

(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2005-502339

(P2005-502339A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 9/107</b>	A 6 1 K 9/107	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/00	4 C O 7 6
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/35	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 39/35</b>	A 6 1 K 39/39	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2003-521262 (P2003-521262)  
 (86) (22) 出願日 平成14年8月15日 (2002.8.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月16日 (2004.2.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/009122  
 (87) 国際公開番号 W02003/016340  
 (87) 国際公開日 平成15年2月27日 (2003.2.27)  
 (31) 優先権主張番号 0120150.8  
 (32) 優先日 平成13年8月17日 (2001.8.17)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

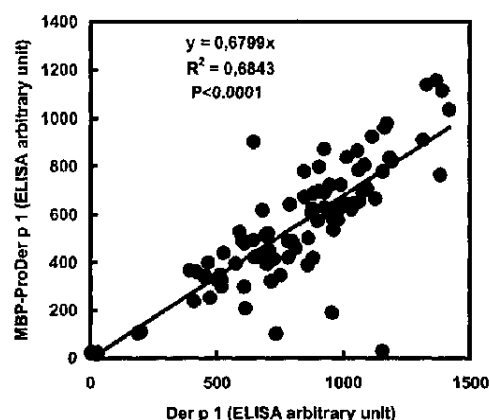
(71) 出願人 397062700  
 グラクソスミスクライン バイオロジカル  
 ズ ソシエテ アノニム  
 ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3  
 3 O ルー デ ランスティテュート 8  
 9  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DER P 1 および PRODER P 1 アレルゲン誘導体

## (57) 【要約】

本発明は、低アレルゲン活性を有する組換えDerP1/ProDerP1アレルゲン誘導体を提供することを含む、アレルギーの新規治療法を提供する。アレルギーまたは投薬経験の無い個体のTh1型免疫応答を刺激し、こうして野生型アレルゲンに接触した時にアレルギー応答の可能性を低下させる、該変異体アレルゲンを含む医薬組成物もまた提供される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

野生型アレルゲンと比較してアレルゲン活性が有意に低下している、組換えヤケヒョウヒダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) DerP1またはProDerP1 (DerP1/ProDerP1) タンパク質アレルゲン誘導体。

## 【請求項 2】

熱処理されている、請求項 1 に記載の組換えDerP1/ProDerP1誘導体。

## 【請求項 3】

遺伝的に変異されている、請求項 1 に記載の組換えDerP1/ProDerP1誘導体。

## 【請求項 4】

以下のDerP1変異の 1 つ以上を含む、請求項 3 に記載の組換えDerP1/ProDerP1変異体：システイン 4 残基の変異、システイン 31 残基の変異、システイン 65 残基の変異、システイン 71 残基の変異、システイン 103 残基の変異、およびシステイン 117 残基の変異。

## 【請求項 5】

配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 よりなる群から選択されるいずれかの配列を有する組換え変異体アレルゲン。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のアレルゲンの変異体をコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 7】

コドン使用パターンは高度に発現される哺乳動物遺伝子のコドン使用パターンに似ている、請求項 6 に記載の核酸配列。

## 【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載の核酸を含有する発現ベクター。

## 【請求項 9】

請求項 6 もしくは 7 に記載の核酸配列または請求項 8 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質もしくは変異体アレルゲン、または請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のコードポリヌクレオチド、そしてアジュバントを含むかまたは含まない免疫学的組成物。

## 【請求項 11】

アジュバントは、Th1型免疫応答の優先的刺激物質である、請求項 10 に記載の免疫学的組成物。

## 【請求項 12】

アジュバントは、3D-MPL、QS21、CpGオリゴヌクレオチド、ポリエチレンエーテルもしくはエステル の 1 つ以上、またはこれらのアジュバントの 2 つ以上の組合せを含む、請求項 10 または 11 に記載の免疫学的組成物。

## 【請求項 13】

アレルゲンは、水中油または油中水エマルジョンビヒクルで提供される。請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の免疫学的組成物。

## 【請求項 14】

医薬中で使用される本明細書に記載の免疫学的組成物。

## 【請求項 15】

アレルギー治療のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または変異体アレルゲンの使用。

## 【請求項 16】

請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の免疫学的組成物を患者に投与することを含む、アレルギー応答の患者を治療する方法、またはアレルギー応答を受けやすい患者を予防する方法。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規の予防製剤と治療製剤に関し、該製剤は、特異的アレルゲンに対するアレルギー応答の予防および／または緩和に有効である。さらに本発明は、ヤケヒョウヒダニ（*Dermatophagoides pteronyssinus*）からの主要タンパク質アレルゲンの低アレルゲン性組換え誘導体、アレルゲンDerP1とその前駆体型ProDerP1に関する。特に本発明の誘導体は、物理的に修飾されたDerP1またはProDerP1、例えば熱処理されたタンパク質；または、ジスルフィド結合形成に関与する1つ以上のシステイン残基が変異されている、遺伝子修飾された組換えDerP1もしくはProDerP1を包含する。DerP1とProDerP1誘導体を発現および精製する方法、および免疫原性組成物およびワクチンを調製する方法も記載される。 10

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトのアレルギー応答は一般的であり、種々のアレルゲンにより引き起こされる。アレルギー性個体はアレルゲンに感作され、血清中の高レベルのアレルギー特異的IgEの存在を特徴とし、Th2型サイトカイン（IL-4、IL-5およびIL-13）を産生するアレルゲン特異的T細胞集団を有する。アレルゲンの存在下での、肥満細胞や好塩基球の表面に存在するFcRI受容体へのIgEの結合は、細胞の迅速な脱顆粒と、以後のヒスタミンおよび炎症性反応の他のあらかじめ形成されているメディエーターおよび新生のメディエーターの放出を引き起こす。これ以外に、T細胞想起応答の刺激は、IL-4とIL-13の産生を引き起こし、これらは一緒に協力して、B細胞応答をアレルゲン特異的IgE産生にスイッチする。早期および後期アレルギー応答の発生の詳細については、Joost Van Neevenら、1996、*Immunology Today*, 17, 526を参照されたい。非アレルギー性個体では、同じ抗原に対する免疫応答は、INF- $\gamma$ のようなTh1型サイトカインをさらに含有してもよい。これらのサイトカインは、高レベルのTh2型免疫応答の阻害によりアレルギー応答（高レベルのアレルゲン特異的IgEを含む）の開始を防止することができる。この点で重要なことは、IgE合成は、B細胞上のCD23（FcRII）受容体へのIgE／アレルゲン複合体の結合により仲介される阻害フィードバック機構により調節される（Luoら、*J. Immunol.*, 1991, 146(7):2122-9; Yuら、1994, *Nature*, 369(6483):753-6）という事実である。細胞結合CD23が欠如した系では、IgE合成のこの阻害は起きない。 20 30

## 【0003】

気管支喘息、アトピー性皮膚炎、および再発性鼻炎のようなアレルゲンに対するIgEにより仲介されるI型アレルギー疾患は、世界の人口の20%が罹患する。このようなアレルギー反応の現代の治療方策は、抗ヒスタミン治療および／または抗炎症コルチコステロイドの局所投与によるヒスタミン放出の症状を予防する手段を含む。開発中の他の方策には、宿主の免疫系を使用して肥満細胞の脱顆粒を防止する方法がある（Stanworthら、EP0477231B1）。他の型の免疫療法が既に報告されている（Hoyneら、*J. Exp. Med.*, 1993, 178, 1783-1788; Holtら、*Lancet*, 1994, 344, 456-458）。

## 【発明の開示】

## 【0004】

即時的ならびに後期症状は薬剤治療で改善されるが、I型アレルギーにはアレルゲン特異的免疫療法が唯一の治療法である。しかし、この方法には解決すべきいくつかの問題がある。まず、現在免疫療法は総アレルゲン抽出物を用いて行われ、これはバッチ毎に異なる。さらにこれらのアレルゲン混合物は、個々の患者のプロフィール毎に計画されておらず、好ましくない毒性タンパク質を含有するかも知れない。第2に、高用量の未変性アレルゲンの投与は、重症のアナフィラキシー反応を引き起こすことがあり、従って免疫療法が成功するための最適に効率的な高用量のアレルゲンに達しないことがしばしばある。第1の問題に対しては、アレルゲン抽出物と比較して、より解析されたより再現性のある組換えアレルゲンを用いる代替ワクチン接種が行われている。第2の問題、すなわちアレルゲン抽出物の繰り返し注入により誘導されるアナフィラキシー反応のリスクは、欠失または 40 50

突然変異誘発によりIgE反応性を改変した組換え「低アレルゲン」の使用により、最小にすることができる (Akdis, CAとBlaser, K. アレルゲンの化学的および構造的修飾による特異的免疫応答の制御、Int. Arch. Allergy Immunol., 2000, 121, 261-269)。

【0005】

アレルギーの治療と予防のために製剤が報告されているが、これは、IgEの産生をダウンレギュレートする手段、ならびにTh2型からTh1型への応答のシフトによりアレルゲンに対する細胞介在応答を修飾することを提供する (IL-4: IFN- $\gamma$  を産生するDerP1特異的T細胞の比の低下、またはIL-5: IFN- $\gamma$  比の低下により測定される)。これは例えば、W099/25823に記載のように酵素活性の低下したrecDerP1のような組換えアレルゲンの使用により行われる。しかしこれらの組換えアレルゲンの免疫原性は、IgE合成誘導の点で野生型ProDerP1の免疫原性に似ていると考えられる。

10

【0006】

IgE結合活性の低下した非アナフィラキシー型のアレルゲンが報告されている。アレルゲン工学により、アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発またはいくつかのアミノ酸配列の欠失により、アレルゲンタンパク質のIgE結合能の低下が可能になった。同時に、T細胞エピトープが保持されるため、T細胞活性化能は保存される。これは、結果に変動はあるが、異なるアレルゲンについていくつかのアプローチを使用して証明されている。その例は、チモシーグラス (tomothy grass) の花粉のアレルゲンPh1p5b (Schramm Gら、1999, J. Immunol., 162, 2406-14)、主要なハウスダストダニアレルゲンDerf2 (Takaiら、2000, Eur. J. Biochem., 267, 6650-6656)、DerP2 (SmithとChapman 1996, Mol. Immunol. 33, 399-405)、およびDerf1 (Takahashi Kら、2001, Int Arch Allergy Immunol. 124, 454-60) について公表されている。ある研究は、ジスルフィド結合に参与するシステイン残基のレベルで点突然変異を導入することにより、Derf1低アレルゲンの作成を報告している (Takahashi Kら、Int Arch Allergy Immunol. 2001, 124(4): 454-60、Takai T, Yasuhara T, Yokota T, Okumura Y)。しかしもし野生型ProDerf1がピー・パストリス (P. pastoris) によりうまく分泌されても、分子内ジスルフィド結合に参与するシステイン変異体は分泌されなかった。

20

【0007】

ハウスダストダニであるヤケヒョウヒダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) からのアレルゲンは、アレルギー性過敏症反応を引き起こす主要な原因因子の1つである。これらの分子の中で、DerP1は最も強いIgE介在免疫応答を引き起こす免疫優性なアレルゲン (To phamら、1994, Protein Engineering, 7, 7, 869-894; Simpsonら、1989, Protein Sequences and Data Analyses, 2, 17-21) であり、ダストダニに対する75%を超えるアレルギー患者は、このアレルゲンに対するIgEを発現する。ハウスダストダニDerP1に由来する低アレルゲン、およびこのアレルゲンに対する予防用および治療用ワクチンは、報告されていない。

30

【0008】

本発明は、野生型アレルゲンと比較してアレルゲン活性が低下した、ヤケヒョウヒダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) DerP1アレルゲンの組換え誘導体、またはその前駆体型ProDerP1 (以後「DerP1/ProDerP1」と呼ぶ) の提供と使用に関する。本発明の組換え型のDerP1誘導体 (免疫賦活された組換えタンパク質またはNAVACに適したDerP1/ProDerP1をコードするプラスミド) は、強い予防性Th1を誘導するための、またはTh2からTh1免疫応答にシフトさせるための、予防または治療ワクチンとして使用される。低アレルゲン誘導体は、組換え発現系によりうまく産生され、これもまた本発明の1つの態様である。

40

【0009】

DerP1は30KDaタンパク質であり、クローン化され配列決定されている (Chuaら、1988, J. Exp. Med., 167, 175-182)。これは、成熟タンパク質中に222のアミノ酸残基を含有することが知られている。DerP1の配列は、パパインと31%の相同性を有し、さらに詳しくは、酵素活性領域と、最も顕著にはCys34-His170イオン対と相同性を有する (Tophamら、前述)。DerP1は、ダニの中腸 (ここでその役割はおそらく食物の消化に関連する) で産

50

生される。0.2ngまでのまたはタンパク質分解活性のあるDerP1は各便ペレット（それぞれ直径が約10～40μm）に取り込まれ、従って容易にヒト呼吸器官中に吸入される。精製DerP1調製物の室温での一晚の保存は、自己タンパク質分解性分解のために酵素活性がほとんど完全に失われる（Machadoら、1996, Eur. J. Immunol. 26, 2972-2980）。cDNA配列をコードするDerP1は、多くの哺乳動物および植物プロテイナーゼのように、DerP1が320アミノ酸残基の不活性化プレプロ酵素として合成され、これは次に処理されて222アミノ酸の成熟型となる（Chuaら、1988, J. Exp. Med. 167, 175-182; Chuaら、1993, Int. Arch Allergy Immunol 101, 364-368）ことを明らかにしている。ProDerP1の成熟は今日まで知られていないが、アレルゲンは80残基のプロ領域の切断により処理されると考えられている。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、組換えヤケヒョウヒダニ（*Dermatophagoides pteronyssinus*）DerP1/ProDerP1タンパク質アレルゲン誘導体を提供し、ここで該アレルゲン誘導体は、野生型アレルゲンと比較して有意に低下したアレルゲン活性を有する。アレルゲン活性は、細胞内ジスルフィド結合を破壊しこうして3次元構造を不安定化することによりタンパク質を破壊することを目的とする、いくつかの手段により障害される。改変されていない野生型アレルゲンに対して以下の利点を有する該アレルゲン誘導体は：1) 野生型アレルゲンにより刺激されるものと比較してTh1型の免疫応答（例えば、より高いIgG2a）を上昇させ、こうしてワクチン接種宿主のアレルギー可能性を抑制する、2) アレルゲン誘発性が低下しており（しかしT細胞反応性を保持している）、従って高用量の免疫原の全身性投与により適している、3) 未変性のDerP1への結合についてIgEと競合するDerP1特異的IgGを誘導する、4) エアゾル化したアレルゲン抽出物への暴露後でも、気道の好酸球を効率的に防御する。そのような誘導体は、医学での使用に適した治療および予防ワクチン製剤での使用に適しており、さらに詳しくはアレルギー反応の治療または予防に適している。

20

【0011】

第1の態様において本発明は、組換えDerP1/ProDerP1（すなわち、DerP1またはProDerP1）アレルゲン誘導体であって、アレルギー活性が有意に低下している、例えば、好ましくは還元剤の存在下でタンパク質を熱処理するような物理的手段によりほとんどまたは完全に無くなっている、誘導体を提供する。典型的には、DerP1/ProDerP1タンパク質は、約100で還元剤の存在下で数分間処理される。好ましくは還元剤は、DTTのような-メルカプトエタノールである。さらに好ましくはタンパク質は、約100で50mM -メルカプトエタノールの存在下で処理される。この処理は、タンパク質コンフォメーション性のIgE結合エピトープの安定性に悪影響を有する。

30

【0012】

第2の態様において本発明は、そのアレルギー活性が、例えばコードしているcDNAまたはゲノムDNAへの特異的変異の導入により遺伝的に障害されている、組換えDerP1/ProDerP1タンパク質誘導体を提供する。従って本発明の1つの態様は、遺伝的に変異した組換えDerP1/ProDerP1自体を提供する。DerP1/ProDerP1のアレルゲン性の低下は、未変性の配列中に変異を導入した後に、低アレルゲン性変異体を組換え的に産生することにより行われる。これは、タンパク質の3次元コンフォメーションが失われるように、タンパク質の3次元構造中に置換、欠失または付加を導入することにより、またはこれを改変することにより行われる。これは特に、断片でタンパク質を発現するか、ジスルフィド結合形成に関与するシステイン残基を欠失させるか、または残基を欠失させるか付加してタンパク質の3次構造実質的に改変することにより行われる。好ましくは、変異は、2つのシステイン残基の間の相互作用を改変して、典型的には未変性の（成熟）DerP1の4、31、65、71、103、および117位（これは、ProDerP1のそれぞれ84、111、145、151、183および197位に対応する）の1つの突然変異により作成される。本発明の変異タンパク質は、2つ以上（3、4、5または6つすべて）のシステイン変異を含んでよく、こうして異なるジスルフィド結合、例えば4と31位、4と65位、4と103位、31と65位、4と31と65位、または71と103

40

50

位、71と117位、103と117位、31と117位、65と117位、または71と103と117位の変異に影響を与える。

【0013】

好ましくは誘導体は、上記の任意の位置に単一の変異を含む。最も好適な変異はCys4（あるいは、またはこれ以外に、Cys117であり、これはCys4のジスルフィド結合パートナーであると考えられている）である。Cys変異は欠失でもよいが、好ましくは他の天然の19アミノ酸の任意のものの置換である。好適な置換は、陽性荷電したアミノ酸残基を導入して、生じるタンパク質の3D構造をさらに不安定化させる。例えば好適な置換はシステインアルギニン（またはリジン）置換を含む。

【0014】

従って本発明は、特に限定されないが、低アレルゲン性DerP1/ProDerP1誘導体の例として示される6つの特異的変異により例示される。まずProDerP1のアレルゲン活性は実質的に低下し、好ましくはDerP1タンパク質配列のCys4位でシステイン残基の代わりにアルギニン残基を使用することにより完全に排除され、配列番号3に示される。第2に以下の任意の位置（成熟DerP1中の配列を参照して計算される）でシステイン残基の代わりにアルギニン残基を使用することにより実質的に排除される：DerP1タンパク質配列のCys31（配列番号5）、Cys65（配列番号7）、Cys71（配列番号9）、Cys103（配列番号11）、Cys117（配列番号13）。

【0015】

DerP1/ProDerP1の変異体は、DerP1/ProDerP1タンパク質をコードするcDNAを、G. Winterら、Nature 1982, 299:756-758またはZollerとSmith 1982; Nucl. Acids Res., 19:6487-6500に記載のような従来法により部位特異的突然変異誘発をすることにより、またはChangとSmith、Nucleic Acids Res., 1984, 12:2407-2419もしくはG. Winterら、Biochem. Soc. Trans., 1984, 12:224-225に記載のような欠失突然変異誘発をすることにより調製される。

【0016】

本発明は、具体的に開示された配列に限定されず、IgE結合反応性および/またはヒスタミン放出活性を低下させるかまたは排除するように変異されているが、その野生型アレルゲンに対する免疫応答を刺激するT細胞反応性および/または能力を保持する任意の低アレルゲン性アレルゲンを含む。変異アレルゲンのアレルゲン活性、従ってアレルゲン活性の低下は、以下の任意の方法により野生型と比較される：実施例の部分で詳述される方法に従う、ヒスタミン放出活性またはIgE結合反応性。

【0017】

「実質的に低下したアレルゲン活性」とは、残存IgE結合活性により測定したアレルゲン活性が、未変性の（非修飾または非変異）タンパク質の最大50%に、好ましくは最大20%に、さらに好ましくは最大10%に、さらに好ましくは最大5%に、さらに好ましくは5%未満まで低下していることを意味する。あるいは「実質的に」はまた、変異体のヒスタミン放出活性が、未変性のタンパク質と比較して少なくとも100倍、好ましくは1000倍、さらに好ましくは10000倍低下していることを意味する。

【0018】

変異アレルゲンの免疫原性は、種々の免疫測定法により野生型アレルゲンと比較される。変異アレルゲンと野生型アレルゲンの交差反応性は、変異アレルゲンまたは野生型アレルゲンでワクチン接種後にin vitro T細胞測定法により測定される。簡単に説明すると、ワクチン接種した動物から単離した脾臓T細胞を、変異アレルゲンまたは野生型アレルゲンでin vitroで再刺激し、次に市販のELISAアッセイによりサイトカイン産生を測定するか、またはアレルゲン特異的T細胞の増殖を、トリチウム化チミジンの取り込みにより経時的に測定する。また免疫原性はELISAアッセイにより測定され、その詳細は当業者により容易に測定される。簡単に説明すると、2種類のELISAアッセイが考えられる。まず、野生型DerP1で免疫したマウスの血清を用いる変異DerP1の認識；第2に、変異アレルゲンで免疫した動物の血清を用いる野生型DerP1アレルゲンの認識、を評価する。簡単に説明す

10

20

30

40

50

ると、各ウェルを100ngの精製した野生型もしくは変異DerP1で4 で一晩被覆する。ブロッキング溶液（1%BSAを有する0.1%TBS-Tween）でインキュベート後に、血清の連続希釈物を37 で1時間インキュベートする。ウェルを5回洗浄し、アルカリホスファターゼが結合した抗IgG抗体とともにインキュベートして総IgGを証明する。

#### 【0019】

本発明のさらなる態様は、本明細書に開示のDerP1/ProDerP1アレルゲンの変異体をコードする単離した核酸を提供する。好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列であり、標準的DNA合成法、例えば、D.M. Robertsら、Biochemistry 1985, 24:5090-5098に記載の酵素結合法、化学合成法、in vitro酵素的重合、またはこれらの方法の組合せにより合成することができる。好ましくは核酸配列は、目的の発現宿主で使用されるもの、さらに好ましくは高度に発現される哺乳動物（例えばヒト）遺伝子に似ているものを模倣するように最適化されているコドン使用パターンを有する。好適なDNA配列は、コドンが最適化された配列であり、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、および配列番号14に記載されている。

10

#### 【0020】

DNAの酵素的重合は、in vitroで、必要に応じてdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPのヌクレオチド3リン酸を含有する適切なバッファー中でDNAポリメラーゼI（クレノウ断片）のようなDNAポリメラーゼを使用して、10 ~ 37 の温度で一般的には50mlまたはそれ以下の容量で行われる。DNA断片の酵素的結合は、適切なバッファー、例えば0.05M トリス（pH 7.4）、0.01M MgCl<sub>2</sub>、0.01M ジチオスレイトール、1 mM スペルミジン、1 mM ATPおよび0.1mg/mlウシ血清アルブミン中のT4 DNAリガーゼのようなDNAリガーゼを使用して、4

