803	A	21-09-2000	WO	9938978 A1	05-08-1999
WO 0054803	A	21-09-2000	AU	3760100 A	04-10-2000

Form PCT/ISA(210) (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/33121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0054803 A		WO 0054803 A2	21-09-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 37/08

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

Fターム(参考) 4C085 BA02 BA07 BA08 BA11 BA15 BA20 BA21 BA24 BA51 BB03
BB11