20

~ 周囲温度で一般的には50mlまたはそれ以下の容量で行われる。DNAポリマーまたは断片の化学合成は、従来のホスホトリエステル、ホスファイトまたはホスホラミダイト化学により、例えば、「遺伝子断片の化学的および酵素的合成 - 実験室マニュアル（Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A laboratory Manual）」（H.G. GassenとA. Lang編）、Verlag Chemie, Weinheim (1982)、または他の科学刊行物、例えば M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. SproatおよびR.C. Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10:6243; B.S. SproatとW. Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24: 5771; M.D. MatteucciとM.H. Caruthers, Tetrahedron Letters, 1980, 21:719; M.D. MatteucciとM.H. Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103:318 5; S.P. Adamsら、Journal of the American Chemical Society, 1983, 105:661; N.D. Sinha, J. Biernat, J. McMannusとH. Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12:4539; およびH.W.D. Matthesら、EMBO Journal, 1984, 3:801に記載のような固相法を使用し

30

#### 【0021】

あるいはコード配列は、DerP1/ProDerP1 mRNAから公知の方法（例えば、mRNAを逆転写して相補的cDNA鎖を作成する）、および市販のcDNAキットを使用して得ることができる。

#### 【0022】

好ましくはヌクレオチド配列のコドン使用パターンは、高度に発現されるヒト遺伝子に典型的なものである。従って本発明のある態様において、変異DerP1/ProDerP1タンパク質をコードする複数のコドンと一緒に含むヌクレオチド配列であって、組換えダニタンパク質アミノ酸配列をコードするのに使用される可能なコドンの選択は、最適化された哺乳動物コドン使用を密接に模倣するように変化されおり、従って生じる遺伝子配列中のコドン使用の頻度は、同じタンパク質をコードするであろう哺乳動物遺伝子と実質的に同じである、ヌクレオチド配列が提供される。哺乳動物（ヒトを含む）のコドン使用パターンは、文献に記載されている（例えば、Nakamuraら、1996、Nucleic Acids Res. 24:214-215）。

40

#### 【0023】

DNAコードは4文字（A、T、CおよびG）有り、これらを使用して、生物の遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸である3文字の「コドン」を作成する。DNA分子に沿ったコドンの線形の配列は、これらの遺伝子にコードされるタンパク質中の線形のアミノ酸の配

50

列に翻訳される。コードは高度に縮重しており、61コドンが20アミノ酸をコードし、3つのコドンは「停止」シグナルである。すなわちほとんどのアミノ酸は、2つ以上のコドンによりコードされ、実際いくつかは4つまたはそれ以上の異なるコドンによりコードされる。

#### 【0024】

あるアミノ酸をコードする2つ以上のコドンが利用できる時、生物のコドン使用パターンは非ランダム性が高いことが観察されている。異なる種は、そのコドン選択に異なる偏りがあり、さらに単一の種で高レベルおよび低レベルで発現される遺伝子間でコドンの利用が顕著に異なることがある。この偏りは、ウイルス、植物、細菌、昆虫、および哺乳動物細胞で異なり、ある種は、他の種よりランダムコドン選択からの大きな偏りを示す。例えば、ヒトおよび他の哺乳動物は、ある細菌またはウイルスより偏りが少ない。これらの理由のために、大腸菌 (*E. coli*) 中で発現される哺乳動物遺伝子または哺乳動物細胞中で発現されるウイルス遺伝子が、効率的な発現のためのコドンの不適切な分布を有する可能性は高い。しかし大腸菌 (*E. coli*) 発現に適したコドン使用パターンを有する遺伝子は、ヒトで効率的に発現されるであろう。発現が起きる宿主中でまれにしか観察されないコドンの固まりの、異種DNA配列中の存在は、その宿主中での低い異種発現を予測させると考えられる。

10

#### 【0025】

コドンをその宿主中でまれなものから宿主が好むものに変化させる(「コドン最適化」)ことが、異種発現レベルを上昇させた例がいくつかあり、例えばBPV(ウシ乳頭腫ウイルス)後期遺伝子L1とL2は、哺乳動物コドン使用パターンに最適化され、これが、哺乳動物(Cao-1)細胞培養物中で野生型HPV配列の発現レベルを上昇させることが証明されている(Zhouら、*J. Virol* 1999, 73:4972-4982)。この研究では、BPV中では哺乳動物中より2倍以上多く(使用比>2)現れたすべてのBPVコドンと、使用比>1.5を有するほとんどのコドンは、優先的に使用される哺乳動物コドンにより保存的に置換された。W097/31115号、W097/48370号およびW098/34640号(Merck & Co., Inc.)では、コドンが最適化された配列を、そのために最適化される宿主哺乳動物中でDNAワクチンとして使用すると、HIV遺伝子またはそのセグメントのコドン最適化が、タンパク質発現の上昇と免疫原性の改良を引き起こすことが証明されている。

20

#### 【0026】

この研究では、各ヤケヒョウヒダニ(*D. pteronyssinus*)コドンは哺乳動物宿主の最適なコドンで保存的に置換されるため、配列は好ましくは完全に最適化コドンからなる(ただし、これが好ましくない制限部位、イントロンスプライス部位などをもたらす場合は除く)。驚くべきことにそのような最適化されたProDerP1/DerP1配列はまた、酵母の異なるコドン使用にもかかわらず酵母中でよく発現する。

30

#### 【0027】

本発明のさらなる態様は、変異DerP1/ProDerP1タンパク質の調製法であって、該タンパク質をコードするDNA(コドンが最適化されていてもいなくても)を組換え宿主細胞中で発現し、生成物を回収することを含む方法を提供する。

#### 【0028】

DerP1は、その酵素活性、アレルゲン誘発性および遺伝子クローニングについて充分解析されているが、DerP1の異種発現は、おそらくこのシステインプロテイナーゼがPreProDerP1前駆体として合成されるため、問題があると報告されている(ChapmanとPlatts-Mills、*J. Immunol.* 1980, 125:587-592)。さらに問題となるのは、タンパク質コンフォメーションに関与するサイクル残基が変異されているDerP1/ProDerP1配列の発現である。従って本発明はさらに、これらのすべての欠点を克服し、こうして変異タンパク質の産生とダニアレルギーに対する治療および予防用ワクチンの工業的開発を可能にする方法を提供する。

40

#### 【0029】

大腸菌(*E. coli*)でタンパク質発現の実質的な改善がされており、変異されているかま

50



たはされていないDerP1/ProDerP1が、マルトース結合タンパク質 (MBP) 融合タンパク質として発現された。従って、変異ProDerP/DerP1タンパク質を大腸菌 (E. coli) 中でMBP融合タンパク質として発現する方法が提供される。さらに、ジスルフィド結合はピキア・パストリス (Pichia pastoris) 中の分泌に必須であると言われている (Takaiら、2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 124:454-460) が、驚くべきことに酵母中でのタンパク質発現の実質的な改善が、変異タンパク質について行われている。これは、Dermatophagoides 変異したProDerP/DerP1タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を作り替えて高度に発現されるヒト遺伝子中にあるコドン使用に適合させ、こうして未変性のProDerP/DerP1 Dermatophagoides アレルゲンと同じコンフォメーションと免疫学的性質を有するようにさせることにより行われた。驚くべきことに、以前はピキア・パストリス (Pichia pastoris) ではうまく行かないと報告されていた (Takaiら、2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 124:454-460) にもかかわらず、哺乳動物細胞発現についてコドンが最適化された変異ProDerP1のクローニングと発現が、いくつかの部分が分泌されて、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 中で行うことができた。

#### 【0030】

本発明の方法は、マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラークローニング、実験室マニュアル (Molecular Cloning - A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー (Cold Spring Harbor)、1982-1989に記載のように従来の組換え法により行ってもよい。

#### 【0031】

特に、この方法は以下の工程を含む：

1. 宿主細胞中でDerP1/ProDerP1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNAポリマーを発現することができる、複製可能なまたは組み込んでいる発現ベクターを調製する；
2. 部位特異的突然変異誘発を使用して、ジスルフィド結合に関与するシステイン残基を別の残基 (好ましくはアルギニン残基) で置換して、生じるタンパク質のIgE結合活性を改変する；
3. 該ベクターで宿主細胞を形質転換する；
4. 形質転換した宿主細胞をDNAポリマーの発現を可能にする条件下で培養してタンパク質を産生させる；そして
5. タンパク質を回収する。

#### 【0032】

本明細書において用語「形質転換する」とは、例えば、「遺伝子工学 (Genetic Engineering)」、S.M. KingsmanとA.J. Kingsman編；ブラックウェルサイエンティフィックパブリケーションズ (Blackwell Scientific Publications)；オックスフォード、イングランド、1988に記載のように従来法を使用して、適切なプラスミドまたはウイルスベクターを用いて形質転換、トランスフェクションまたは感染させて宿主細胞中に外来DNAを導入することを意味する。用語「形質転換した」または「形質転換体」は以後、目的の外来遺伝子を含み発現することができる得られた宿主細胞に適用される。

#### 【0033】

発現ベクターは新規であり、また本発明の一部を構成する。本発明の1つの具体的な態様は、本発明のシステイン変異したDerP1/ProDerP1をコードするポリヌクレオチド配列を含有し、この発現を指令することができる発現ベクターを提供する。本発明の別の具体的な態様は、ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが、高度に発現される哺乳動物遺伝子、特に高度に発現されるヒト遺伝子に典型的な、システイン変異したDerP1/ProDerP1をコードするポリヌクレオチド配列を含有し、この発現を指令することができる発現ベクターを提供する。ベクターは、細菌、昆虫、酵母または哺乳動物細胞、特にヒト細胞中での異種DNAの発現を指令するのに適している。

#### 【0034】

複製可能な発現ベクターは、宿主細胞に適合性のあるベクターを切断して、無傷のレプリコンを有する線状DNAセグメントを得て、該線状セグメントを、所望の生成物をコードす

10

20

30

40

50

る該線状セグメントとともに所望の生成物をコードする1つ以上のDNA分子(例えば、Der P1/ProDerP1タンパク質をコードするDNAポリマー)と、結合条件下で組合せることにより、本発明に従って調製される。

【0035】

すなわちDNAポリマーは、あらかじめ形成されるか、必要に応じてベクターの構築中に形成される。

【0036】

ベクターの選択は、一部は宿主細胞(これは、原核細胞で真核細胞でもよい)により決定されるであろう。適当なベクターには、プラスミド、バクテリオファージ、コスミドおよび組換えウイルスがある。

10

【0037】

複製可能な発現ベクターの調製は、従来法により、例えば、マニアティス(Maniatis)ら(前述)に記載の方法により、DNAの制限切断、重合、および連結のための適切な酵素を用いて行われる。組換え宿主細胞は、形質転換条件下で本発明の複製可能な発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、本発明に従って調製される。適当な形質転換条件は、従来法の通りであり、例えばマニアティス(Maniatis)ら(前記で引用)、または「DNAクローニング(DNA Cloning)」、第II巻、Glover編、アイアールエルプレス社(IRL Press Ltd.)、1985年に記載されている。

【0038】

形質転換条件の選択は、宿主細胞により決定される。すなわち大腸菌(*E. coli*)のような細菌宿主は、 $\text{CaCl}_2$ の溶液(Cohenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 69:2110)を用いて、または $\text{RbCl}$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、酢酸カリウムおよびグリセロールを含む溶液を用いて処理し、次に[N-モルホリノ]-プロパンスルホン酸、 $\text{RbCl}$ およびグリセロールを用いて処理される。培養哺乳動物細胞は、細胞へのベクターDNAのカルシウム共沈殿により、リポフェクティンにより、または電気穿孔法により形質転換してもよい。酵母と適合性のあるベクターはまた、栄養要求性突然変異体に原栄養性を付与するか、または野生型に重金属に対する耐性を付与することにより、好ましい形質転換体の選択を可能にするマーカーを有する。酵母ベクターの対照配列は、解糖系酵素のプロモーター(Hessら、J. Adv. Enzyme Reg. 1968, 7:149)、酸性ホスファターゼをコードするPH05遺伝子、CUP1遺伝子、ARG3遺伝子、GAL遺伝子プロモーターおよび合成プロモーター配列を含む。酵母発現に有用な他の

20

30

【0039】

種々の誘導性または構成性プロモーターに基づく種々のピー・パストリス(*P. pastoris*)発現ベクターが利用できる(CereghinoとCregg、FEMS Microbiol. Rev. 2000, 24:45-66)。サイトゾルタンパク質および分泌タンパク質の産生のために、最も一般的に使用されるピー・パストリス(*P. pastoris*)ベクターは、非常に強いかつ厳密に制御されるアルコールオキシダーゼ(AOX1)プロモーターを含有する。このベクターはまた、his4宿主中の選択のためのピー・パストリス(*P. pastoris*)ヒスチジノール脱水素酵素(HIS4)遺伝子を含有する。融合タンパク質の選択は、シグナル配列の存在が必要であり、エス・セレビスシェ(*S. cerevisiae*)プレプロアルファ接合因子リーダー配列は、ピキア発現系で広くかつうまく使用されている。発現株の安定性を最大にするために、発現ベクターがピー・パストリス(*P. pastoris*)ゲノム中に組み込まれる。エス・セレビスシェ(*S.*

40

50

cerevisiae)と同様に、宿主ゲノムにより共有される配列(AOX1またはHIS4)内のピー・パストリス(P. pastoris)発現ベクターの切断は、相同的組換えイベントを刺激し、これは、ゲノム遺伝子座へのベクターの組み込みを効率的に標的とする。一般に、発現カセットの複数の組み込みコピーを含有する組換え株は、単一コピー株より多くの異種タンパク質を与えることができる。高コピー数形質転換体を得るための最も有効な方法は、スフェロプラスト法によるピキア(Pichia)受容体株の形質転換が必要である(Creggら、1985, Mol. Cell. Biol., 5:3376-3385)。

【0040】

本発明はまた、本発明の複製可能な発現ベクターで形質転換された宿主細胞を包含する。

【0041】

DNAポリマーの発現を可能にする条件下での形質転換宿主細胞の培養は、従来法により、例えば上記のマニアティス(Maniatis)らおよび「DNAクローニング」に記載のように行われる。すなわち、好ましくは細胞は栄養物質とともに供給され、45 未満の温度で培養される。

【0042】

生成物は、宿主細胞に従って従来法により回収される。すなわち宿主細胞が例えば大腸菌(E. coli)のような細菌の場合、これは物理的、化学的、または酵素的に溶解され、生じる溶解物からタンパク質生成物が単離される。宿主細胞が哺乳動物である場合、生成物は栄養培地から単離されるかまたは無細胞抽出物から単離される。従来のタンパク質単離法には、選択的沈殿、吸着クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー(モノクローナル抗体アフィニティークラムを含む)がある。

【0043】

あるいは、バキュロウイルスのような適当なベクターを使用して、昆虫細胞中で、形質転換ショウジョウバエ細胞中で、または哺乳動物CHO細胞中で、行われる。本発明の新規タンパク質はまた、EP-A-0278941号のCSタンパク質について記載されているように酵母細胞中で発現してもよい。

【0044】

本発明の低アレルゲン性DerP1/ProDerP1誘導体を含む医薬組成物、免疫組成物およびワクチン組成物、または該タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列(コドンが最適化されていてもいなくても)も提供される。好適な実施形態において、DNA組成物は、ヤケヒョウヒダニ(D. pteronyssinus)アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含むDNAで被覆された複数の粒子(好ましくは金粒子)を含み、ここでポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは、高度に発現される哺乳動物遺伝子、特にヒト遺伝子に典型的である。

【0045】

本発明のポリヌクレオチドおよびコードされるポリペプチドは、治療薬または予防薬として有用である。特に本発明のポリヌクレオチド(未変性のProDerP1のポリヌクレオチド配列を含む、好ましくはコドンが最適化されている)は、DNAワクチン接種(NAVAC)で使用され、このDNAはワクチン接種される哺乳動物、例えばヒトに投与される。RNAまたはDNAのような核酸、好ましくはDNAは、例えば上記したようなベクターの形で提供され、哺乳動物の細胞中で発現される。ポリヌクレオチドは、任意の利用できる方法で投与される。例えば、核酸は、針注入、好ましくは皮内、皮下または筋肉内注射により導入される。あるいは核酸は、粒子介在DNA送達(PMDD)のような核酸送達装置を使用して皮膚に直接投与される。この方法では、不活性粒子(例えば金ビーズ)は核酸で被覆され、例えば発射装置から高圧で放出することにより、受容者の表面(例えば皮膚)の貫通を可能にするのに十分な速度で加速される(本発明の核酸分子で被覆された粒子は、そのような粒子で充填された送達装置のように、本発明の範囲内である)。

【0046】

患者に裸のポリヌクレオチドまたはベクターを導入するのに適した方法には、適切なビヒクルを用いる局所投与がある。核酸は局所的に皮膚に投与されるか、または粘膜表面に、

10

20

30

40

50

例えば鼻内、経口、腔内、または直腸内投与される。裸のポリヌクレオチドまたはベクターは、薬剤学的に許容される賦形剤、例えばリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）とともに存在してもよい。DNA取り込みは、別個にまたはDNA製剤中に取り込まれて、ブピバカイン（bupivacaine）のような促進剤を使用してさらに促進してもよい。受容者に核酸を直接投与する他の方法には、超音波、電気刺激、電気穿孔法、およびUS-5,697,901号に記載のようにマイクロシーディング（microseeding）がある。典型的には核酸は、1 pg ~ 1 mg、好ましくは粒子介在遺伝子送達については1 pg ~ 10 µgの核酸の範囲の量、そして他の経路については10 µg ~ 1 mgの量で投与される。

#### 【0047】

本発明の核酸配列はまた、遺伝子治療に有用な特殊な送達ベクターを使用して投与される。遺伝子治療法は、例えばVermeら、Nature 1997, 389:239-242で考察されている。ウイルスベクター系と非ウイルスベクター系の両方を使用することができる。ウイルスベースの系には、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、カナリア痘（Canarypox）ウイルス、およびワクシニアウイルスベースの系がある。非ウイルスベースの系には、核酸の直接投与、微小球封入技術（ポリ（ラクチド-co-グリコリド）およびリポソームベースの系がある。ウイルスおよび非ウイルス送達系は組合せてもよく、ここでは、最初のワクチン接種後に追加免疫、例えばプラスミドのような非ウイルスベクターを使用して最初の「プライム」DNAワクチン接種後にウイルスベクターまたは非ウイルスベースの系を使用して1つ以上の「追加免疫」ワクチン接種をすることが好ましい。

10

20

#### 【0048】

こうして、本発明者らは、ProDerP1（好ましくはコドンが哺乳動物について最適化されている）をコードするDNAを用いてワクチン接種することは、マウスモデルでTh1応答を誘導（高力価の特異的IgG2a抗体と低力価の特異的IgG1）し、抗ProDerP1 IgEの非存在下で顕著であることを見いだした。

#### 【0049】

本発明の医薬組成物は、アジュバント化合物、またはタンパク質に誘導された免疫応答を上昇させるのに有用な他の物質を含有してもよい。

#### 【0050】

本発明のワクチン組成物は、免疫防御量のDerP1/ProDerP1低アレルゲン性タンパク質の変異体を含む。用語「免疫防御」とは、アレルギー反応が避けられるかまたは緩和されるように、以後の抗原刺激に対する免疫応答を誘発するのに必要な量を意味する。本発明のワクチンにおいて、タンパク質の水溶液を直接使用することができる。あるいは、あらかじめ凍結乾燥したかまたは凍結乾燥していないタンパク質を、種々の公知のアジュバントと混合、吸着、または共有結合してもよい。

30

#### 【0051】

適当なアジュバントが利用でき、例えば、フロイント不完全アジュバントおよびフロイント完全アジュバント（ディフコラボラトリーズ（Difco Laboratories）、デトロイト、ミシガン州）；メルクアジュバント65（メルクアンドカンパニー（Merck and Company, Inc.）、Rahway、ニュージャージー州）；AS-2（スミスクラインビーチャム（SmithKline Beecham）、フラデルフィア、ペンシルバニア州）；アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム；カルシウム、鉄または亜鉛の塩；アセチル化チロシンの不溶性懸濁物；アシル化糖；陽イオンのまたは陰イオンの誘導体化された多糖；ポリホスファゼン；生分解性微小球；モノホスホリル脂質AおよびキルAがある。サイトカイン（GM-CSF、またはインターロイキン-2、-7または-12）およびケモカインもアジュバントとして使用される。

40

#### 【0052】

本発明の製剤において、アジュバント組成物は、主にTh1型の免疫応答を誘導することが好ましい。高レベルのTh1型サイトカイン（例えば、IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2およびIL-12）は、投与された抗原に対して細胞性免疫応答の誘発を促進しやすい。応答がTh1型である

50

好適な実施形態において、Th1型サイトカインのレベルは、Th2型サイトカインのレベルより高い程度まで上昇する。これらのサイトカインのレベルは、標準的アッセイ法を使用して容易に評価される。サイトカインのファミリーの総説については、MosmannとCoffman、Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989を参照されたい。

【0053】

従って主にTh1型応答を誘発するのに使用される適当なアジュバントには、例えばモノホスホリル脂質A、好ましくは3-デ-0-アシル化モノホスホリル脂質A (3D-MPL)をアルミニウム塩と組合せたものがある。TH1型免疫応答を誘導する他の公知のアジュバントには、CpG含有オリゴヌクレオチドがある。このオリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドがメチル化されていないことが特徴である。そのようなオリゴヌクレオチドは公知であり、例えばW096/02555号に記載されている。免疫刺激性DNA配列もまた、例えばSatoら、Science 273:352, 1996に記載されている。CpG含有オリゴヌクレオチドはまた、単独でもしくは他のアジュバントと組合せて使用される。例えば増強系は、CpG含有オリゴヌクレオチドとサポニン誘導体の組合せ、特にCpGとQS21 (W000/09159号およびW000/62800号に開示されている)の組合せがある。好ましくは製剤はさらに、水中油エマルジョンおよび/またはトコフェロールを含む。

10

【0054】

他の好適なアジュバントは、サポニン、好ましくはQS21 (アキラバイオファーマシューチカルズインク (Aquila Biopharmaceuticals Inc.)), フラミンガム、マサチューセッツ州)であり、これは単独でまたは他のアジュバントと組合せて使用される。例えば増強系には、モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体の組合せ、例えばQS21と3D-MPL (W094/00153号に記載)の組合せ、またはW096/33739号に記載のようにQS21がコレステロールで排除される低レアトジニック (reactogenic) 組成物がある。他の好適な製剤には、水中油エマルジョンとトコフェロールがある。水中油中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に強力なアジュバント製剤は、W095/17210号に記載されている。

20

【0055】

W095/17210号に記載されている水中油中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に強力なアジュバント製剤は、好適な製剤である。

【0056】

他の好適なアジュバントには、Montanide ISA720 (セピック (Seppic)、フランス)、SAF (カイロン (Chiron)、カリフォルニア州、米国)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (カイロン (Chiron))、Detox (リビ (Ribi)、ハミルトン、モンタナ州)、RC-529 (コリクサ (Corixa)、ハミルトン、モンタナ州)、および他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGPs) がある。

30

【0057】

従って、本明細書に記載のDerP1/ProDerP1低アレルゲン性誘導体とアジュバントとを含む免疫原性組成物であって、ここでアジュバントは、3D-MPL、QS21、CpGオリゴヌクレオチド、ポリエチレンエーテルもしくはエステル、またはこれらのアジュバントの2つ以上の組合せを含む、組成物が提供される。免疫原性組成物中のDerP1/ProDerP1低アレルゲン性誘導体は好ましくは、水中油または油中水エマルジョンビヒクル中で提供される。

40

【0058】

さらなる態様において本発明は、Cys4、Cys31、Cys65、Cys71、Cys103またはCys117のような、ジスルフィド結合形成に関与する1つ以上のシステイン残基を変異させる工程を含む医薬組成物の製造法を提供する。本方法はさらに、高度に発現される哺乳動物遺伝子に典型的なコドン使用パターンを有し、本発明のコドンを最適化しシステイン変異したProDerP1/DerP1アミノ酸配列をコードする配列を産生するために、野生型DerP1/ProDerP1ヌクレオチド配列のコドン使用パターンを改変する工程、またはポリヌクレオチド配列を合成的に作成する工程を含む。ワクチン調製物は一般的に、ワクチン設計 (Vaccine Design) (「サブユニットとアジュバントアプローチ (The subunit and adjuvant approach)」 (Powell M.F. & Newman M.J.) 編、(1995) プレナムプレス (Plenum Press)、ニューヨ

50

ーク)に記載されている。リポソーム中の封入は、Fullerton、米国特許第4,235,877号に記載されている。巨大分子へのタンパク質の結合は、例えばLikhite、米国特許第4,372,945号およびArmorら、米国特許第4,474,757号に開示されている。

#### 【0059】

各ワクチン投与量中に存在する本発明のタンパク質の量は、典型的なワクチンで大きな副作用が無しで免疫防御性応答を誘導する量として選択される。そのような量は、どの特異的免疫原が使用されるか、およびワクチンが免疫賦活されるかどうかにより変動する。一般に各用量は、1~1000 $\mu$ gのタンパク質、好ましくは1~200 $\mu$ gを含むことが予測される。特定のワクチンの最適量は、被験体中の抗体価と他の応答の観察を含む標準的方法により確認することができる。本発明のワクチンは、成人または幼児に投与してもよいが、出産後しばらくしてから実質的なTh2型の記憶応答が確立される前に、個体にワクチン接種することが好ましい。初期のワクチン接種後に、被験体に好ましくは約4週間後に追加免疫をし、次にアレルギー応答のリスクが存在する限り6ヶ月毎に追加免疫を繰り返す。

10

#### 【0060】

ワクチンと医薬組成物は、単位投与用または多回投与用容器(例えば、密封したアンプルまたはバイアル)で提供される。そのような容器は好ましくは、使用するまで製剤の無菌性を保持するために密封される。一般に、製剤は油性もしくは水性ビヒクル中で懸濁液、溶液またはエマルジョンとして保存される。あるいは、ワクチンまたは医薬組成物は、使用直前に無菌液体を加えるのみでよい凍結乾燥条件で保存される。

20

#### 【0061】

本発明はまた、本発明のDerP1/ProDerP1誘導体またはその誘導体を、本明細書に記載の方法で精製する工程、および生じるタンパク質を適当なアジュバント、希釈剤または他の薬剤学的に許容される賦形剤と混合する工程を含む、ワクチンの製造法を提供する。

#### 【0062】

本発明はまた、本発明のタンパク質を薬剤学的に許容される賦形剤と混合する工程を含む、ワクチン製剤の製造法を提供する。

#### 【0063】

本発明の他の態様は、アレルギーに罹りやすいかまたは罹っている患者を免疫治療するためのワクチンを製造するための、本明細書で特許請求されるようなタンパク質またはポリヌクレオチドの使用である。本明細書に開示の薬剤学的に許容される量の免疫原性組成物を該患者に投与することを含む、アレルギーに罹りやすいかまたは罹っている患者を治療する方法は、本発明に包含される。

30

#### 【0064】

本発明のさらなる態様は、ヒトのアレルギー疾患(特にハウスダストダニアレルギー)を予防または軽減する方法であって、必要な被験体に、免疫原性有効量の本発明の変異アレルゲン、または本発明のワクチンを投与することを含む方法を提供する。

#### 【0065】

以下の実施例は、本発明を例示するものであって決してこれを限定するものではない。制限酵素と他の試薬は、実質的に販売業者の説明書に従って使用した。

40

#### 【実施例1】

#### 【0066】

一般的方法

##### 1. SDS-PAGEとウェスタンブロット解析

タンパク質を12.5%ポリアクリルアミドゲル上でSDS-PAGEにより分析した。電気泳動後、セミドライトランスブロットシステム(バイオラッド(Bio-Rad))を使用してタンパク質をニトロセルロース膜に移した。膜をTBS-T(50mM トリス塩酸(pH7.5)、150mM NaCl、0.1% Tween80)中の0.5% インスタゲル(Instagel)(PB Gelatins)で30分間飽和させ、ブロッキング溶液で希釈(1:5000)した変性または未変性のProDerP1に対して作成したマウスポリクローナル血清とインキュベートした。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マ

50

ウス抗体（プロメガ（Promega）、1:7500）と5-ブロモ,4-クロロ,3-インドリルホスフェート（BCIP、ベーリンガー（Boehringer））/ニトロブルーテトラゾリウム（NBT、シグマ（Sigma））を基質として使用して、免疫反応性物質を検出した。

【0067】

## 2. グリカン分析

グリカン鑑別Kit（Glycan Differentiation Kit）（ベーリンガー（Boehringer））を使用して以下のレクチンを用いて炭水化物分析を行った：ガラントス・ニバリス（*Galanthus nivalis*）アグルチニン（GNA）、サンブクス・ニグラ（*Sambucus nigra*）アグルチニン（SNA）、マーキア・アムレンシス（*Maackia amurensis*）アグルチニン（MAA）、ピーナツアグルチニン（PNA）およびシロバナヨウシュチョウセンアサガオ（*Datura stramonium*）アグルチニン（DSA）。簡単に説明すると、精製タンパク質をSDS-PAGEからニトロセルロース膜に移した。膜を、ジゴキシゲニンに結合した異なるレクチンとインキュベートした。アルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体を用いて複合体を検出した。

10

【0068】

## 3. 酵素アッセイ

総量 1 ml中に 1 mM EDTAと20mM L-システインを含有する50mM トリス塩酸（pH7）で酵素アッセイを行った。Cbz-Phe-Arg-7-アミノ-4-メチルクマリン（Cbz-Phe-Arg-AMC）とBoc-Gln-Ala-Arg-7-アミノ-4-メチルクマリン（Boc-Gln-Ala-Arg-AMC）（シグマ（Sigma））（両方の基質とも最終濃度100  $\mu$ M）の加水分解を、SLM8000分光蛍光計を使用して、 $\text{ex} = 380\text{nm}$ と  $\text{em} = 460\text{nm}$ を用いて追跡した。システイン活性化アレルゲンを最終濃度100nMまで加えてアッセイを開始した。アッセイの前に、精製DerP1またはProDerP1を、アプロチニン-およびp-アミノベンズアミジン - アガロース樹脂（シグマ（Sigma））の混合物でインキュベートして、推定される微量のセリンプロテアーゼ活性を除去した。

20

【0069】

## 4. タンパク質測定

総タンパク質濃度は、ピシンコニック酸（bicinchoninic acid）法（MicroBCA、ピアス（Pierce））によりウシ血清アルブミンを標準物質として使用して測定した。

【0070】

## 5. DerP1 ELISA

DerP1とProDerP1は、ELISAKitを用いて、DerP1特異的モノクローナル抗体5H8と4C1（インドア・バイオテクノロジーズ（Indoor Biotechnologies））を使用して検出した。アッセイで使用したDerP1標準物質（UVA93/03）は、2.5  $\mu$ g/mlの濃度であった。

30

【0071】

## 6. IgE結合活性

イムノプレートにDerP1またはProDerP1（500ng/ウェル）を用いて4 で一晩被覆した。次にプレートを100  $\mu$ l/ウェルのTBS-Tweenバッファー（50mM トリス塩酸（pH7.5）、150 mM NaCl、0.1% Tween80）を用いて5回洗浄し、1% BSAを補足した150  $\mu$ lの同じバッファーを用いて37 で1時間飽和させた。次に、ヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）に対するアレルギー患者からの1/8倍希釈した血清を、37 で1時間インキュベートした。実験で使用した95の血清のうち16の血清は、58.1 kU/L ~ 99 kU/Lの特異的抗ヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）IgE値（RASTアッセイ）の範囲内であり、79は100 kU/Lのカットオフ値より高かった。プレートをTBS-Tweenバッファーで5回洗浄し、マウス抗ヒトIgE抗体（サザンバイオテクノロジーズ・アソシエーツ（Southern Biotechnology Associates））とアルカリホスファターゼに結合したヤギ抗マウスIgG抗体（希釈、TBS-Tweenバッファーで1/7500、プロメガ（Promega））でインキュベートした後、アレルゲン - IgE複合体を検出した。ジエタノールアミンバッファー（pH9.8）に溶解したp - ニトロフェニルホスフェート基質（シグマ（Sigma））を使用して酵素活性を測定した。OD410nmをバイオラッドノバパス（BioRad Novapath）ELISAリーダーで測定した。

40

【0072】

50

IgE阻害アッセイのために、プレートと同じ濃度 ( $0.12 \mu\text{M}$ ) のDerP1またはProDerP1で被覆した。アレルギー患者 (RAST値  $> 100 \text{ kU/L}$ ) からの20のヒト血清のプールを、種々の濃度 ( $3.6 \sim 0.002 \mu\text{M}$ ) のDerP1またはrecProDerP1をインヒビターとして4で一晚プレインキュベートし、ELISAプレートに加えた。IgE結合を上記したように測定した。

【0073】

#### 7. ヒスタミン放出

ヒスタミン放出を、アレルギードナーの末梢へパリン化血からの白血球を使用して、かつヒスタミン - ELISA Kit (イムノテック (Immunotech)) により測定した。好塩基球を、recProDerP1またはDerP1の連続希釈物と37で30分間インキュベートした。界面活性剤IGEPA L CA-630 (シグマ (Sigma)) で細胞を破砕後、好塩基球中のヒスタミンの総量を定量した。

10

【0074】

#### 8. ProDerP1変性

組換えProDerP1を、50mMの -メルカプトエタノールの存在下で100で5分熱変性させた。

【0075】

#### 9. 免疫

CBA/Jマウス (6週齢) の群を、4週間毎に  $5 \mu\text{g}$  の異なるタンパク質または  $100 \mu\text{g}$  の異なるプラスミドDNAで免疫した。精製したアレルゲンを、アジュバントとしてミョウバンの存在下で注射した。対照として、マウスの群をミョウバンまたはpJW4304 DNAベクターで免疫した。マウスを7、14、21、28日に眼窩後静脈叢から出血させ、血清を採取した。

20

【0076】

#### 10. 気管支誘発

免疫の72時間後、すべてのマウスをプレキシガラスチャンバー ( $13 \times 19 \times 37.5 \text{ cm}$ ) に入れ、7日間続けてエアゾル化粗ヤケヒョウヒダニ (*D. pteronyssinus*) 抽出物に20分間にわたって暴露した。粗ダニ抽出物の濃度は  $300 \mu\text{g/ml}$  であった。超音波ネブライザー (Syst'AM) によりエアゾルを作成した。ネブライザーの出力は  $0.5 \text{ ml/分}$  であり、エアゾルの平均粒子サイズは  $1 \sim 5 \mu\text{m}$  であった。対照としてマウスにPBSを噴霧した。

【0077】

#### 11. DerP1特異的IgG、IgG1およびIgG2a

30

血清をELISAにより抗DerP1 IgG、IgG1、およびIgG2a抗体について測定した。イムノプレートをProDerP1 ( $500 \text{ ng/ウェル}$ ) で4で16時間被覆した。プレートをTBS-Tweenバッファ ( $50 \text{ mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.5$ )、 $150 \text{ mM}$  NaCl、 $0.1\%$  Tween80) を用いて5回洗浄し、 $1\%$  BSAを補足した  $150 \mu\text{l}$  の同じバッファを用いて37で1時間飽和させた。飽和バッファ中の血清の連続希釈物を37で1時間インキュベートした。プレートをTBS-Tweenバッファで5回洗浄し、抗原が結合した抗体を、アルカリホスファターゼ (希釈、TBS-Tweenバッファ中  $1/7500$ ) に結合した2次抗体 (ヤギ抗マウスIgG、プロメガ (Promega)、アメリカ合衆国) を用いて検出した。ジエタノールアミンバッファ ( $\text{pH} 9.8$ ) に溶解した p - ニトロフェニルホスフェート基質 (シグマ (Sigma)) を使用して酵素活性を測定した。OD<sub>415nm</sub>を、バイオラッドノバパス (BioRad Novapath) ELISAリーダーで測定した。

40

【0078】

上記のように被覆したイムノプレートとIgG1 - またはIgG2a特異的ビオチン標識モノクローナル抗体 (ラット抗マウス、希釈、TBS-Tweenバッファと  $1\%$  BSA中  $1/7000$ 、バイオソース (Biosource)) を2次抗体としてマウス抗体サブクラスを測定した。アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン ( $1/1000$  希釈、アマシャム (Amersham)) を各ウェルに加えた。酵素活性のアッセイは上記したように行った。すべての場合に、ELISA力価は、最大OD<sub>415</sub>値の50%に対応するシグナルを与える希釈率の逆数として同定した。

【0079】

#### 12. DerP1特異的IgEの測定

50



イムノプレートにラット抗マウスIgE (10ng/ウェル) で4で16時間被覆した。プレートをTBS-Tweenバッファー (50mM トリス塩酸 (pH7.5)、150mM NaCl、0.1% Tween80) を用いて5回洗浄し、1% BSAを補足した150μlの同じバッファーを用いて37で1時間飽和させた。飽和バッファー中の血清の連続希釈物を37で1時間インキュベートした。次にProDerP1を飽和バッファー中500ng/mlで加えた。結合したProDerP1を、ビオチン化抗DerP1モノクローナル抗体4C1 (インドア・バイオテクノロジーズ (Indoor Biotechnologies)) を添加して検出した。プレートをTBS-Tweenバッファーで5回洗浄し、抗体が結合した抗原を、アルカリホスファターゼに結合したストレプトアビジン (希釈、TBS-Tweenバッファー中1/7500) を添加して検出した。ジエタノールアミンバッファー (pH9.8) に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート基質 (シグマ (Sigma)) を使用して酵素活性を測定した。OD415nmを、バイオラッドノバパス (BioRad Novapath) ELISAリーダーで測定した。

10

【0080】

## 13. 増殖アッセイ

DerP1特異的T細胞増殖応答を測定するために、免疫したマウスを気管支誘発の前と後に屠殺した。脾臓からリンパ球を単離した。15mM ヘペスと30μM β-メルカプトエタノールを含有する10% FCSを有するRPMI1640で培養した細胞 ( $4 \times 10^5$ /ウェル、三重測定) を、96ウェルプレート中で粗ダニ抽出物の連続希釈物またはProDerP1で刺激した (25μg/mlの濃度から出発して、10を基数とする2回の希釈の抗原を試験した)。対照として、細胞をRPMI培地のみでインキュベートした。4日後、細胞に1μCi/ウェルの [ $^3$ H] チミジン (アマシャム (Amersham)) を16時間パルスした。細胞を採取し、 $^3$ H-チミジン取り込みをシンチレーションカウンターで測定した。4重のウェルの平均として増殖応答を計算し、刺激指数 (SI) として表した。刺激指数 > 2を陽性とし、見なした。

20

【0081】

## 14. サイトカインアッセイ

リンパ球培養上清中のIFN-γとIL-5のレベルをELISAアッセイで測定した。プレートを1μg/mlの抗マウスIL-5モノクローナル抗体 (ファーマーミンゲン (PharMingen)) と抗マウスIFN-γ (バイオソース (Biosource)) ポリクローナル抗体で被覆した。プレートをTBS-Tweenで5回洗浄し、150μlのTBS-Tween-BSAで37で1時間飽和させた。脾細胞培養上清の連続希釈物を加え、37で90分インキュベートした。ビオチン化抗マウスIL-5 (ファーマーミンゲン (PharMingen)、1μg/ml) または抗マウスIFN-γ (バイオソース (Biosource)、0.2μg/ml) 抗体を、プレートに37で1時間適用した。抗原-抗体複合体を、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジン (希釈 1/10000、アマシャム (Amersham)) とインキュベートして検出した。テトラメチルベンジジン (TMB) を基質 (シグマ (Sigma)) として使用して酵素活性を測定した。460nmでの吸光度をバイオラッドノバパス (BioRad Novapath) ELISAリーダーで測定した。サイトカイン濃度は、精製マウスIL-5またはIFN-γで得た標準曲線から内挿して求めた。

30

【0082】

## 15. 気管支肺胞洗浄

最後のエアゾル暴露の3日後に、マウスを放血させて屠殺した。直ちに気管カニューレを介して1mlのハンクス塩溶液 (HBSS) で、これを注入し吸引して回収を3回繰り返して、肺を洗浄した。洗浄液を400gで4で10分遠心分離した。細胞ペレットを300μlのハンクス塩溶液 (HBSS) に再懸濁し、細胞をトーマ血球計算器で計数した。50μlアリコートからのサイトスピン調製物を、鑑別細胞計数のためにMay-Grunwald Giemsa染色液で染色した。

40

【実施例2】

【0083】

大腸菌 (E. coli) 中のMBP-ProDerP1の発現

## 1. MBP-ProDerP1発現ベクターの構築

ProDerP1 (1~302aa) をコードする完全な合成cDNA (配列番号1) を、真核生物発現プ

50

ラスミドpNIV4846 (ヒト化ProDerP1コードカセットを有するpEE 14由来発現プラスミド) (M. Massaerら、International Archives of Allergy and Immunology, 2001, 125:32-43) からEagIとXbaIで消化後に単離した。XbaIで制限切断する前に、大きい断片のDNAポリメラーゼ (クレノウ) を使用してDNAを平滑末端とした。921bpの断片をpMAL-c2E (ニューイングランドバイオラボズ (New England Biolabs)) のAsp718 (平滑末端) - XbaI部位に挿入して、MBP遺伝子の下流にpNIV4854を得た。配列番号1のcDNAによりコードされるProDerP1のアミノ酸配列を図2に示す (配列番号2)。

#### 【0084】

### 2. 部位特異的突然変異誘発

変異を含有する合成オリゴヌクレオチドにより3つのシステインコドンの1つを有するDNA断片を置換した後に、4、31または65位 (成熟ProDerP1番号付け、ProDerP1の84、111または145位に対応する) のDerP1システイン残基の突然変異誘発を行った。以下のオリゴヌクレオチドを使用した: 5'TTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCCGTATCAACGGCAATGCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGGACCGTGACTCCCATCCGCATGC3' (フォワード) と 5'CGGATGGAGTCACGGTCCTCATCTGGCGCAGATCAATCTCAGCGGGGGCATTGCCGTTGATACTACGGGCGTTGGTCTCCGCGTTGAGATCGAAACTGGGTC3' (リバーズ) で、システイン残基4からアルギニンへの変異 (C4R) のための110bpのAflIII-SphI断片を作成する、5'CAAGGCGGCCGTGGGTCTTGTGGGCCTTTTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGAGCCTGGACCTCGC3' (フォワード) と 5'TCAGCGAGGTCCAGGCTCTGATTCCGATACGCGAGGTATGCCGACTCTGTGCGGGCCACGCCTGAAAAGGCCCAACAAGACCCACGGCCGCCTTGCATG3' (リバーズ) で、システイン残基31からアルギニンへの変異 (C31R) のための98bpのSphI-BlnI断片を作成する、5'TGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCTCCCAACACGATGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATA3' (フォワード) と 5'CTGGATGTATTCGATACCTCTGGGAATCGTATCCCCATGACATCCGTGTTGGGAGGCACGGTCAACGCGCTCCTGC3' (リバーズ) で、システイン残基65からアルギニンへの変異 (C65R) のための82bpのAflIII-SphI断片を作成する。

#### 【0085】

MBP遺伝子の下流にProDerP1カセットを含有し、それぞれ変異C4R、C31R、およびC65Rを有する得られたプラスミドを、pNIV4870、pNIV4871およびpNIV4872と呼んだ。すべての3つの変異をDNA配列決定により確認した。それぞれC4R、C31R、およびC65R変異を有する変異ProDerP1アミノ酸配列を、それぞれ配列番号3、配列番号5および配列番号7に示す。対応するコード核酸配列を配列番号4 (C4R変異)、配列番号6 (C31R変異) および配列番号8 (C65R変異) に示す。

#### 【0086】

### 3. 野生型と変異体MBP-ProDerP1の発現と精製

異なる組換え発現ベクターを含有する大腸菌 (E. coli) を、100 µg/mlアンピシリンを有する869培地 (A. Jacquentら、Prot. Exp. Purif. 1999, 17:392-400) 中で37℃で一晩増殖させた。次に細胞を1:100希釈し、600nmでの光学密度0.4~0.6まで37℃で増殖させた。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度0.3mMまで加えた。2時間インキュベーション後、細胞を10000rpmで15分遠心分離して採取した。

#### 【0087】

1リットルの培養物からの細菌細胞ペレットを、1mMアプロチニンとAEBSFを含有する20mMトリス塩酸 (pH7.5) に再懸濁し、細胞破碎機 (コンスタントシステムズ社 (Constant Systems Ltd.)、ウォーウィック、英国) を使用して、1800バールの圧力で破碎した。溶解物を150,000gで60分超遠心分離した。超遠心分離から得られたペレットを20mMトリス塩酸 (pH7.5) で洗浄した。不溶性タンパク質を、6M尿素を含有する20mMトリス塩酸 (pH7.5) で4℃で一晩抽出した。懸濁液を150,000gで60分超遠心分離した。上清を、20mMトリス塩酸 (pH7.5)、200mM NaCl、1mM EDTAに対して一晩直接透析した。溶液を遠心分離して沈殿したタンパク質を除去し、同じバッファーで平衡化したアミロース樹脂 (1×15cm) に直接かけた。A280nmがベースラインに達するまで、出発バッファーでカラムを洗浄した。カラムバッファー中10mMのマルトースを添加してタンパク質を溶出した。融合タ

40

50

ンパク質を含有する画分をプールし、濃縮した。精製したタンパク質を -20 で保存した。

### 【実施例 3】

#### 【0088】

CHO細胞中の3つの異なるProDerP1変異体の発現

#### 1. 部位特異的突然変異誘発

4、31または65位（成熟DerP1番号付け、ProDerP1の84、111または145位に対応する）のDerP1システイン残基の突然変異誘発を、プラスミドpNIV4846に導入した。MBP（実施例IIを参照）遺伝子の下流にDerP1カセットを含有し、それぞれ変異C4R、C31R、およびC65Rを有するプラスミドpNIV4870、pNIV4871、およびpNIV4872をそれぞれ、SfuI-XhoIで制限切

断して、714 bpの断片を単離した。精製したDNA断片を、あらかじめ同じ制限酵素で切断したプラスミドp4846中に挿入した。DerP1変種C4R、C31RおよびC65Rを含有する得られた

プラスミドをpNIV4873、pNIV4875、およびpNIV4874と呼んだ。

10

#### 【0089】

#### 2. ProDerP1を産生する安定なCHO-K1株の一過性トランスフェクションと選択

プラスミドpNIV4873、pNIV4875、およびpNIV4874によるDerP1の産生を調べるために、COS細胞をリポフェクションにより一過性にトランスフェクトした。安定なDerP1発現のために、CHO-K1細胞をリポフェクションにより異なるプラスミドを用いてトランスフェクトした。3週間の25 μM メチオニルスルホキシミン（MSX）選択後、100 μM MSXで1ラウンドの遺伝子増幅を行った。

20

### 【実施例 4】

#### 【0090】

変性したProDerP1はIgG結合反応性を示すが、アレルギー血清に対してIgE結合反応性を示さない。

#### 【0091】

変性型のProDerP1が低アレルゲン性ワクチンとして使用できるかどうかを調べるために、変性（50mM の β-メルカプトエタノールの存在下で100 で5分）ProDerP1のIgG - およびIgE結合反応性をELISA試験で測定した。図1に示すように、変性ProDerP1は、未変性のProDerP1上に存在するIgGエピトープの主要な部分を保存した。一方、変性アレルゲンはそのIgE結合反応性をほとんど無くした。我々のデータは、変性ProDerP1がProDerP1の低アレルゲン性変種であるかも知れないことを示唆する。

30

### 【実施例 5】

#### 【0092】

MBP-ProDerP1のIgE反応性

実験の目的は、MBP-ProDerP1と天然のDerP1のIgE反応性を比較することであった。アレルギー患者の血清からの特異的IgEとのMBP-ProDerP1の反応性を、直接ELISA（ここで、イムノプレートにDerP1またはMBP-ProDerP1で直接被覆した）で測定した。図2は、DerP1とMBP-ProDerP1へのIgE結合の強い相関を示す。

### 【実施例 6】

#### 【0093】

MBP-ProDerP1変異体のIgE結合反応性

MBP-ProDerP1変異体のIgE結合能を、イムノプレートを異なる型のMBP-ProDerP1で直接被覆した直接ELISAアッセイで測定した。RAST値 > 100kU/Lの20人のヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）アレルギー患者の血清から作製した血清プールを、このアッセイで使用した。図3に示すように、種々のC31RとC65RのIgE結合反応性は、野生型のMBP-ProDerP1と比較して5%まで劇的に低下した。残基システイン4をアルギニンに変異させると、MBP-ProDerP1へのIgEの反応性が無くなった（残り0%）ことが目立つ。MBPまたは無関係のタンパク質と融合したMBPのIgE介在免疫認識は無かったため、IgE反応性はProDerP1残基に特異的であった。20人の他の患者から別の血清プールで同様の結果が得られた。

40

### 【実施例 7】

50

## 【 0 0 9 4 】

種々の型のProDerP1のヒスタミン放出活性

天然のDerP1のアレルゲン活性をProDerP1の組換え変異誘導体のアレルゲン活性と比較するために、一人のアレルギー患者からの好塩基球を、種々の濃度のアレルゲンを用いてin vitroで抗原刺激し、放出されたヒスタミンを測定した。図4に示すように、天然のDerP1は、1 ng/mlの濃度で好塩基球からのヒスタミン放出を誘導することができた。これに対して組換え変異型のProDerP1は、1000～10000倍高い濃度でのみヒスタミンを放出することができた。これらの結果は、ProDerP1変異体が天然のDerP1より低いIgE結合反応性を示すことを明らかに証明した。

## 【 実施例 8 】

10

## 【 0 0 9 5 】

種々の型のProDerP1を用いる免疫原性実験

## 1. ハウスダストダニアレルギーの動物モデル

ハウスダストダニアレルギーの動物モデルが開発されている。CBA/Jマウスにミョウバンをアジュバントとした精製したDerP1を注射した。1週間間隔で4回注射した後、ヤケヒョウヒダニ(D. pteronyssinus)抽出物を用いてマウスに一連の気管支誘発を行った(図5)。このモデルを使用して、異なる組換え型のDerP1ならびに異なるDNAを、ハウスダストダニアレルギーに対する予防ワクチンとして試験した。

## 【 0 0 9 6 】

## 2. ワクチン製剤

20

表1：図5に記載のハウスダストダニアレルギー動物モデルで試験したタンパク質およびDNAワクチン製剤

【 表 1 】

タンパク質	DNA	アジュバント	注射方法
天然の DerP1		ミョウバン	IP
ProDerP1 未変性		ミョウバン	IP
ProDerP1 未変性		—	IM
ProDerP1 変性		ミョウバン	IP
MBP-ProDerP1		ミョウバン	IP
MBP-ProDerP1 C4R		ミョウバン	IP
MBP-ProDerP1 C31R		ミョウバン	IP
MBP-ProDerP1 C65R		ミョウバン	IP

30

## 【 0 0 9 7 】

IP = 腹腔内注射

IM = 筋肉内注射

## 3. 抗体応答 - 結果

天然のDerP1を4回注射して免疫したマウスは、高力価のIgGとIgG1、低力価のIgG2a、および多量のIgE抗体を産生し、天然のDerP1が強いTh2免疫応答を誘発することを示す(表2と4)。

## 【 0 0 9 8 】

未変性のまたは変性ProDerP1を注射したマウスでは、抗DerP1 IgGとIgG1抗体応答もまた強かった。未変性のProDerP1を注射後、IgG2a力価は、DerP1で得られたものよりわずかに

40

50

高く、IgE力価はDerP1で得られたものと同等であるかまたはわずかに低かった。未変性のProDerP1免疫マウスと比較して、変性ProDerP1を注射したマウスは、高いIgG2a力価および非常に低いIgE抗体を産生した。予測されたように、ミョウバンの非存在下でProDerP1により免疫すると、弱い免疫応答が誘導された(表4)。

【0099】

MBP-ProDerP1野生型(WT)、C4R、C31RおよびC65R感作マウスは、特異的IgGおよびIgG1抗体の同様の産生を示した(表3)。最も高いIgG2a力価は、MBP-ProDerP1 WTとC31Rで免疫した群で観察された。どのMBP-ProDerP1変種を注射しても、特異的IgE力価は低かった。ProDerP1をコードするプラスミドでマウスを免疫した後に、同様の結果が得られた。

【0100】

表2：異なる抗原で免疫したマウスからの特異的抗DerP1抗体の力価。IgE力価については結果を1/10希釈血清のOD415nm値として表す。PBSまたはヤケヒョウヒダニ(D. pteronyssinus)抽出物(HDM)で気管支誘発した後にも力価を測定した。

【表2】

抗原	採血	抗原刺激	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
DerP1	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		214	900	< 50	1.1
	3		700	6062	< 50	0.2
	4		2500	24390	100	0.6
	5	PBS	8670	16340	300	0.7
		HDM	8230	17440	300	0.6
ProDerP1 未変性	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		301	1146	< 50	1.1
	3		800	6860	86	0.3
	4		2500	28545	203	0.5
	5	PBS	8266	25500	600	0.3
		HDM	11880	38310	600	0.6
変性	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		330	861	120	0.2
	3		966	3402	210	0.07
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	16380	54040	2700	0.1
		HDM	14200	32140	2700	0.05

【0101】

表3：異なる抗原で免疫したマウスからの特異的抗DerP1抗体の力価。IgE力価については結果を1/10希釈血清のOD415nm値として表す。PBSまたはヤケヒョウヒダニ(D. pteronyssinus)抽出物(HDM)で気管支誘発した後にも力価を測定した。

【表3】

抗原	採血	抗原刺激	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
MBP-ProDerP1 WT	2		637	3351	144	0.046
	3		4444	24720	757	0.039
	4		2500	24390	100	0.6
	5	PBS	6151	29500	2899	0,13
		HDM	3437	22210	1496	0,27
MBP-ProDerP1 C4R	2		583	2212	95	0
	3		1123	6131	356	0.021
	4		2500	28545	203	0.5
	5	PBS	2064	9077	624	0,004
		HDM	2418	14390	635	0,029
MBP-ProDerP1 C31R	2		1221	4572	144	0.017
	3		6472	40405	1311	0.029
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	2897	10880	857	0,063
		HDM	5508	24300	1959	0,074
MBP-ProDerP1 C65R	2		202	887	< 50	0.022
	3		1252	5718	363	0.066
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	782	3958	87	0,108
		HDM	3109	16250	430	0,117

10

20

30

## 【 0 1 0 2 】

表 4 : 異なる抗原で免疫したマウスからの特異的抗DerP1抗体の力価。IgE力価については結果を1/10希釈血清のOD415nm値として表す。PBSまたはヤケヒョウヒダニ (D. pteronyssinus) 抽出物 (HDM) で気管支誘発した後にも力価を測定した。

## 【 表 4 】

抗原	採血	抗原刺激	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
DerP1	2		201	1135	< 20	0.852
	3		3264	18002	< 50	0.34
	4		8271	43306	< 50	0.59
	5	PBS	10072	57670	< 100	0.44
		HDM	6058	72810	< 100	0.68
ProDerP1 ミョウバン	2		929	7422	159	0.8
	3		5061	27244	586	0.37
	4		15110	68960	1016	0.46
	5	PBS	10900	57255	1190	0.421
		HDM	16770	79460	1125	0.485
ProDerP1 (アジュバントなし)	2		136	774	< 20	0.58
	3		1389	8571	104	0.13
	4		4704	14126	120	0.17
	5	PBS	3587	16930	105	0.28
		HDM	3880	20737	100	0.25

10

20

## 【 0 1 0 3 】

## 4. T細胞増殖応答 - 結果

エアゾル抗原刺激の前（対照）および後に、免疫マウスから単離した脾細胞を、ProDerP1 またはヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）抽出物で刺激してT細胞増殖応答について調べた。結果を表5（刺激指数）と表6（サイトカイン）に示す。

30

## 【 0 1 0 4 】

異なる組換えProDerP1変異体で免疫したマウスでは、アレルゲン特異的T細胞応答が検出された。最も強い応答は、ProDerP1で脾細胞を刺激した時に観察された。T細胞反応性は、抗原刺激とは独立に現れた。

## 【 0 1 0 5 】

表5のこれらの結果は、異なる型のProDerP1が天然のDerP1と共通のT細胞エピトープを有することを示す。さらに熱変性または部位特異的突然変異誘発によるProDerP1の破壊は、ProDerP1 T細胞反応性を変化させず、これらの型がT細胞応答を刺激することができる非常に低いIgE結合反応性を有する低アレルゲンであることを確認している。

40

## 【 0 1 0 6 】

表5：

PBSまたはヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）抽出物で抗原刺激したかまたはしなかったワクチン接種マウス。脾細胞を単離し、精製したProDerP1またはヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）抽出物でin vitroで再刺激した。刺激指数を[<sup>3</sup>H]チミジン取り込みにより測定した。-：データは無い。これらの結果は、1つだけではない異なる実験から得られる。従ってサイトカインアッセイはすべての群で比較することはできない。

## 【表5】

抗原	刺激抗原の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	S.I. (ProDerP1 で刺激)			S.I. (HDM 抽出物で刺激)		
		エアゾル			エアゾル		
		無し	PBS	HDM	無し	PBS	HDM
MBP-ProDerP1 WT	50	7.3	14.97	20.8	-	-	-
MBP-ProDerP1 C4R	50	19.1	9.7	16.3	-	-	-
MBP-ProDerP1 C31R	50	5.4	10.0	14.7	-	-	-
MBP-ProDerP1 C65R	50	6.8	8.8	13.0	-	-	-
DerP1	40	-	1.6	17.5	-	1.6	7.5
ProDerP1	40	-	30.9	11.5	-	2.8	2.8
ProDerP1 変性	40	-	24.0	15.9	-	1.7	1.4
ミョウバン	40	-	4.2	4.6	-	2.0	1.3

10

20

## 【 0 1 0 7 】

再刺激した脾細胞の培養上清中のサイトカイン IL-5 と IFN の存在を、ELISA で測定した (表 6)。比  $[\text{IFN}]/[\text{IL-5}]$  を比較すると、天然の DerP1 または ミョウバン をアジュバントとした ProDerP1 を用いるワクチン接種により、IFN より IL-5 の良好な産生を誘導すると結論できた。異なる型の MBP-ProDerP1 (変異体と野生型) ならびに変性 ProDerP1 は、同等レベルの両方のサイトカインを誘導した。

## 【 0 1 0 8 】

表 6 : ProDerP1 再刺激脾細胞の上清の  $[\text{IL-5}]$  と  $[\text{IFN}]$ 。これらの結果は、1 つだけではない異なる実験から得られる。従ってサイトカインアッセイはすべての群で比較することはできない。

30

## 【 表 6 】

抗原	$[\text{IL-5}]$ (pg/ml)			$[\text{IFN}\gamma]$ (pg/ml)		
	エアゾル			エアゾル		
	無し	PBS	HDM	無し	PBS	HDM
MBP-ProDerP1	420	165	929	987	1076	1282
MBP-ProDerP1C4R	330	51	308	551	1366	1177
MBP-ProDerP1C31R	430	202	1141	1348	1281	3392
MBP-ProDerP1C65R	0	0	953	0	0	1161
ミョウバン	0	0	0	0	0	0
DerP1	75	45	495	0	0	190
ProDerP1	0	355	400	0	125	210
ProDerP1 変性	-	850	736	-	822	1119

40

## 【 0 1 0 9 】

50



#### 5. 気管支肺胞洗浄 - 結果

天然のDerP1による感作とエアゾル化ハウスダストダニ抽出物への以後の暴露は、有意に高い気管支肺胞細胞数を誘導した（表7）。エアゾル化ハウスダストダニ抽出物への7回の暴露は、DerP1をワクチン接種した動物でのみ気道の好酸球増加を誘導することが証明された。この群では、DerP1感作動物を噴霧しなかった時またはエアゾル化PBSに暴露しなかった時、気道の好酸球増加は観察されなかった。

【0 1 1 0】

異なる型のProDerP1を用いるワクチン接種は、エアゾル化HDM抽出物への暴露後も気道の好酸球増加を防止した。

【0 1 1 1】

表7：PBSまたはハウスダストダニ抽出物エアゾルに暴露した、異なる抗原で免疫したマウスの気管支肺胞洗浄液の性状解析

【表7】

抗原	エアゾル	リンパ球 (%)	好酸球 (%)	好中球 (%)	マクロ ファージ (%)	単球 (%)	総細胞数 (10 <sup>5</sup> /ml)
DerP1	無し	86	4	0	6	3	2.2
	HDM	13	68	7	6	6	167
	PBS	90	0	2	4	4	4.8
ProDerP1	無し	90	0	0	7	3	3.2
	HDM	69	7	12	3	10	5.1
	PBS	76	5	4	7	8	7.6
ProDerP1 変性	無し	51	5	2	22	20	4
	HDM	52	4	26	10	7	6.9
	PBS	67	2	2	20	9	5.2
ミョウバン	none	88	1	4	7	0	3.6
	HDM	80	0	4	14	1	1.5
	PBS	88	1	5	5	1	1.2
MBP- ProDerP1	無し	85	2	4	7	0	1.5
	HDM	70	3	14	8	5	2.1
	PBS	88	1	6	5	0	0.6
MBP- ProDerP1 C4R	無し	90	2	4	4	1	2.2
	HDM	71	2	14	11	1	2
	PBS	80	2	7	10	1	4.5
MBP- ProDerP1 C31R	無し	79	1	14	7	0	1.3
	HDM	65	4	27	5	1	2
	PBS	87	2	7	5	1	3
MBP- ProDerP1 C65R	無し	85	0	4	10	1	2.4
	HDM	84	1	7	7	1	2.4
	PBS	84	1	4	12	0	1.5

10

20

30

40

50

## 【実施例 9】

## 【0112】

核酸ワクチン接種 (NAVAC) のための発現プラスミド

1. 核酸ワクチン接種のためのプラスミドをコードするProDerP1の構築

ProDerP1コードカセット (1 ~ 302aa) をプラスミドpNIV4846 (上記参照) から切り出し、HindIIIとBglIIIで制限切断し、あらかじめHindIIIとBglIIIで切断しておいたプラスミドpJW4304中に挿入した。得られたプラスミド (pNIV4848と名付けた) を、DNA配列決定により証明した。

## 【0113】

2. 部位特異的突然変異誘発

4、31または65位 (成熟ProDerP1番号付け、ProDerP1の84、111または145位に対応する) のDerP1システイン残基の突然変異を、プラスミドpNIV4846に導入した。MBP遺伝子の下流

にProDerP1カセットを含有し、それぞれ変異C4R、C31R、およびC65Rを有するプラスミドpNIV4870、pNIV4871およびpNIV4872を、それぞれAflIII-BamHIで制限切断して、699 bpの断片を単離した。pNIV4846をAflIII-HpaIで消化して480 bpの断片を単離した。2つの精製DNA断片を、あらかじめHpaI-BamHIで切断しておいたプラスミドpJW4304中に挿入した。ProDerP1変種C4R、C31RおよびC65Rを含有する得られたプラスミドを、pNIV4879、pNIV4880、およびpNIV4881と呼んだ。

#### 【実施例 10】

##### 【0114】

ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 中のProDerP1の発現

#### 1. ProDerP1発現ベクターの構築

pNIV4846からのProDerP1コードカセット (最適化した哺乳動物コドン使用を有する完全長 1 ~ 302aa ProDerP1 cDNA) を以下のプライマーを使用してPCRにより増幅した: 5'ACTGACAGGCTCGGCCGAGCTCCATTAA3' (太字はStuI切断部位、フォワード) と 5'CAGTCACCTAGGTCTAGACTC GAGGGGAT3' (太字はAvrII切断部位、リバーズ)。増幅した断片をpCR2.1 TOP0クローニングベクター中にクローン化した。正しいProDerP1カセットをDNA配列決定により証明した。組換えTOP0ベクターをStuI-AvrIIで消化して918bp断片を作成し、これをStuI-AvrIIで制限切断したpPIC9K発現ベクター中に導入した。得られたプラスミド (pNIV4878) は、エス・セレビスシェ (*S. cerevisiae*) 因子の下流にProDerP1カセットを含有する。

##### 【0115】

#### 2. 部位特異的突然変異誘発

非グリコシル化ProDerP1産生のための発現プラスミド (N52Q、成熟DerP1番号付け) を、pNIV4878から重複伸長PCRにより4つのプライマーのセットを使用して得た。以下のプライマー: 5'GGCTTTCGAACACCTTAAGACCCAG3' (プライマー1、太字はAflIII制限部位、フォワード) と 5'GCTCCCTAGCTACGTA TCGGTAATAGC3' (プライマー2、太字はSnaBI制限部位、リバーズ) を使用して、ProDerP1アミノ酸配列71~176をコードする317bp断片を増幅した。以下のプライマー: 5'CCTCGCGTATCGGCAACAGAGCCTGGACC3' (プライマー3、太字は変異N52Q、フォワード) と 5'GGTCCAGGCTCTGTTGCCGATACGCGAGG3' (プライマー4、太字は変異N52Q、リバーズ) を使用して、ProDerP1配列に変異N52Qを導入した。

##### 【0116】

変異した317bpのAflIII-SnaBI断片を3工程法により作成した。PCR no1では、プライマー1と4をpNIV4878と混合して~200bpの断片を産生した。PCR no2では、プライマー2と3をpNIV4878と混合して~140bpの断片を産生した。2つのPCR生成物をアガロースゲルで精製し、第3ラウンドのPCRの鋳型として使用して~340bpの断片を得た。この精製した断片を、pCR2.1 TOP0クローニングベクター (インビトロゲン (Invitrogen)) 中にクローン化した。変異をDNA配列決定により証明した。組換えTOP0ベクターをAflIII-SnaBIで消化して317bpの断片を得て、これを同様に消化したpNIV4878に連結した。得られたプラスミド (pNIV4883) は、エス・セレビスシェ (*S. cerevisiae*) 因子のProDerP1 N52Qを含有する。4、31または65位 (成熟DerP1番号付け) にDerP1システイン残基の変異を有するProDerP1の非グリコシル化変種を得るために、同じセットのプライマーを使用してpNIV4873、pNIV4875、およびpNIV4874を用いて重複伸長PCRを行った。得られたプラスミドpNIV4884、4885、および4886はそれぞれ、ProDerP1 N52Q C4R、N52Q C31R、およびN52Q C65Rをコードする。

##### 【0117】

#### 2. ピー・パストリス (*P. pastoris*) の形質転換

スフェロプラスチ形質転換法を使用してプラスミドpNIV4878をピー・パストリス (*P. pastoris*) 中に導入した。ヒスチジノールデスヒドロゲナーゼ (His+) 原栄養性について形質転換体を選択した。上昇する濃度のG418を含有する寒天上にクローンを播いて、ゲネチシン (G418) 耐性についてHis+形質転換体のスクリーニングを行った。同じ方法を使用してProDerP1 N52Q、ProDerP1 N52Q C4R、N52Q C31R、およびN52Q C65Rをコードするプラス

10

20

30

40

50

ミドを用いて形質転換を行った。

【 0 1 1 8 】

### 3. 組換え酵母によるProDerP1の産生

G418耐性クローンを30℃でBMG培地でOD600nm = 2 ~ 6まで増殖させた。遠心分離して細胞を集め、100mlのBMG培地でOD600nm = 1まで再懸濁した。メタノール0.5%を6日間毎日添加して、ProDerP1発現を誘導した。遠心分離して上清を集め、精製するまで-20℃で保存した。

【 0 1 1 9 】

### 4. 酵母培養物上清からのProDerP1の精製

上清を水で10回希釈し、pHを9に調整後、20mM トリス塩酸 (pH9) で平衡化したQセファロースカラム直接にのせた。出発バッファーでカラムを洗浄した。バッファー中の段階的に上昇するNaCl濃度によりタンパク質溶出を行った。ProDerP1濃縮画分をプールし、フィルトロン (Filtron) 膜 (オメガセリエ (Omega serie)、カットオフ: 10kD) で限外ろ過して濃縮した。PBS (pH7.3) で平衡化したスーパーデックス-75カラム (1 × 30cm、ファルマシア (Pharmacia)) でゲル濾過クロマトグラフィーをしてProDerP1精製を行った。精製したProDerP1を濃縮し、-20℃で保存した。

10

配列情報

**SEQ ID NO:1**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTTGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGCGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

10

20

**SEQ ID NO:2**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210

30

40

Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

10

**SEQ ID NO:3.**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Arg Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

20

30

**SEQ ID NO:4**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCC  
 251 GTAGTATCAACGGCAATGCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG

40

301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

10

# SEQ ID NO:5

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Arg Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

20

30

40

**SEQ ID NO:6**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTTGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCCGTGGGTCTTGTTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCGAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTACTCGAACGCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

10

20

**SEQ ID NO:7**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Arg Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile ~~Ser~~ Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240

30

40



Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 301  
 Ile Leu 302

**SEQ ID NO:8**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA 10  
 51 GAGCTATGCCACCTTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG 20  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCGAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGCGTTACTCGAACGCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG 30  
 901 ATCCTGTAA

**SEQ ID NO:9.**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135 40

Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
Arg His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

10

**SEQ ID NO:10**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCGAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGCCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 CGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTACTCGAACGCCCGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

20

30

40

**SEQ ID NO:11**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45

Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
Gln Ser Arg Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
Ile Leu 302

10

20

**SEQ ID NO:12**

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTTCTTGG  
101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC  
201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT  
251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTGGGCCTT  
351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCGTATCGGAATCAGA  
401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCCGTC  
551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCGAATTATTGCCAGATCTAC  
601 CCCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
651 CATCGCTGTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC  
751 GCGGTCAACATCGTGGGTACTCGAACGCCCAGGGGTGGACTACTGGAT  
801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
901 ATCCTGTAA

30

40

**SEQ ID NO:13**

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe	15	
Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys	30	
Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala	45	
Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg	60	
Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe	75	
Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala	90	
Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile	105	10
Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val	120	
Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu	135	
Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly	150	
Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His	165	
Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu	180	
Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn	195	
Tyr <u>Arg</u> Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala	210	
Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys	225	20
Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln	240	
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val	255	
Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn	270	
Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala	285	
Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val	300	
Ile Leu 302		

**SEQ ID NO:14**

1	CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA	30
51	GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG	
101	AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC	
151	GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTTGATGAGCGCCGAGGC	
201	TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT	
251	GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG	
301	ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTTGGGCCTT	
351	TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA	
401	GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA	40
451	TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG	
501	CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC	
551	GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTCCAATTATCGTCAGATCTAC	
601	CCCCCTAATGCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC	

651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG  
701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC  
751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
901 ATCCTGTAA

10

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】CHO細胞中で発現された変性ProDerP1のIgGとIgE結合反応性。イムノプレートに500ng/ウェルの精製した未変性もしくは変性ProDerP1で被覆し、ヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）に対して放射性アレルゴソルベント陽性の血清（1：8希釈）とともにインキュベートした。結合したIgEまたはIgGを、抗ヒトIgEまたはIgGおよびアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体とともにインキュベートし、次に酵素アッセイを行って定量した。結果をOD410nm値として示す。

【図2】MBP-ProDerP1と天然のDerPのIgE反応性の相関。イムノプレートを500ng/ウェルの精製したDerPまたはMBP-ProDerP1で被覆し、ヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）に対して放射性アレルゴソルベント陽性の95の血清（1：8希釈）とともにインキュベートした。結合したIgEを、抗ヒトIgEおよびアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体とともにインキュベートし、次に酵素アッセイを行って定量した。結果をOD410nm値として示す。

20

【図3】突然変異C4R、C31RおよびC65Rを有するMBP-ProDerP1変異体のIgE結合反応性。イムノプレートを500ng/ウェルの野生型または突然変異MBP-ProDerP1で被覆し、ヤケヒョウヒダニ（*D. pteronyssinus*）に対して放射性アレルゴソルベント陽性の20の血清のプール（1：8希釈）とともにインキュベートした。結合したIgEを、抗ヒトIgEおよびアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体とともにインキュベートし、次に酵素アッセイを行って定量した。結果をOD410nm値として示す。

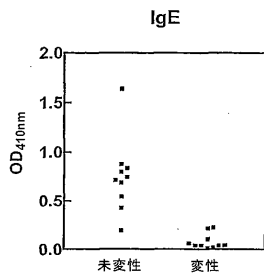
30

【図4】アレルゲンのヒスタミン放出活性。一人のアレルギー性ドナーの末梢血から単離した好塩基球を、異なるアレルゲンの連続希釈物で刺激した。細胞から放出されたヒスタミンをELISAにより測定した。界面活性剤IGEPAL CA-630で細胞を破碎後、好塩基球中のヒスタミンの総量を定量した。結果は、アレルゲンにより放出されたヒスタミンの総ヒスタミンに対する比として示す。

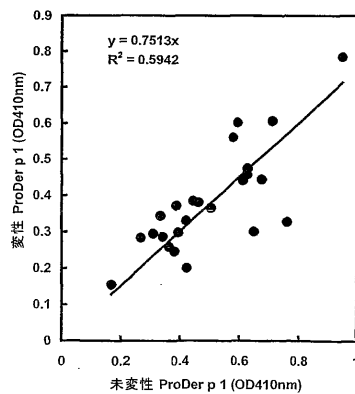
【図5】ハウスダストダニアレルギーの動物モデルの模式図。

## 【 図 1 】

図1: CHO 細胞中で発現された変性 ProDerP1 の IgG と IgE 結合反応性

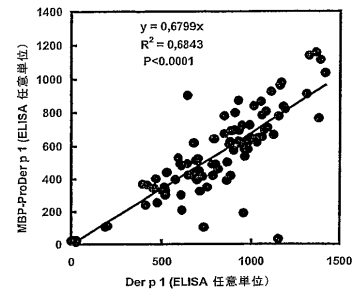


IgG



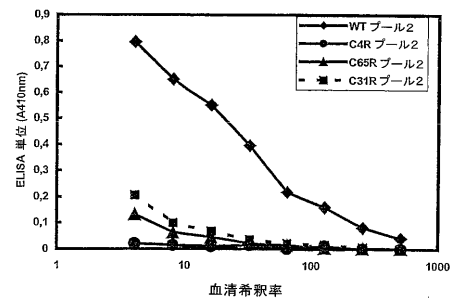
## 【 図 2 】

図2: MBP-ProDerP1 と天然の DerP1 の IgE 反応性の相関



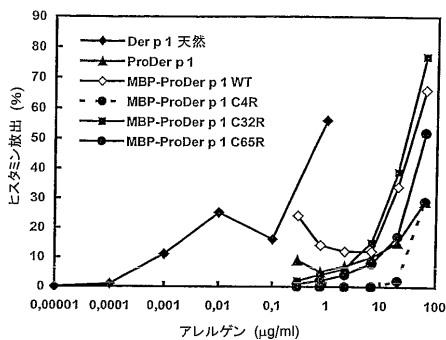
## 【 図 3 】

図3: 突然変異 C4R、C31R および C65R を有する MBP-ProDerP1 変異体の IgE 結合反応性



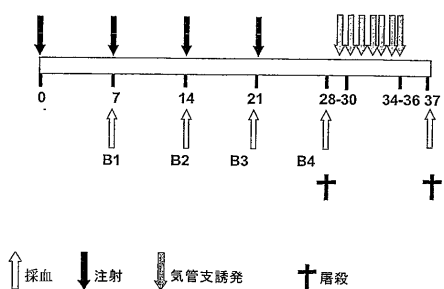
## 【 図 4 】

図4: アレルゲンのヒスタミン放出活性



## 【 図 5 】

図5: ハウスダストダニアレルギーの動物モデルの模式図



## 【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  
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

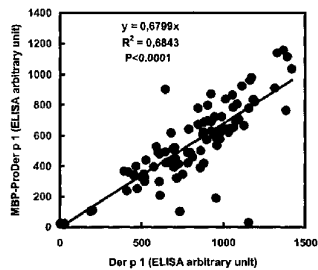
(10) International Publication Number  
WO 03/016340 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 14/435 Professors Jeener et Brachet 12, B-6041 Gosselies (BE); **MAGI, Mauro** [IT/BE]; Rue des Professeurs Jeener et Brachet 12, B-6041 Gosselies (BE).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/09122
- (22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002) (74) Agent: **LUBIENSKI, Michael, John**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01201508 17 August 2001 (17.08.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BOLLEN, Alex** [BE/BE]; Rue des Professeurs Jeener et Brachet 12, B-6041 Gosselies (BE). **JACQUET, Alain** [BE/BE]; Rue des
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW).

[Continued on next page]

(54) Title: DER p1 AND PRODER p1 ALLERGEN DERIVATIVES

Correlation between the IgE reactivity of MBP-ProDer p1 and natural Der p1.



(57) Abstract: The present invention provides a novel treatment for allergy comprising the provision of a recombinant Der p1/ProDer p1 allergen derivative with hypoallergenic activity. Pharmaceutical compositions comprising said mutant allergens which stimulate a Th1-type immune response in allergic or naïve individuals thereby reducing the potential for an allergic response upon contact with the wild-type allergen, are also provided.

WO 03/016340 A1

---

**WO 03/016340 A1** 

TR), OAPI patent (BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NI, SN, TD, TG). *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.*

**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## DERP1 AND PRODERP1 ALLERGEN DERIVATIVES

The present invention relates to novel prophylactic and therapeutic formulations, said formulations being effective in the prevention and/or the reduction of allergic responses to specific allergens. Further this invention relates to hypoallergenic recombinant derivatives of the major protein allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*, allergen DerP1 and its precursor form ProDerP1. In particular the derivatives of the invention include physically modified DerP1 or ProDerP1 such as the thermally treated protein; or genetically modified recombinant DerP1 or ProDerP1 wherein one or more cystein residues involved in disulphide bond formation have been mutated. Methods are also described for expressing and purifying the DerP1 and ProDerP1 derivatives and for formulating immunogenic compositions and vaccines.

Allergic responses in humans are common, and may be triggered by a variety of allergens. Allergic individuals are sensitised to allergens, and are characterised by the presence of high levels of allergen specific IgE in the serum, and possess allergen specific T-cell populations which produce Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13). Binding of IgE, in the presence of allergen, to FcεRI receptors present on the surface of mastocytes and basophils, leads to the rapid degranulation of the cells and the subsequent release of histamine, and other preformed and neoformed mediators of the inflammatory reaction. In addition to this, the stimulation of the T-cell recall response results in the production of IL-4 and IL-13, together cooperating to switch B-cell responses further towards allergen specific IgE production. For details of the generation of early and late phase allergic responses see Joost Van Neeven *et al.*, 1996, Immunology Today, 17, 526. In non-allergic individuals, the immune response to the same antigens may additionally include Th1-type cytokines such as IFN-γ. These cytokines may prevent the onset of allergic responses by the inhibition of high levels of Th2-type immune responses, including high levels of allergen specific IgE. Importantly in this respect, is the fact that IgE synthesis may be controlled by an inhibitory feedback mechanism mediated by the binding of IgE/allergen complexes to the CD23 (FcεRII) receptor on B-cells (Luo *et al.*, J.Immunol., 1991, 146(7), 2122-9; Yu *et al.*, 1994, Nature, 369(6483):753-6). In systems that lack cellular bound CD23, this inhibition of IgE synthesis does not occur.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Type I allergic diseases mediated by IgE against allergens such as bronchial asthma, atopic dermatitis and perennial rhinitis affect more than 20% of the world's population. Current strategies in the treatment of such allergic responses include means to prevent the symptomatic effects of histamine release by anti-histamine treatments and/or local administration of anti-inflammatory corticosteroids. Other strategies which are under development include those which use the hosts immune system to prevent the degranulation of the mast cells, Stanworth *et al.*, EP 0 477 231 B1. Other forms of immunotherapy have been described (Hoyne *et al.*, J.Exp.Med., 1993, 178, 1783-1788; Holt *et al.*, Lancet, 1994, 344, 456-458).

While immediate as well as late symptoms can be ameliorated by pharmacological treatment, allergen-specific immunotherapy is the only curative approach to type I allergy. However, some problems related to this method remain to be solved. First, immunotherapy is currently performed with total allergen extracts which can be heterogeneous from batch to batch. Moreover, these allergen mixtures are not designed for an individual patient's profile and may contain unwanted toxic proteins. Second, the administration of native allergens at high doses can cause severe anaphylactic reactions and therefore the optimally efficient high dose of allergen for successful immunotherapy can often not be reached. The first problem has been addressed through alternative vaccination with better characterised and more reproducible recombinant allergens as compared to allergen extracts. The second problem, namely the risk of anaphylactic reactions induced by repeated injections of allergen extracts, can be minimised through the use of recombinant "hypoallergens", whose the IgE reactivity was altered by deletions or mutagenesis (Akdis, CA and Blaser, K, Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens, Int. Arch. Allergy Immunol., 2000, 121, 261-269).

Formulations have been described for the treatment and prophylaxis of allergy, which provide means to down-regulate the production of IgE, as well as modifying the cell mediated response to the allergen, through a shift from a Th2 type to a Th1 type of response (as measured by the reduction of ratio of IL-4 : IFN- $\gamma$  producing DerP1 specific T-cells, or alternatively a reduction of the IL-5:IFN- $\gamma$  ratio). This may for example be achieved through the use of recombinant allergens such as recDerP1 with reduced enzymatic activity as described in WO 99/25823. However the immunogenicity of these

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

recombinant allergens is thought to be similar to that of wild-type ProDerP1 in terms of IgE synthesis induction.

Non-anaphylactic forms of allergens with reduced IgE-binding activity have been reported. Allergen engineering has allowed a reduction of IgE-binding capacities of the allergen proteins by site-directed mutagenesis of amino acid residues or deletions of certain amino acid sequences. In the same time, T-cell activating capacity is still conserved as T cell epitopes are maintained. This has been shown using several approaches for different allergens although with variable results. Examples have been published for the timothy grass pollen allergen Phl p 5b (Schramm G et al., 1999, J Immunol., 162, 2406-14), for the major house dust mite allergens Derf2 (Takai et al. 2000, Eur. J. Biochem., 267, 6650-6656), DerP2 (Smith & Chapman 1996, Mol. Immunol. 33, 399-405) and Derf1 (Takahashi K et al. 2001, Int Arch Allergy Immunol. 124, 454-60). One study has reported the generation of Derf1 hypoallergens by introductions of point mutations at the level of cysteine residues involved in disulfide bridges (Takahashi K Int Arch Allergy Immunol. 2001;124(4):454-60., Takai T, Yasuhara T, Yokota T, Okumura Y). However, if wild-type ProDerf1 was successfully secreted by *P. pastoris*, cysteine mutants concerning intramolecular disulfide bonds were, by contrast, not secreted.

The allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* are one of the major causative factors associated with allergic hypersensitivity reactions. Amongst these molecules, DerP1 is a an immunodominant allergen which elicits the strongest IgE-mediated immune response (Topham et al., 1994, Protein Engineering, 7, 7, 869-894; Simpson et al., 1989, Protein Sequences and Data Analyses, 2, 17-21) and with more than 75% of allergic patients to dust mites who develop IgE directed to this allergen. Hypoallergen derived from house dust mite DerP1, and effective prophylactic as well as therapeutic vaccine against this allergen have never been described.

The present invention relates to the provision and use of recombinant derivatives of *Dermatophagoides pteronyssinus* DerP1 allergen or of its precursor form ProDerP1 thereafter referred to as "DerP1/ProDerP1", with reduced allergenic activity compared to the wild-type allergen. The recombinant forms of DerP1 derivatives according to the invention, either adjuvanted recombinant proteins or plasmid encoding DerP1/ProDerP1 suitable for NAVAC, are used as prophylactic or therapeutic vaccines to induce strong

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

preventive Th1 or to shift Th2 to Th1 immune responses. The hypoallergenic derivatives can be successfully produced in recombinant expression systems and this is also an aspect of the present invention.

DerP1 is a 30 KDa protein and has been cloned and sequenced (Chua *et al.*, 1988, J.Exp.Med., 167, 175-182). It is known to contain 222 amino acid residues in the mature protein. The sequence of DerP1 shares 31% homology to papain, and shares more particularly homology in the enzymatically active regions, most notably the Cys34-His170 ion pair (Topham *et al.*, *supra*). DerP1 is produced in the mid-gut of the mite, where its role is probably related to the digestion of food. Up to 0.2 ng or proteolytically active DerP1 is incorporated into each fecal pellet, each around 10-40 µm in diameter and, therefore, easily inspired into the human respiratory tract. Overnight storage of purified DerP1 preparations at room temperature results in almost complete loss of enzymatic activity due to autoprolytic degradation (Machado *et al.*, 1996, Eur.J.Immunol. 26, 2972-2980). The DerP1 encoding cDNA sequence reveals that, like many mammalian and plant proteinases, DerP1 is synthesised as an inactive preproenzyme of 320 amino acid residues which is subsequently processed into a 222-amino acid mature form (Chua *et al.*, 1988, J.Exp.Med., 167, 175-182; Chua *et al.*, 1993, Int. Arch Allergy Immunol 101, 364-368). The maturation of ProDerP1 is not known to date but it is thought that the allergen is processed by the cleavage of the 80-residues proregion.

The present invention provides a recombinant *Dermatophagoides pteronyssinus* DerP1/ProDerP1 protein allergen derivative wherein said allergen derivative has a significantly reduced allergenic activity compared to that the wild-type allergen. The allergenic activity can be impaired by several means which all aim at destructuring the protein forms by disrupting its intramolecular disulphide bridges thereby destabilising its 3-dimensional structure. Said allergen derivatives having the following advantages over the unaltered wild-type allergen: 1) increases the Th1-type aspect of the immune responses (higher IgG2a for example) in comparison to those stimulated by the wild type allergen, thereby leading to the suppression of allergic potential of the vaccinated host, 2) having reduced allergenicity while still retaining T cell reactivity, thus being more suitable for systemic administration of high doses of the immunogen, 3) will induce DerP1 specific IgG which compete with IgE for the binding of native DerP1, 4)

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

efficiently protects against airway eosinophilia even after exposure to aerosolised allergen extract. Such derivatives are suitable for use in therapeutic and prophylactic vaccine formulations which are suitable for use in medicine and more particularly for the treatment or prevention of allergic reactions.

5 According to a first aspect, the present invention provides a recombinant DerP1/ProDerP1 (i.e. DerP1 or ProDerP1) allergen derivative wherein the allergenic activity has been significantly reduced, e.g. almost or completely abolished, by a physical means such as by thermally treating the protein, preferably in the presence of a reducing agent. Typically, the DerP1/ProDerP1 protein is treated during a few minutes at about  
10 100°C in the presence of a reducing agent. Preferably the reducing agent is beta-mercaptoethanol or DTT. Still more preferably the protein is treated during 5 minutes at about 100°C in the presence of 50 mM beta-mercaptoethanol. This treatment has a detrimental effect on the stability of the protein conformational IgE-binding epitopes.

In a second aspect the present invention provides a recombinant DerP1/ProDerP1  
15 protein derivative wherein the allergenic activity has been genetically impaired such as by introducing specific mutations into the encoding cDNA or the genomic DNA. Accordingly an aspect of the invention provides the genetically mutated recombinant DerP1/ProDerP1 *per se*. The reduction of the allergenicity of DerP1/ProDerP1 may be performed by introducing mutations into the native sequence before recombinantly  
20 producing the hypoallergenic mutants. This may be achieved by: introducing substitutions, deletions, or additions in or by altering the three dimensional structure of the protein such that the tridimensional conformation of the protein is lost. This may be achieved, amongst others, by expressing the protein in fragments, or by deleting cysteine residues involved in disulphide bridge formation, or by deleting or adding residues such  
25 that the tertiary structure of the protein is substantially altered. Preferably, mutations may be generated with the effect of altering the interaction between two cysteine residues, typically one mutation at positions 4, 31, 65, 71, 103 and 117 of the native – mature – DerP1 (which corresponds to positions 84, 111, 145, 151, 183 and 197 of ProDerP1, respectively). A mutated protein according to the invention may comprise two or more (3,  
30 4, 5 or all 6) cysteine mutations, thereby affecting different disulphide bridges, such as mutations at positions 4 & 31, 4 & 65, 4 & 71, 4 & 103, 31 & 65, or 4 & 31 & 65, or at positions 71 & 103, 71 & 117, 103 & 117, 31 & 117, 65 & 117, or 71 & 103 & 117.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Preferably the derivatives comprise one single mutation at any of the above positions. The most preferred mutation involves Cys4 (or alternatively, or in addition, Cys117 which is thought to be the disulphide bond partner of Cys4). The Cys mutations can be deletions, but are preferably substitutions for any of the other natural 19 amino acids.

- 5 Preferred substitutions introduce positively charged amino acid residues to further destabilise the 3D-structure of the resulting protein. For example, preferred substitutions involve cysteine→arginine (or lysine) substitution.

Accordingly, the invention is illustrated herein by, but is not limited to, six specific mutations which are given as examples of hypoallergenic DerP1/ProDerP1 derivatives.

- 10 First the allergenic activity of ProDerP1 is substantially reduced, preferably completely abrogated by substituting a cysteine residue for an arginine residue at position Cys4 of DerP1 protein sequence, and is set out in SEQ ID NO:3. Second, the allergenic activity of ProDerP1 is substantially abrogated by substituting a cysteine residue for an arginine residue at any of the following positions (calculated by reference to the sequence in
- 15 mature DerP1): Cys31 of DerP1 protein sequence (SEQ ID NO:5), Cys65 (SEQ ID NO:7), Cys71 (SEQ ID NO:9), Cys103 (SEQ ID NO:11), Cys117 (SEQ ID NO:13).

Mutated versions of DerP1/ProDerP1 may be prepared by site-directed mutagenesis of the cDNA which codes for the DerP1/ProDerP1 protein by conventional methods such as those described by G. Winter *et al* in Nature 1982, 299, 756-758 or by Zoller and

20 Smith 1982; Nucl. Acids Res., 10, 6487-6500, or deletion mutagenesis such as described by Chan and Smith in Nucl. Acids Res., 1984, 12, 2407-2419 or by G. Winter *et al* in Biochem. Soc. Trans., 1984, 12, 224-225.

- The invention is not limited to the specifically disclosed sequence, but includes any hypoallergenic allergen which has been mutated to decrease or abolish its IgE-binding
- 25 reactivity and/or histamine release activity, whilst retaining its T cell reactivity and/or the ability to stimulate an immune response against the wild-type allergen. The allergenic activity, and consequently the reduction in the allergenic activity, of the mutant allergens may be compared to the wild type by any of the following methods: histamine release activity or by IgE-binding reactivity, according to the method detailed in the Example
- 30 section.

"Substantially reduced allergenic activity" means that the allergenic activity as measured by residual IgE-binding activity is reduced to a maximum of 50% of the

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

activity of the native – unmodified or unmutated - protein, preferably to a maximum of 20%, more preferably to a maximum of 10%, still more preferably to a maximum of 5%, still more preferably to less than 5%. Alternatively, “substantially” also means that the histamine release activity of the mutant is reduced by at least a 100-fold factor as compared to the native protein, preferably by a factor of 1000-fold, still more preferably by a factor of 10000-fold.

The immunogenicity of the mutant allergen may be compared to that of the wild-type allergen by various immunological assays. The cross-reactivity of the mutant and wild-type allergens may be assayed by *in vitro* T-cell assays after vaccination with either mutant or wild-type allergens. Briefly, splenic T-cells isolated from vaccinated animals may be restimulated *in vitro* with either mutant or wild-type allergen followed by measurement of cytokine production with commercially available ELISA assays, or proliferation of allergen specific T cells may be assayed over time by incorporation of tritiated thymidine. Also the immunogenicity may be determined by ELISA assay, the details of which may be easily determined by the man skilled in the art. Briefly, two types of ELISA assay are envisaged. First, to assess the recognition of the mutant DerP1 by sera of mice immunized with the wild type DerP1; and secondly by recognition of wild type DerP1 allergen by the sera of animals immunised with the mutant allergen. Briefly, each well will be coated with 100 ng of purified wild type or mutated DerP1 overnight at 4°C. After incubating with a blocking solution (TBS-Tween 0.1% with 1% BSA) successive dilutions of sera will be incubated at 37°C for 1 hour. The wells are washed 5 times, and total IgG revealed by incubating with an anti-IgG antibody conjugated with Alkaline phosphatase.

A further aspect of the present invention provides an isolated nucleic acid encoding a mutated version of the DerP1/ProDerP1 allergen as disclosed herein. Preferably the nucleotide sequence is a DNA sequence and can be synthesized by standard DNA synthesis techniques, such as by enzymatic ligation as described by D.M. Roberts *et al* in Biochemistry 1985, 24, 5090-5098, by chemical synthesis, by *in vitro* enzymatic polymerization, or by a combination of these techniques. Preferably the nucleic acid sequence has a codon usage pattern that has been optimised so as to mimic the one used in the intended expression host, more preferably resembling that of highly expressed mammalian e.g. human genes. Preferred DNA sequences are codon-optimised sequences

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

and are set out in SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:14.

Enzymatic polymerisation of DNA may be carried out *in vitro* using a DNA polymerase such as DNA polymerase I (Klenow fragment) in an appropriate buffer containing the nucleoside triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dTTP as required at a temperature of 10°-37°C, generally in a volume of 50ml or less. Enzymatic ligation of DNA fragments may be carried out using a DNA ligase such as T4 DNA ligase in an appropriate buffer, such as 0.05M Tris (pH 7.4), 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 0.01M dithiothreitol, 1mM spermidine, 1mM ATP and 0.1mg/ml bovine serum albumin, at a temperature of 4°C to ambient, generally in a volume of 50ml or less. The chemical synthesis of the DNA polymer or fragments may be carried out by conventional phosphotriester, phosphite or phosphoramidite chemistry, using solid phase techniques such as those described in 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual' (ed. H.G. Gassen and A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982), or in other scientific publications, for example M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. Sproat, and R.C. Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10, 6243; B.S. Sproat and W. Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 5771; M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters, 1980, 21, 719; M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103, 3185; S.P. Adams et al., Journal of the American Chemical Society, 1983, 105, 661; N.D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus, and H. Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12, 4539; and H.W.D. Matthes et al., EMBO Journal, 1984, 3, 801.

Alternatively, the coding sequence can be derived from DerP1/ProDerP1 mRNA, using known techniques (e.g. reverse transcription of mRNA to generate a complementary cDNA strand), and commercially available cDNA kits.

Desirably the codon usage pattern of the nucleotide sequence is typical of highly expressed human genes. Accordingly there is provided in a particular aspect of the invention a nucleotide sequence comprising a plurality of codons together encoding the mutated DerP1/ProDerP1 protein, wherein the selection of the possible codons used for encoding the recombinant mite protein amino acid sequence has been changed to closely mimic the optimised mammalian codon usage, such that the frequency of codon usage in the resulting gene sequence is substantially the same as a mammalian gene which would



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

encode the same protein. Codon usage patterns for mammals, including humans, can be found in the literature (see e.g. Nakamura et al. 1996, Nucleic Acids Res. 24, 214-215).

The DNA code has 4 letters (A, T, C and G) and uses these to spell three letter "codons" which represent the amino acids the proteins encoded in an organism's genes.

5 The linear sequence of codons along the DNA molecule is translated into the linear sequence of amino acids in the protein(s) encoded by those genes. The code is highly degenerate, with 61 codons coding for the 20 natural amino acids and 3 codons representing "stop" signals. Thus, most amino acids are coded for by more than one codon - in fact several are coded for by four or more different codons.

10 Where more than one codon is available to code for a given amino acid, it has been observed that the codon usage patterns of organisms are highly non-random. Different species show a different bias in their codon selection and, furthermore, utilization of codons may be markedly different in a single species between genes which are expressed at high and low levels. This bias is different in viruses, plants, bacteria, insect and  
15 mammalian cells, and some species show a stronger bias away from a random codon selection than others. For example, humans and other mammals are less strongly biased than certain bacteria or viruses. For these reasons, there is a significant probability that a mammalian gene expressed in *E.coli* or a viral gene expressed in mammalian cells will have an inappropriate distribution of codons for efficient expression. However, a gene  
20 with a codon usage pattern suitable for *E.coli* expression may also be efficiently expressed in humans. It is believed that the presence in a heterologous DNA sequence of clusters of codons which are rarely observed in the host in which expression is to occur, is predictive of low heterologous expression levels in that host.

There are several examples where changing codons from those which are rare in the  
25 host to those which are host-preferred ("codon optimisation") has enhanced heterologous expression levels, for example the BPV (bovine papilloma virus) late genes L1 and L2 have been codon optimised for mammalian codon usage patterns and this has been shown to give increased expression levels over the wild-type HPV sequences in mammalian (Cos-1) cell culture (Zhou et. al. J. Virol 1999. 73, 4972-4982). In this work, every BPV  
30 codon which occurred more than twice as frequently in BPV than in mammals (ratio of usage >2), and most codons with a usage ratio of >1.5 were conservatively replaced by the preferentially used mammalian codon. In WO97/31115, WO97/48370 and

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

WO98/34640 (Merck & Co., Inc.) codon optimisation of HIV genes or segments thereof has been shown to result in increased protein expression and improved immunogenicity when the codon optimised sequences are used as DNA vaccines in the host mammal for which the optimisation was tailored.

5 In this work, the sequences preferably consist entirely of optimised codons (except where this would introduce an undesired restriction site, intron splice site etc.) because each *D. pteronyssinus* codon is conservatively replaced with the optimal codon for a mammalian host. Surprisingly such optimised ProDerP1/DerP1 sequences also express very well in yeast despite the different codon usage of yeast.

10 A still further aspect of the invention provides a process for the preparation of a mutated DerP1/ProDerP1 protein which process comprises expressing DNA, either codon optimised or not, encoding the said protein in a recombinant host cell and recovering the product.

Although DerP1 is well characterized in terms of its enzymatic activity,  
15 allergenicity and gene cloning, heterologous expression of DerP1 has been reported to be problematic (Chapman and Platts-Mills, J Immunol 1980;125:587-592), probably because this cysteine proteinase is synthesized as a PreProDerP1 precursor. Even more problematic is the expression of DerP1/ProDerP1 sequences wherein cysteine residues involved in the protein conformation have been mutated. Accordingly the present  
20 invention further provides a process overcoming all these drawbacks therefore allowing the production of the mutated proteins and the industrial development of therapeutic and prophylactic vaccines to mite allergy.

A substantial amelioration of protein expression has been achieved in *E. coli* when DerP1/ProDerP1 either mutated or not was expressed as a Maltose Binding Protein  
25 (MBP) fusion protein. Accordingly there is provided a process for expressing the mutated ProDerP1/ProDerP1 protein as a MBP fusion protein in *E. coli*. Furthermore, a substantial amelioration of protein expression in yeast has been surprisingly achieved for the mutated protein even though disulphide bonds are said to be essential for secretion in *Pichia pastoris* (Takai et al. 2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 124, 454-460). This was  
30 achieved by re-engineering the polynucleotide sequence which encodes the *Dermaphagoides* mutated ProDerP1/ProDerP1 protein to fit the codon usage found in highly expressed human genes, thereby also allowing the recombinant antigen to have the same

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

conformation and immunological properties as native ProDerP/DerP1 *Dermaphagoides* allergens. Surprisingly, the cloning and expression of mutated ProDerP1, codon-optimised for mammalian cell expression, could be achieved in *Pichia pastoris*, with a certain proportion being secreted, although expression in *P. pastoris* has been formerly reported to be unsuccessful (Takai et al. 2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 124, 454-460).

The process of the invention may be performed by conventional recombinant techniques such as described in Maniatis *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

10

In particular, the process may comprise the steps of:

1. Preparing a replicable or integrating expression vector capable, in a host cell, of expressing a DNA polymer comprising a nucleotide sequence that encodes the said DerP1/ProDerP1 protein;
- 15 2. Altering the IgE-binding activity of the resultant protein by replacing the cysteine residues involved in disulphide bonds with another residue, preferably an arginine residue, using site directed mutagenesis;
3. Transforming a host cell with the said vector
4. Culturing the transformed host cell under conditions permitting expression of the DNA polymer to produce the protein; and
- 20 5. Recovering the protein.

The term 'transforming' is used herein to mean the introduction of foreign DNA into a host cell by transformation, transfection or infection with an appropriate plasmid or viral vector using e.g. conventional techniques as described in Genetic Engineering, Eds. S.M. Kingsman and A.J. Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, England, 1988. The term 'transformed' or 'transformant' will hereafter apply to the resulting host cell containing and expressing the foreign gene of interest.

The expression vector is novel and also forms part of the invention. One particular aspect of the present invention provides an expression vector which comprises, and is capable of directing the expression of, a polynucleotide sequence encoding a cystein-mutated DerP1/ProDerP1 protein according to the invention. Another particular aspect of

30

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

the invention provides an expression vector which comprises, and is capable of directing the expression of, a polynucleotide sequence encoding a cysteine-mutated DerP1/ProDerP1 protein wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence is typical of highly expressed mammalian genes, preferably highly expressed human genes. The vector may be suitable for driving expression of heterologous DNA in bacterial, insect, yeast or mammalian cells, particularly human cells.

The replicable expression vector may be prepared in accordance with the invention, by cleaving a vector compatible with the host cell to provide a linear DNA segment having an intact replicon, and combining said linear segment with one or more DNA molecules which, together with said linear segment encode the desired product, such as the DNA polymer encoding the DerP1/ProDerP1 protein under ligating conditions.

Thus, the DNA polymer may be preformed or formed during the construction of the vector, as desired.

The choice of vector will be determined in part by the host cell, which may be prokaryotic or eukaryotic. Suitable vectors include plasmids, bacteriophages, cosmids and recombinant viruses.

The preparation of the replicable expression vector may be carried out conventionally with appropriate enzymes for restriction, polymerisation and ligation of the DNA, by procedures described in, for example, Maniatis *et al* cited above.

The recombinant host cell is prepared, in accordance with the invention, by transforming a host cell with a replicable expression vector of the invention under transforming conditions. Suitable transforming conditions are conventional and are described in, for example, Maniatis *et al* cited above, or "DNA Cloning" Vol. II, D.M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

The choice of transforming conditions is determined by the host cell. Thus, a bacterial host such as *E. coli* may be treated with a solution of  $\text{CaCl}_2$  (Cohen *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) or with a solution comprising a mixture of  $\text{RbCl}$ ,  $\text{MnCl}_2$ , potassium acetate and glycerol, and then with 3-[N-morpholino]-propane-sulphonic acid,  $\text{RbCl}$  and glycerol. Mammalian cells in culture may be transformed by calcium co-precipitation of the vector DNA onto the cells, by lipofection, or by electroporation. Yeast compatible vectors also carry markers that allow the selection of successful transformants by conferring prototrophy to auxotrophic mutants or resistance to heavy

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

metals on wild-type strains. Control sequences for yeast vectors include promoters for glycolytic enzymes (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 1968, 7, 149), PHO5 gene encoding acid phosphatase, CUP1 gene, ARG3 gene, GAL genes promoters and synthetic promoter sequences. Other control elements useful in yeast expression are terminators and leader sequences. The leader sequence is particularly useful since it typically encodes a signal peptide comprised of hydrophobic amino acids, which direct the secretion of the protein from the cell. Suitable signal sequences can be encoded by genes for secreted yeast proteins such as the yeast invertase gene and the a-factor gene, acid phosphatase, killer toxin, the a-mating factor gene and recently the heterologous inulinase signal sequence derived from INU1A gene of Kluyveromyces marxianus. Suitable vectors have been developed for expression in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*.

A variety of *P. pastoris* expression vectors are available based on various inducible or constitutive promoters (Cereghino and Cregg, FEMS Microbiol. Rev. 2000,24:45-66). For the production of cytosolic and secreted proteins, the most commonly used *P. pastoris* vectors contain the very strong and tightly regulated alcohol oxidase (AOX1) promoter. The vectors also contain the *P. pastoris* histidinol dehydrogenase (HIS4) gene for selection in his4 hosts. Secretion of foreign protein require the presence of a signal sequence and the *S. cerevisiae* prepro alpha mating factor leader sequence has been widely and successfully used in *Pichia* expression system. Expression vectors are integrated into the *P. pastoris* genome to maximize the stability of expression strains. As in *S. cerevisiae*, cleavage of a *P. pastoris* expression vector within a sequence shared by the host genome (AOX1 or HIS4) stimulates homologous recombination events that efficiently target integration of the vector to that genomic locus. In general, a recombinant strain that contains multiple integrated copies of an expression cassette can yield more heterologous protein than single-copy strain. The most effective way to obtain high copy number transformants requires the transformation of *Pichia* recipient strain by the sphaeroplast technique (Cregg et al 1985, Mol.Cell.Biol. 5: 3376-3385).

The invention also extends to a host cell transformed with a replicable expression vector of the invention.

Culturing the transformed host cell under conditions permitting expression of the DNA polymer is carried out conventionally, as described in, for example, Maniatis et al

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

and "DNA Cloning" cited above. Thus, preferably the cell is supplied with nutrient and cultured at a temperature below 45°C.

The product is recovered by conventional methods according to the host cell. Thus, where the host cell is bacterial, such as *E. coli* it may be lysed physically, chemically or enzymatically and the protein product isolated from the resulting lysate. Where the host cell is mammalian, the product may generally be isolated from the nutrient medium or from cell free extracts. Conventional protein isolation techniques include selective precipitation, absorption chromatography, and affinity chromatography including a monoclonal antibody affinity column.

Alternatively, the expression may be carried out either in insect cells using a suitable vector such as a baculovirus, in transformed drosophila cells, or mammalian CHO cells. The novel protein of the invention may also be expressed in yeast cells as described for the CS protein in EP-A-0 278 941.

Pharmaceutical, immunogenic and vaccine compositions comprising a hypoallergenic DerP1/ProDerP1 derivative according to the invention, or the polynucleotide sequences encoding said proteins, either codon-optimised or not, are also provided. In preferred embodiments the DNA composition comprises a plurality of particles, preferably gold particles, coated with DNA comprising a vector encoding a polynucleotide sequence which encodes a *D. pteronyssinus* amino acid sequence, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence is typical of highly expressed mammalian genes, particularly human genes.

The polynucleotides and encoded polypeptides according to the invention may find use as therapeutic or prophylactic agents. In particular the polynucleotides of the invention (including a polynucleotide sequence of native ProDerP1 – preferably codon optimised) may be used in DNA vaccination (NAVAC), the DNA being administered to the mammal e.g. human to be vaccinated. The nucleic acid, such as RNA or DNA, preferably DNA, is provided in the form of a vector, such as those described above, which may be expressed in the cells of the mammal. The polynucleotides may be administered by any available technique. For example, the nucleic acid may be introduced by needle injection, preferably intradermally, subcutaneously or intramuscularly. Alternatively, the nucleic acid may be delivered directly into the skin using a nucleic acid delivery device such as particle-mediated DNA delivery (PMDD). In

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

this method, inert particles (such as gold beads) are coated with a nucleic acid, and are accelerated at speeds sufficient to enable them to penetrate a surface of a recipient (e.g. skin), for example by means of discharge under high pressure from a projecting device. (Particles coated with a nucleic acid molecule of the present invention are within the scope of the present invention, as are delivery devices loaded with such particles).

Suitable techniques for introducing the naked polynucleotide or vector into a patient include topical application with an appropriate vehicle. The nucleic acid may be administered topically to the skin, or to mucosal surfaces for example by intranasal, oral, intravaginal or intrarectal administration. The naked polynucleotide or vector may be present together with a pharmaceutically acceptable excipient, such as phosphate buffered saline (PBS). DNA uptake may be further facilitated by use of facilitating agents such as bupivacaine, either separately or included in the DNA formulation. Other methods of administering the nucleic acid directly to a recipient include ultrasound, electrical stimulation, electroporation and microseeding which is described in US-5,697,901. Typically the nucleic acid is administered in an amount in the range of 1pg to 1mg, preferably 1pg to 10µg nucleic acid for particle mediated gene delivery and 10µg to 1mg for other routes.

A nucleic acid sequence of the present invention may also be administered by means of specialised delivery vectors useful in gene therapy. Gene therapy approaches are discussed for example by Verme *et al*, Nature 1997, 389:239-242. Both viral and non-viral vector systems can be used. Viral based systems include retroviral, lentiviral, adenoviral, adeno-associated viral, herpes viral, Canarypox and vaccinia-viral based systems. Non-viral based systems include direct administration of nucleic acids, microsphere encapsulation technology (poly(lactide-co-glycolide) and, liposome-based systems. Viral and non-viral delivery systems may be combined where it is desirable to provide booster injections after an initial vaccination, for example an initial "prime" DNA vaccination using a non-viral vector such as a plasmid followed by one or more "boost" vaccinations using a viral vector or non-viral based system.

In this way, the inventors have found that vaccination with DNA encoding ProDerP1 (preferably codon optimised for mammals) induces a Th1 response in mice models (high titres of specific IgG2a antibodies and low titres of specific IgG1) and, remarkably, the absence of anti-ProDerP1 IgE.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

The pharmaceutical compositions of the present invention may include adjuvant compounds, or other substances which may serve to increase the immune response induced by the protein.

The vaccine composition of the invention comprises an immunoprotective amount of the mutated version of the DerP1/ProDerP1 hypoallergenic protein. The term "immunoprotective" refers to the amount necessary to elicit an immune response against a subsequent challenge such that allergic disease is averted or mitigated. In the vaccine of the invention, an aqueous solution of the protein can be used directly. Alternatively, the protein, with or without prior lyophilization, can be mixed, adsorbed, or covalently linked with any of the various known adjuvants.

Suitable adjuvants are commercially available such as, for example, Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminum salts such as aluminum hydroxide gel (alum) or aluminum phosphate; salts of calcium, iron or zinc; an insoluble suspension of acylated tyrosine; acylated sugars; cationically or anionically derivatized polysaccharides; polyphosphazenes; biodegradable microspheres; monophosphoryl lipid A and quil A. Cytokines, such as GM-CSF or interleukin-2, -7, or -12, and chemokines may also be used as adjuvants.

In the formulations of the invention it is preferred that the adjuvant composition induces an immune response predominantly of the TH1 type. High levels of Th1-type cytokines (e.g., IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 and IL-12) tend to favour the induction of cell mediated immune responses to an administered antigen. Within a preferred embodiment, in which a response is predominantly Th1-type, the level of Th1-type cytokines will increase to a greater extent than the level of Th2-type cytokines. The levels of these cytokines may be readily assessed using standard assays. For a review of the families of cytokines, see Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Accordingly, suitable adjuvants for use in eliciting a predominantly Th1-type response include, for example a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) together with an aluminium salt. Other known adjuvants, which preferentially induce a TH1 type immune response, include CpG containing oligonucleotides. The oligonucleotides are characterised in that the CpG



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

dinucleotide is unmethylated. Such oligonucleotides are well known and are described in, for example WO 96/02555. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. CpG-containing oligonucleotides may also be used alone or in combination with other adjuvants. For example, an enhanced system involves the combination of a CpG-containing oligonucleotide and a saponin derivative particularly the combination of CpG and QS21 as disclosed in WO 00/09159 and WO 00/62800. Preferably the formulation additionally comprises an oil in water emulsion and/or tocopherol.

Another preferred adjuvant is a saponin, preferably QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), that may be used alone or in combination with other adjuvants. For example, an enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and saponin derivative, such as the combination of QS21 and 3D-MPL as described in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described in WO 95/17210.

A particularly potent adjuvant formulation involving QS21 3D-MPL & tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO 95/17210 and is a preferred formulation.

Other preferred adjuvants include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) and other aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs).

Accordingly there is provided an immunogenic composition comprising a DerP1/ProDerP1 hypoallergenic derivative as disclosed herein and an adjuvant, wherein the adjuvant comprises one or more of 3D-MPL, QS21, a CpG oligonucleotide, a polyethylene ether or ester or a combination of two or more of these adjuvants. The DerP1/ProDerP1 hypoallergenic derivative within the immunogenic composition is preferably presented in an oil in water or a water in oil emulsion vehicle.

In a further aspect, the present invention provides a method of making a pharmaceutical composition including the step of mutating one or more cysteine residues involved in disulphide bridge formation, such as Cys4, Cys31, Cys65, Cys71, Cys103 or

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Cys117. The method further comprises the step of altering the codon usage pattern of a wild-type DerP1/ProDerP1 nucleotide sequence, or creating a polynucleotide sequence synthetically, to produce a sequence having a codon usage pattern typical of highly expressed mammalian genes and encoding a codon-optimised cysteine-mutated ProDerP1/DerP1 amino acid sequence according to the invention. Vaccine preparation is generally described in Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. & Newman M.J). (1995) Plenum Press New York). Encapsulation within liposomes is described by Fullerton, US Patent 4,235,877. Conjugation of proteins to macromolecules is disclosed, for example, by Likhite, US Patent 4,372,945 and Armor *et al.*, US Patent 4,474,757.

The amount of the protein of the present invention present in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccines. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and whether or not the vaccine is adjuvanted. Generally, it is expected that each dose will comprise 1-1000 µg of protein, preferably 1-200 µg. An optimal amount for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of antibody titres and other responses in subjects. The vaccines of the present invention may be administered to adults or infants, however, it is preferable to vaccinate individuals soon after birth before the establishment of substantial Th2-type memory responses. Following an initial vaccination, subjects will preferably receive a boost in about 4 weeks, followed by repeated boosts every six months for as long as a risk of allergic responses exists.

Vaccines and pharmaceutical compositions may be presented in unit-dose or multi-dose containers, such as sealed ampoules or vials. Such containers are preferably hermetically sealed to preserve sterility of the formulation until use. In general, formulations may be stored as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles. Alternatively, a vaccine or pharmaceutical composition may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier immediately prior to use.

The present invention also provides a process for the production of a vaccine, comprising the steps of purifying a DerP1/ProDerP1 derivative according to the invention

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

or a derivative thereof, by the process disclosed herein and admixing the resulting protein with a suitable adjuvant, diluent or other pharmaceutically acceptable excipient.

The present invention also provides a method for producing a vaccine formulation comprising mixing a protein of the present invention together with a pharmaceutically acceptable excipient.

Another aspect of the invention is the use of a protein or polynucleotide as claimed herein for the manufacture of a vaccine for immunotherapeutically treating a patient susceptible to or suffering from allergy. A method of treating patients susceptible to or suffering from allergy comprising administering to said patients a pharmaceutically active amount of the immunogenic composition disclosed herein is also contemplated by the present invention.

A further aspect of the invention provides a method of preventing or mitigating an allergic disease in man (particularly house dust mite allergy), which method comprises administering to a subject in need thereof an immunogenically effective amount of a mutated allergen of the invention, or of a vaccine in accordance with the invention.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

FIGURE LEGENDS

Figure 1: IgG and IgE-binding reactivity of denatured ProDerP1 expressed in CHO cells. Immunoplates were coated with 500ng/well of purified native or denatured ProDerP1 and incubated with sera (diluted 1:8) radioallergosorbent positive to *D. pteronyssinus*. Bound IgE or IgG were quantitated by incubation with mouse anti-human IgE or IgG and alkaline phosphatase-labelled anti-mouse IgG antibodies, followed by an enzymatic assay. Results are expressed as OD<sub>410nm</sub> values.

Figure 2: Correlation between the IgE reactivity of MBP-ProDerP1 and natural DerP. Immunoplates were coated with 500 ng/well of purified DerP or MBP-ProDerP1 and incubated with 95 sera (diluted 1:8) radioallergosorbent positive to *D. pteronyssinus*. Bound IgE was quantitated by incubation with mouse anti-human IgE and alkaline phosphatase-labelled anti-mouse Ig antibodies, followed by an enzymatic assay. Results are expressed as OD<sub>410nm</sub> values.

Figure 3: IgE-binding reactivities of MBP-ProDerP1 mutants, carrying the mutations C4R, C31R and C65R. Immunoplates were coated with 500ng/well of Wild-type or mutant MBP-ProDerP1 and incubated with a pool of 20 sera (diluted 1:8) radioallergosorbent positive to *D. pteronyssinus*. Bound IgE was quantitated by incubation with mouse anti-human IgE and alkaline phosphatase-labelled anti-mouse IgG antibodies, followed by an enzymatic assay. Results are expressed as OD<sub>410nm</sub> values.

Figure 4: Histamine release activity of allergens. Basophils isolated from the peripheral blood of one allergic donor were stimulated with serial dilutions of different allergens. The histamine released from cells was measured by ELISA. The total amount of histamine in basophils was quantified after cell disruption with the detergent IGEPAL CA-630. Results are shown as the ratio of released histamine by allergens to total histamine.

Figure 5: schematic representation of the animal model of house dust mite allergy.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

The examples which follow are illustrative but not limiting of the invention. Restriction enzymes and other reagents were used substantially in accordance with the vendors' instructions.

## 5 **EXAMPLE I**

### **General procedures**

#### **1. - SDS PAGE and Western blot analysis**

Proteins were analyzed by SDS-PAGE on 12.5% polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using a semi-dry transblot system (Bio-Rad). Membranes were saturated for 30 min with 0.5% Instagel (PB Gelatins) in TBS-T (50mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 80) and incubated with mouse polyclonal serum raised against denatured or native ProDerP1 diluted in blocking solution (1: 5000). Immunoreactive materials were detected using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse antibodies (Promega, 1:7500) and 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate (BCIP, Boehringer)/ nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) as substrates.

#### **2. - Glycan analysis**

Carbohydrate analysis was carried out with the Glycan Differentiation Kit (Boehringer) using the following lectins: *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), Peanut agglutinin (PNA) and *Datura stramonium* agglutinin (DSA). Briefly, purified proteins were transferred from SDS-PAGE onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with the different lectins conjugated to digoxigenin. Complexes were detected with anti-digoxigenin antibodies conjugated to alkaline phosphatase.

#### **3. - Enzymatic assays**

Enzymatic assays were performed in 50 mM Tris-HCl pH 7, containing 1mM EDTA and 20mM L-cysteine at 25°C in a total volume of 1ml. Hydrolysis of Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Cbz-Phe-Arg-AMC) and Boc-Gln-Ala-Arg-7-amino-4-

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

methylecoumarin (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC) (Sigma) (both substrates at a final concentration of 100 $\mu$ M) was monitored using a SLM 8000 spectrofluorimeter with  $\lambda_{\text{ex}}$  = 380nm and  $\lambda_{\text{em}}$  = 460nm. Assays were started by addition of cysteine activated allergen to a final concentration of 100 nM. Before any assay, purified DerP1 or ProDerP1 was  
 5 incubated with a mixture of aprotinin- and p-aminobenzamidine-agarose resins (Sigma) to remove any putative trace of serine protease activity.

#### 4. - Protein determination

Total protein concentration was determined by the bicinchoninic acid procedure  
 10 (MicroBCA, Pierce) with bovine serum albumin as standard.

#### 5. - DerP1 ELISA

DerP1 or recProDerP1 was detected with an ELISA kit using DerP1 specific monoclonal antibodies 5H8 and 4C1 (Indoor Biotechnologies). The DerP1 standard (UVA 93/03)  
 15 used in the assay was at a concentration of 2.5 $\mu$ g/ml.

#### 6. - IgE-binding activity

Immunoplates were coated overnight with DerP1 or ProDerP1 (500ng/well) at 4°C. Plates were then washed 5 times with 100 $\mu$ l per well of TBS-Tween buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 80) and saturated for 1 hr at 37°C with 150 $\mu$ l of the same buffer supplemented with 1% BSA. Sera from allergic patients to *D. pteronyssinus* and diluted at 1/8 were then incubated for 1 hr at 37°C. Out of the 95 sera used in the experiments, 16 sera ranged in their specific anti-*D. pteronyssinus* IgE values (RAST assays) from 58.1kU/L to 99kU/L and 79 above the upper cut-off value of 100kU/L.  
 20 Plates were washed 5 times with TBS-Tween buffer and the allergen-IgE complexes were detected after incubation with a mouse anti-human IgE antibody (Southern Biotechnology Associates) and a goat anti-mouse IgG antibody coupled to alkaline phosphatase (dilution 1/7500 in TBS-Tween buffer, Promega). The enzymatic activity was measured using the p-nitrophenylphosphate substrate (Sigma) dissolved in diethanolamine buffer (pH 9.8).  
 25 OD<sub>410nm</sub> was measured in a Biorad Novapath ELISA reader.  
 30 For IgE inhibition assays, plates were coated with DerP1 or ProDerP1 at the same concentration (0.12  $\mu$ M). A pool of 20 human sera from allergic patients (RAST value >

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

100kU/L) was preincubated overnight at 4°C with various concentrations (3.6-0.002 µM) of DerP1 or recProDerP1 as inhibitors and added on ELISA plates. IgE-binding was detected as described above.

5    **7. - Histamine release**

The histamine release was assayed using leukocytes from the peripheral heparinized blood of an allergic donor and by the Histamine-ELISA kit (Immunotech). Basophils were incubated with serial dilutions of recProDerP1 or DerP1 for 30min at 37°C. The total amount of histamine in basophils was quantified after cell disruption with the detergent IGEPAL CA-630 (Sigma).

10

**8. - ProDerP1 denaturation**

Recombinant ProDerP1 was heat-denatured for 5 min at 100°C in presence of 50mM β-mercaptoethanol.

15

**9. - Immunisations**

Groups of ten CBA/J mice (six weeks old) were four weekly immunised with 5µg of different proteins or 100µg of different plasmidic DNA. The purified allergens were injected in presence of alum as adjuvant. As controls, groups of mice were immunised with alum or pJW4304 DNA vector. Mice were bled from the retro-orbital venous plexus on days 7, 14, 21, 28 and sera were collected.

20

**10. - Bronchoprovocation**

Within 72h after immunisations, all mice were placed in a Plexiglas chamber (13 x 19 x 37.5 cm) and exposed to aerosolised crude *D.pteronyssinus* extract over a 20-min period for 7 consecutive days. The concentration of crude mite extract was 300µg/ml. The aerosols were generated by an ultrasonic nebulizer (Syst' AM). The output of the nebulizer was 0.5ml/min and the mean particle size of the aerosol was between 1 and 5 µm. As control, mice were nebulized with PBS.

25

30

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**11. - Measurement of DerP1-specific IgG, IgG1 and IgG2a**

Sera were assayed for anti-DerP1 IgG, IgG1 and IgG2a antibodies by ELISA. Immunoplates were coated with ProDerP1 (500ng/well), for 16 hrs at 4°C. Plates were washed 5 times with TBS-Tween (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 80) and saturated for 1 hr at 37°C with 150µl of the same buffer supplemented with 1% BSA. Serial dilutions of sera in saturation buffer were incubated for 1 hr at 37°C. Plates were washed 5 times with TBS-Tween buffer and antigen-bound antibodies were detected with the second antibody (goat anti-mouse IgG, Promega, USA) coupled to alkaline phosphatase (dilution 1/7500 in TBS-Tween buffer). The enzymatic activity was measured using the p-nitrophenylphosphate substrate (Sigma) dissolved in diethanolamine buffer (pH 9.8). OD<sub>415nm</sub> was measured in a Biorad Novapath ELISA reader.

Mouse antibody subclass was determined using immunoplates coated as described above and IgG1- or IgG2a-specific biotin-labelled monoclonal antibodies (rat anti-mouse, dilution 1/7000 in TBS-Tween buffer and 1% BSA, Biosource) as second antibodies. Phosphatase alkaline-conjugated streptavidin (1/1000 dilution, Amersham) was added to each well. Assay of the enzymatic activity proceeded as described above.

In all cases, ELISA titers were identified as the reciprocal of the dilution giving a signal corresponding to 50% of the maximal O.D.<sub>415</sub> value.

20

**12. - Measurement of DerP1-specific IgE**

Immunoplates were coated with rat anti-mouse IgE (10ng/well), for 16 hrs at 4°C. Plates were washed 5 times with TBS-Tween (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 80) and saturated for 1 hr at 37°C with 150µl of the same buffer supplemented with 1% BSA. Serial dilutions of sera in saturation buffer were incubated for 1 hr at 37°C. ProDerP1 was then added at 500ng/ml in saturation buffer. Bound ProDerP1 was detected by addition of biotinylated anti-DerP1 monoclonal antibody 4C1 (Indoor Biotechnologies) Plates were washed 5 times with TBS-Tween buffer and antibodies-bound antigen were detected with addition of streptavidin coupled to alkaline phosphatase (dilution 1/7500 in TBS-Tween buffer). The enzymatic activity was measured using the p-nitrophenylphosphate substrate (Sigma) dissolved in diethanolamine buffer (pH 9.8). OD<sub>415nm</sub> was measured in a Biorad Novapath ELISA reader.

30



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**13. - Proliferation assays**

To measure DerP1-specific T-cell proliferative response, immunised mice were sacrificed before and after bronchoprovocations. Lymphocytes were isolated from spleens. Cells (4 x 10<sup>5</sup>/well in triplicate), cultured in RPMI 1640 with 10% FCS containing 15mM HEPES and 30μM β-mercaptoethanol, were stimulated with serial dilutions of crude mite extract or ProDerP1 in 96-well plates (10 base 2 dilutions of the antigen were tested, starting from a concentration of 25μg/ml). As control, cells were incubated with only RPMI medium. After 4 days, cells were pulsed with 1μCi/well [<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham) for 16 hours. Cells were harvested and <sup>3</sup>H-thymidine uptake was measured by scintillation counting. Proliferative responses were calculated as the means of quadruplicate wells and were expressed as stimulation index (SI). A stimulation index of > 2 was considered positive.

**14. - Cytokines assay**

The level of IFNγ and IL-5 in the lymphocyte culture supernatants were measured in ELISA assays. Plates were coated with 1μg/ml of anti-mouse IL-5 monoclonal (PharMingen) or anti-mouse IFNγ (Biosource) polyclonal antibodies. Plates were washed 5 times with TBS-Tween and saturated for 1 hr at 37°C with 150μl of TBS-Tween-BSA. Serial dilutions of splenocyte culture supernatants were added and incubated for 90 min at 37°C. Biotinylated anti-mouse IL-5 (PharMingen, 1μg/ml) or anti-mouse IFNγ (Biosource, 0.2μg/ml) antibodies were applied to the plates for 1h at 37°C. The antigen-antibody complexes were detected by incubation with streptavidin coupled to horseradish peroxidase (dilution 1/10000, Amersham). The enzymatic activity was measured using tetramethylbenzidine (TMB) as substrate (Sigma). The absorbance at 460nm was measured in a Biorad Novapath ELISA reader. Cytokine concentrations were determined by interpolation from a standard curve performed with purified mouse IL-5 or IFNγ.

**15. - Bronchoalveolar lavage**

Three days after the final aerosol exposure, mice were bled and sacrificed. The lungs were immediately washed via the trachea cannula with 1ml Hank's balanced salt solution (HBSS) which was instilled and gently recovered by aspiration three times. The lavage

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

fluid was centrifuged at 400g for 10min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 300µl Hank's balanced salt solution (HBSS) and cells were counted in a Thoma hemocytometer. Cytospin preparations from 50µl-aliquots were stained with May-Grünwald Giemsa 's stain for differential cell counts.

5

**EXAMPLE II****Expression of MBP-ProDerP1 in *E. coli*****10 1. - Construction of MBP-ProDerP1 expression vector**

The complete synthetic cDNA encoding ProDerP1 (1-302 aa) (SEQ ID NO:1) was isolated from the eukaryotic expression plasmid pNTV 4846 (a pEE 14-derived expression plasmid carrying humanized ProDerP1 coding cassette, (M.Massaer *et al.*, International Archives of Allergy and Immunology, 2001, **125**:32-43) after digestions with *Eag* I and *Xba* I. DNA was blunted using large fragment DNA polymerase (Klenow) before *Xba* I restriction. The 921 bp fragment was inserted at the *Asp* 718 (blunted end)-*Xba* I site of pMAL-c2E (New England Biolabs) to give pNIV4854, downstream of the MBP gene. The amino acid sequence of ProDerP1, encoded by the cDNA of SEQ ID NO:1, is represented in figure 2 (SEQ ID NO:2).

20

**2. - Site-directed mutagenesis**

Mutagenesis of DerP1 cysteine residues at position 4, 31 or 65 (mature ProDerP1 numbering, corresponds to positions 84, 111 or 145 in ProDerP1) was performed in the plasmid pNIV4854, after the substitution of DNA fragments carrying one of the three cysteine codons by synthetic oligonucleotides containing the mutations. The following oligonucleotides were used:

25

5'TTAAGACCCAGTTTGTATCTCAACGCGGAGACCAACGCCGTATCAACGGCA  
ATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGGACCGTGACTCCCATCCG  
CATGC3' (forward) and 5'CGGATGGGAGTCACGGTCCTCATCTG  
30 GCGCAGATCAATCTCAGCGGGGGCATTGCCGTTGATACTACGGGCGTTGGTC  
TCCGCGTTGAGATCGAAACTGGGTC3' (reverse) to generate a 110bp *Afl* II-*Sph* I  
fragment for the mutation of cysteine residue 4 to arginine (C4R),

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

5'CAAGGCGGCCGTGGGTCTTGTGGGCTTTTCAGGCGTGGCCGCGACAG  
 AGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGAGCCTGGACCTCGC3' (forward) and  
 5'TCAGCGAGGTCCAGG CTCTGATTCCGATACGCGAGGTATGCCGACT  
 CTGTGCGGCCACGCCTGAAAAGGCCAACAAGACCCACGGCCGCTTGCAT  
 5 G3' (reverse) to generate a 98bp *Sph* I-*Bsp* I fragment for the mutation of cysteine residue  
 31 to arginine (C31R), 5'TGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCCTCC  
 CAACACGGATGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGC  
 ATA3' (forward) and 5'CTGGATGTATTCGATACCTCTGGGAATCGTAT CC  
 CCCATGACATCCGTGTTGGGAGGCACGGTCAACGCGCTCCTGC3' (reverse) to  
 10 generate a 82bp *Afl* II-*Sph* I fragment for the mutation of cysteine residue 65 to arginine  
 (C65R).

The resulting plasmids containing the ProDerP1 cassette downstream to the MBP gene  
 and carrying respectively the mutations C4R, C31R and C65R were called pNIV4870,  
 pNIV4871 and pNIV4872. All the three mutations were verified by DNA sequencing.  
 15 Mutated ProDerP1 amino acid sequences respectively carrying C4R, C31R and C65R  
 mutation are illustrated in SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:7 respectively.  
 The corresponding encoding nucleic acid sequences are shown in SEQ ID NO:4 (C4R  
 mutation), SEQ ID NO:6 (C31R mutation) and SEQ ID NO:8 (C65R mutation).

### 20 3. – Expression and purification of wild-type and mutant MBP-ProDerP1

*E. coli* containing the different recombinant expression vectors were grown overnight at  
 37°C in 869 medium (A.Jacquet *et al.*, Prot. Exp. Purif. 1999, 17, 392-400) with 100  
 µg/ml ampicillin. Cells were then diluted 1:100 and allowed to grow at 37°C to an optical  
 density between 0.4 and 0.6 at 600 nm. Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) was added  
 25 to a final concentration of 0.3 mM. After a 2h period of induction, cells were harvested  
 by centrifugation at 10000 rpm for 15min.

Bacterial cell pellets from 1 liter cultures were resuspended in 20mM Tris-HCl pH 7.5,  
 containing 1mM aprotinin and AEBSF, and broken under a pressure of 1800 bars using a  
 Cell disrupter (Constant Systems Ltd, Warwick, UK). The lysate was ultracentrifugated at  
 30 150,000g for 60 min. The pellet resulting from the ultracentrifugation was washed with  
 20mM Tris-HCl pH 7.5. Insoluble proteins were extracted overnight at 4°C with 20mM  
 Tris-HCl pH 7.5 containing 6M urea. The suspension was ultracentrifugated at 150,000g

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

for 60 min. The supernatant was directly dialysed overnight against 20mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM EDTA. The solution was centrifugated to remove any precipitated protein and directly applied onto an amylose resin (1 x 15 cm) equilibrated in the same buffer. The column was washed with the starting buffer until the  $A_{280nm}$  reached the baseline. Proteins were eluted by the addition of 10mM maltose in the column buffer. Fractions containing the fusion proteins were pooled and concentrated. Purified proteins were stored at  $-20^{\circ}C$ .

## 10 EXAMPLE III

### Expression of three different ProDerP1 mutants in CHO cells

#### 1. – Site-directed mutagenesis

Mutations of DerP1 cysteine residues at position 4, 31 or 65 (mature DerP1 numbering, corresponds to positions 84, 111 or 145 in ProDerP1) were introduced into the plasmid pNIV4846. Plasmids pNIV4870, pNIV4871 and pNIV4872, containing the DerP1 cassette downstream to the MBP (see Example II) gene and carrying respectively the mutations C4R, C31R and C65R were each restricted with *SfiI-XhoI* to isolate a 714bp fragment. The purified DNA fragments were inserted into plasmid p4846 previously cleaved with the same restriction enzymes. The resulting plasmids containing the DerP1 variants C4R, C31R and C65R were called pNIV4873, pNIV4875 and pNIV4874.

#### 2. – Transient transfections and selection of ProDerP1-producing stable CHO-K1 lines.

To determine the production of DerP1 by plasmids pNIV4873, pNIV4875 and pNIV4874, COS cells were transiently transfected by lipofection. For stable DerP1 expression, CHO-K1 cells were transfected with the different plasmids by lipofection. After a 3-weeks 25 $\mu$ M methionylsulphoximin (MSX) selection, one round of gene amplification was carried out with 100 $\mu$ M MSX.

30

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**EXAMPLE IV****Denatured ProDerP1 displays IgG but not IgE-binding reactivity towards allergic sera.**

- 5 To determine whether a denatured form of ProDerP1 could be used as a hypoallergenic vaccine, IgG- and IgE binding reactivities of denatured (5 min at 100°C in the presence of 50mM  $\beta$ -mercaptoethanol) ProDerP1 were assayed in ELISA tests. As shown in figure 1, denatured ProDerP1 conserved the main part of the IgG epitopes present on native ProDerP1. On the other hand, the denatured allergen highly lost its IgE-binding
- 10 reactivity. Our data suggest that denatured ProDerP1 could represent a hypoallergenic variant of ProDerP1.

**EXAMPLE V****IgE reactivities of MBP-ProDerP1.**

- The aim of the experiment was to compare the IgE reactivity of MBP-ProDerP1 and of natural DerP1. The reactivity of MBP-ProDerP1 with specific IgE from sera of allergic patients was assessed in a direct ELISA wherein immunoplates were directly coated with
- 20 DerP1 or MBP-ProDerP1. Figure 2 shows a strong correlation between the IgE binding to DerP1 and MBP-ProDerP1.

**EXAMPLE VI****IgE-binding reactivities of MBP-ProDerP1 mutants.**

- The IgE-binding capacity of MBP-ProDerP1 mutants was determined in direct ELISA assays for which immunoplates were directly coated with the different forms of MBP-ProDerP1. A serum pool, made from 20 individual *D. pteronyssinus*-allergic patient sera
- 30 with RAST value >100 kU/L, were used in the assays. As shown in figure 3, the IgE binding reactivity of the variants C31R and C65R drastically decreased to 5% compared with that of wild-type MBP-ProDerP1. Strikingly, no reactivity (0% left) of IgE to MBP-

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

ProDerP1 was observed when residue cysteine 4 was mutated to arginine. The IgE reactivities were specific of the ProDerP1 moiety as there were no IgE-mediated immune recognitions of MBP or MBP in fusion with an irrelevant protein. Similar results were obtained with another serum pool from 20 others patients.

5

**EXAMPLE VII****Histamine release activity of various forms of ProDerP1.**

- 10 To compare the allergenic activity of natural DerP1 with that of recombinant mutated derivatives of ProDerP1, basophils from one allergic patient were challenged *in vitro* with various concentrations of allergens and the released histamine was measured. As shown in figure 4, natural DerP1 was able to induce histamine release from basophils even at a concentration of 1ng/ml. By contrast, recombinant mutated forms of ProDerP1 could only
- 15 release histamine at a 1000-10000-fold higher concentration. These results clearly showed that ProDerP1 mutants display lower IgE binding reactivity than does the natural DerP1.

20 **EXAMPLE VIII**

**Immunogenicity experiments with various forms of ProDerP1.****1. – Animal model of house dust mite allergy**

- An animal model of house dust mite allergy has been developed. CBA/J mice were
- 25 injected with purified DerP1 adjuvanted with alum. After four injections at one week interval, animals were subjected to a series of bronchoprovocation with *D. pteronyssinus* extract (figure 5). This model was used to test different recombinant forms of DerP1 as well as different DNA as prophylactic vaccines against house dust mite allergy.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**2. – Vaccine formulations****Table 1** : protein and DNA vaccine formulations tested in the house dust mite allergy animal model depicted in figure 5.

Protein	DNA	Adjuvant	Way of injection
Natural DerP1		Alum	IP
ProDerP1 native		Alum	IP
ProDerP1 native		—	IM
ProDerP1 denatured		Alum	IP
MBP-ProDerP1		Alum	IP
MBP-ProDerP1 C4R		Alum	IP
MBP-ProDerP1 C31R		Alum	IP
MBP-ProDerP1 C65R		Alum	IP

5 IP= intraperitoneal injection

IM=intramuscular injection

**3. – Antibody response - Results**

10 Mice immunized by four injections of natural DerP1 produced high titers of IgG and IgG1, low titers of IgG2a and large amounts of IgE antibodies, indicating that natural DerP1 induces strong Th2 immune responses (Tables 2 and 4).

The anti-DerP1 IgG and IgG1 antibody responses were also strong in mice injected with native or denatured ProDerP1. After injections with native ProDerP1, the IgG2a titers were slightly higher than those obtained with DerP1, IgE titers being comparable or slightly lower than those obtained with DerP1. In contrast to the native ProDerP1-immunized mice, animals injected with denatured ProDerP1 produced high IgG2a titers and very low IgE antibodies. As expected, immunizations with ProDerP1 in the absence of Alum induced poor immune responses (Table 4).

20 MBP-ProDerP1 wild type (WT), C4R, C31R and C65R-sensitized mice showed similar productions of specific IgG and IgG1 antibodies (Table 3). Highest IgG2a titers were observed in groups immunized with MBP-ProDerP1 WT and C31R.

Specific IgE titers were low, whatever the MBP-ProDerP1 variants injected.

Similar results were obtained after mice immunizations with plasmid encoding ProDerP1.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Table 2 : Titers of specific anti-DerP1 antibodies from mice immunized with different antigens. For IgE titers, results are expressed as OD<sub>415nm</sub> values for a 1/10 dilution of sera. Titers were also measured after bronchoprovocations with PBS or with *D. pteronyssinus* extracts (HDM).

Antigen	Bleeding	Challenge	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
DerP1	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		214	900	< 50	1.1
	3		700	6062	< 50	0.2
	4		2500	24390	100	0.6
	5	PBS	8670	16340	300	0.7
		HDM	8230	17440	300	0.6
ProDerP1 native	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		301	1146	< 50	1.1
	3		800	6860	86	0.3
	4		2500	28545	203	0.5
	5	PBS	8266	25500	600	0.3
		HDM	11880	38310	600	0.6
denatured	1		< 50	< 50	< 50	0
	2		330	861	120	0.2
	3		966	3402	210	0.07
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	16380	54040	2700	0.1
		HDM	14200	32140	2700	0.05

10 Table 3 : Titers of specific anti-DerP1 antibodies from mice immunized with different antigens. For IgE titers, results are expressed as OD<sub>415nm</sub> values for a 1/10 dilution of sera. Titers were also measured after bronchoprovocations with PBS or with *D. pteronyssinus* extracts (HDM).



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Antigen	Bleeding	Challenge	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
MBP-ProDerP1 WT	2		637	3351	144	0.046
	3		4444	24720	757	0.039
	4		2500	24390	100	0.6
	5	PBS	6151	29500	2899	0.13
		HDM	3437	22210	1496	0.27
MBP-ProDerP1 C4R	2		583	2212	95	0
	3		1123	6131	356	0.021
	4		2500	28545	203	0.5
	5	PBS	2064	9077	624	0.004
		HDM	2418	14390	635	0.029
MBP-ProDerP1 C31R	2		1221	4572	144	0.017
	3		6472	40405	1311	0.029
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	2897	10880	857	0.063
		HDM	5508	24300	1959	0.074
MBP-ProDerP1 C65R	2		202	887	< 50	0.022
	3		1252	5718	363	0.066
	4		3093	14830	970	0.1
	5	PBS	782	3958	87	0.108
		HDM	3109	16250	430	0.117

Table 4: Titers of specific anti-DerP1 antibodies from mice immunized with different antigens. For IgE titers, results are expressed as OD<sub>415nm</sub> values for a 1/10 dilution of sera. Titers were also measured after bronchoprovocations with PBS or with *D. pteronyssinus* extracts (HDM).

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Antigen	Bleeding	Challenge	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
DerP1	2		201	1135	< 20	0.852
	3		3264	18002	< 50	0.34
	4		8271	43306	< 50	0.59
	5	PBS	10072	57670	< 100	0.44
		HDM	6058	72810	< 100	0.68
ProDerP1 Alum	2		929	7422	159	0.8
	3		5061	27244	586	0.37
	4		15110	68960	1016	0.46
	5	PBS	10900	57255	1190	0.421
		HDM	16770	79460	1125	0.485
ProDerP1 (no adjuvant)	2		136	774	< 20	0.58
	3		1389	8571	104	0.13
	4		4704	14126	120	0.17
	5	PBS	3587	16930	105	0.28
		HDM	3880	20737	100	0.25

#### 4. - T-cell proliferative response - Results

- 5 Before (control) and after aerosol challenge, splenocytes isolated from immunized mice were examined for T-cell proliferative response by stimulation with ProDerP1 or *D. pteronyssinus* extract. Results are shown in Table 5 (stimulation index) and in Table 6 (cytokines).

- 10 Allergen-specific T cell responses were detected in immunized mice with the different recombinant ProDerP1 mutants. Strongest responses were observed when splenocytes were restimulated with ProDerP1. T-cell reactivities appeared to be independent from the challenge.

- These results in Table 5 indicated that the different forms of ProDerP1 shared common T-cell epitopes with natural DerP1. Moreover, destructurement of ProDerP1 by thermal denaturation or site-directed mutagenesis did not alter ProDerP1 T-cell reactivity,

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

confirming that these forms are hypoallergens with very low IgE-binding reactivity able to stimulated T-cell responses.

Table 5:

- 5 Vaccinated mice were challenged or not with PBS or *D. pteronyssinus* extracts. Spleen cells were isolated and restimulated in vitro with purified ProDerP1 or with *D. pteronyssinus* extracts. Stimulation index was measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. -: not available. These results are obtained from different experiments, not from only one. Consequently, cytokine assays can not be compared between all groups.

Antigen	Concentration of stimulating antigen (µg/ml)	S.I. (stimul. with ProDerP1)			S.I. (stimul. with HDM ext.)		
		aerosol			aerosol		
		None	PBS	HDM	None	PBS	HDM
MBP-ProDerP1 WT	50	7.3	14.97	20.8	-	-	-
MBP-ProDerP1 C4R	50	19.1	9.7	16.3	-	-	-
MBP-ProDerP1 C31R	50	5.4	10.0	14.7	-	-	-
MBP-ProDerP1 C65R	50	6.8	8.8	13.0	-	-	-
DerP1	40	-	1.6	17.5	-	1.6	7.5
ProDerP1	40	-	30.9	11.5	-	2.8	2.8
ProDerP1 denatured	40	-	24.0	15.9	-	1.7	1.4
Alum	40	-	4.2	4.6	-	2.0	1.3

10

The presence of cytokines IL-5 and IFN $\gamma$  in the culture supernatants of restimulated splenocytes was determined in ELISA (Table 6). If we compared the ratio [IFN $\gamma$ ]/[IL-5], we could conclude that vaccinations with natural DerP1 or ProDerP1 adjuvanted with alum induced a better production of IL-5 than IFN $\gamma$ . The different forms of MBP-ProDerP1 (mutants and wild-type) as well as denatured ProDerP1 induced comparable levels of both cytokines.

15

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Table 6: [IL-5] and [IFN $\gamma$ ] in supernatants from ProDerP1-restimulated splenocytes. These results are obtained from different experiments, not from only one. Consequently, cytokine assays can not be compared between all groups.

5

Antigen	[IL-5] (pg/ml)			[IFN $\gamma$ ] (pg/ml)		
	Aerosol			Aerosol		
	none	PBS	HDM	None	PBS	HDM
MBP-ProDerP1	420	165	929	987	1076	1282
MBP-ProDerP1C4R	330	51	308	551	1366	1177
MBP-ProDerP1C31R	430	202	1141	1348	1281	3392
MBP-ProDerP1C65R	0	0	953	0	0	1161
Alum	0	0	0	0	0	0
DerP1	75	45	495	0	0	190
ProDerP1	0	355	400	0	125	210
ProDerP1 denatured	-	850	736	-	822	1119

##### 5. – Bronchoalveolar lavage - Results

- Sensitisation with natural DerP1 and subsequent exposure to aerosolised house dust mite extracts induced significantly higher bronchoalveolar cell numbers (Table 7). Seven exposures to aerosolised house dust mite extracts were shown to induce airway eosinophilia in only the animals vaccinated with DerP1. In this group, airway eosinophilia was not observed when DerP1-sensitised animals were not nebulized or exposed to aerosolised PBS.
- 15 Vaccinations with the different recombinant forms of ProDerP1 prevented airway eosinophilia, even after exposure to aerosolised HDM extracts.

Table 7: Characterization of the bronchoalveolar lavage fluid of different antigen-immunized mice exposed to PBS or house dust mite extracts aerosols

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Antigen	Aerosol	Lympho (%)	Eosino (%)	Neutro (%)	Macro (%)	Mono (%)	Total cells (10 <sup>5</sup> /ml)
DerP1	none	86	4	0	6	3	2.2
	HDM	13	68	7	6	6	167
	PBS	90	0	2	4	4	4.8
ProDerP1	none	90	0	0	7	3	3.2
	HDM	69	7	12	3	10	5.1
	PBS	76	5	4	7	8	7.6
ProDerP1 denatured	none	51	5	2	22	20	4
	HDM	52	4	26	10	7	6.9
	PBS	67	2	2	20	9	5.2
Alum	none	88	1	4	7	0	3.6
	HDM	80	0	4	14	1	1.5
	PBS	88	1	5	5	1	1.2
MBP-ProDerP1	none	85	2	4	7	0	1.5
	HDM	70	3	14	8	5	2.1
	PBS	88	1	6	5	0	0.6
MBP-ProDerP1 C4R	none	90	2	4	4	1	2.2
	HDM	71	2	14	11	1	2
	PBS	80	2	7	10	1	4.5
MBP-ProDerP1 C31R	none	79	1	14	7	0	1.3
	HDM	65	4	27	5	1	2
	PBS	87	2	7	5	1	3
MBP-ProDerP1 C65R	none	85	0	4	10	1	2.4
	HDM	84	1	7	7	1	2.4
	PBS	84	1	4	12	0	1.5

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**EXAMPLE IX****Expression plasmid for nucleic acid vaccination (NAVAC)****1. - Construction of ProDerP1 encoding plasmid for nucleic acid vaccination**

- 5 The ProDerP1 coding cassette (1-302aa) was excised from plasmid pNIV4846 (see above), restricted with *HindIII* and *BglII*, and inserted into plasmid pJW4304 previously cleaved with *HindIII* and *BglII*. The resulting plasmid, named pNIV4868, was verified by DNA sequencing.

**10 2. - Site-directed mutagenesis**

- Mutations of ProDerP1 cysteine residues at position 4, 31 or 65 (mature DerP1 numbering, corresponds to positions 84, 111 or 145 in ProDerP1) were introduced into the plasmid pNIV4868. Plasmids pNIV4870, pNIV4871 and pNIV4872, containing the ProDerP1 cassette downstream to the MBP gene and carrying respectively the mutations C4R, C31R and C65R were each restricted with *AflII-BamHI* to isolate a 699bp fragment. pNIV 4868 was digested with *AflII-HpaI* to isolate a 480bp fragment. The two purified DNA fragments were inserted into plasmid pJW4304 previously cleaved with *HpaI-BamHI*. The resulting plasmids containing the ProDerP1 variants C4R, C31R and C65R were called pNIV4879, pNIV4880 and pNIV4881.

20

**EXAMPLE X****Expression of ProDerP1 in *Pichia pastoris*****25 1. - Construction of ProDerP1 expression vector**

- The ProDerP1 coding cassette from pNIV4846 (full-length 1-302aa ProDerP1 cDNA with optimised mammalian codon usage) was amplified by PCR using the following primers: 5'ACTGACAGGCCTCGGCCGAGCTCCATTAA3' (*StuI* restriction site in bold, forward) and 5'CAGTCACCTAGGTCTAGACTC GAGGGGAT3' (*AvrII* restriction site in bold, reverse). The amplified fragment was cloned into the pCR2.1 TOPO cloning vector. The correct ProDerP1 cassette was verified by DNA sequencing. Recombinant TOPO vector was digested with *StuI-AvrII* to generate a 918bp fragment

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

which was introduced into the pPIC9K expression vector restricted with *Sna*BI-*Avr*II. The resulting plasmid, pNIV4878, contains the ProDerP1 cassette downstream to the *S.cerevisiae*  $\alpha$  factor

## 5 2. - Site-directed mutagenesis

Expression plasmid for the production of unglycosylated ProDerP1 (N52Q, mature DerP1 numbering) was derived from pNIV4878 by overlap extension PCR using a set of four primers. The following primers:

- 10 5'GGCTTTTCGAACACCTTAAGACCCAG3' (primer 1, *Afl*II restriction site in bold, forward) and 5'GCTCCCTAGCTACGTA TCGGTAATAGC3' (primer 2, *Sna*BI restriction site in bold, reverse) were used to amplify a 317bp fragment encoding the ProDerP1 amino acid sequence 71-176.

- The following primers 5'CCTCGCGTATCGGCAACAGAGCCTGGACC3' (primer 3, mutation N52Q in bold, forward) and 5'GGTCCAGGCTCTGTGCCC  
15 GATACGCGAGG3' (primer 4, mutation N52Q in bold, reverse) were used to introduce mutation N52Q in the ProDerP1 sequence.

- The mutated 317bp *Afl*II-*Sna*BI fragment was generated by a three-step process. In PCR n°1, primers 1 and 4 were mixed with pNIV4878 to produce a ~ 200 bp fragment. In PCR n°2, primers 2 and 3 were mixed with pNIV4878 to produce a ~ 140 bp. The two PCR  
20 products were purified onto agarose gel and used as templates for a third round of PCR to obtain a ~ 340 bp fragment. This purified fragment was cloned into the pCR2.1 TOPO cloning vector (Invitrogen). The mutation was verified by DNA sequencing. Recombinant TOPO vector was digested with *Afl*II-*Sna*BI to generate a 317bp fragment which was ligated into the similarly digested pNIV4878. The resulting plasmid,  
25 pNIV4883, contains the ProDerP1 N52Q downstream to the *S.cerevisiae*  $\alpha$  factor.

- To obtain unglycosylated variants of ProDerP1 carrying mutations of DerP1 cysteine residues at position 4, 31 or 65 (mature DerP1 numbering), overlap extension PCR using the same set of primers were performed with plasmids pNIV4873, pNIV4875 and pNIV4874. The resulting plasmids pNIV4884, 4885 and 4886 encode respectively  
30 ProDerP1 N52Q C4R, N52Q C31R and N52Q C65R.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

**2. - Transformation of *P. pastoris***

Plasmid pNIV4878 was introduced into *P. pastoris* using the spheroplast transformation method. Transformants were selected for histidinol deshydrogenase (His<sup>+</sup>) prototrophy.

The screening of His<sup>+</sup> transformants for geneticin (G418) resistance was performed by plating clones on agar containing increasing concentrations of G418.

Transformation with plasmids encoding ProDerP1 N52Q, ProDerP1 N52Q C4R, N52Q C31R and N52Q C65R was performed using the same method.

**3. - Production of ProDerP1 by recombinant yeast**

G418 resistant clones were grown at 30°C in BMG medium to an OD<sub>600nm</sub> of 2-6. Cells were collected by centrifugation and resuspended to an OD<sub>600nm</sub> of 1 in 100ml of BMG medium. ProDerP1 expression was induced by daily addition of methanol 0.5% for 6 days. The supernatant was collected by centrifugation and stored at -20°C until purification.

**4. - Purification of ProDerP1 from yeast culture supernatant**

Supernatants were diluted 10 times with water and, after pH adjustment to 9, directly loaded onto a Q sepharose column equilibrated in 20mM Tris-HCl pH 9. The column was washed with the starting buffer. Protein elutions proceeded by step-wise increasing NaCl concentration in the buffer. The ProDerP1-enriched fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration onto a Filtron membrane (Omega serie, cut-off: 10kD). The ProDerP1 purification was achieved by a gel filtration chromatography onto a superdex-75 column (1 x 30 cm, Pharmacia) equilibrated in PBS pH 7.3. Purified ProDerP1 was concentrated and stored at -20°C.



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## SEQUENCE INFORMATION

## SEQ ID NO:1

```

1  CGGCCGAGCTCCATTAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA
5  51  GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGAGGCCGCGCGCAAGAACTTCCTGG
101  AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGCGGGGCTATAAATCACCTGTTC
151  GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGTATGAGCGCCGAGGC
201  TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT
251  GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCGATGAGG
10  301  ACCGTGACTCCCATCCGATGCAAGCGGCTGCGGCTCTTGTGGGCCTT
351  TTCAGGCGTGCGCGCAGACAGATCGGCATACCTTCGCGTATCGGAATCAGA
401  GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTCCCAACACGGA
451  TGTTCATGGGGATACGATTCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
501  CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATAAGTAGCTAGGGAGCAGTCTTGCC
15  551  GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTCCCAATTATTGCCAGATCTAC
601  CCCCCTAATGCGCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGACACGCG
651  CATCGCTGTATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701  ACGGCGGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
751  GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
20  801  CGTGAGAAACAGTTGGACACTAACTCGGCGCACACGGCTACGGCTACT
851  TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
901  ATCTTGTA

```

## SEQ ID NO:2

```

25  Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15
    Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30
    Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45
    Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60
    Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75
30  Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90
    Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105
    Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120
    Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135
    Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150
35  Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165
    Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180
    Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195
    Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 5 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

## SEQ ID NO:3.

10 Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 15 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Arg Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 20 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 25 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 30 Ile Leu 302

## SEQ ID NO:4

1 CGGCCGAGCTCCATTAAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCGCAAGAATTCCTGG  
 101 AAGCGTGAATACGTGCAGAGCAACGCGGGGCTATAAATCACCTGTGCC  
 151 GACCCTGCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTCTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCG  
 251 GTAGTATCAACGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCACACGGA  
 451 TGTCTATGGGATACGATTCACAGGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 5 501 CGTCGTGAGGAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCTCTCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCAATTCCAATTATTGCCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGCGCGACAGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTCTATCATCGGAATCAAGGATCTGACGACATTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGGACACACGGATATCAGCCAACTACCAC  
 10 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGCGGACAAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

15 **SEQ ID NO:5**  
 Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 20 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Arg Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 25 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 30 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 35 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## SEQ ID NO:6

```

1  CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA
51  GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCGCAAGAACTTCCTGG
101  AAAGCGTAAATACGTCAGAGCAACGGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC
5  151  GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGTATGAGCGCGGAGGC
201  TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT
251  GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG
301  ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGCGCGCCCTGGGTCTTTGTTGGCCCTT
351  TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA
10  401  GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTTCCCAACACGGA
451  TGTCTATGGGATACGATTCCCAAGGTATCGAATACATCCAGCATATATGG
501  CGTCGTGCAGGAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGAGCAGTCCCTGCC
551  GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATTGCCAGATCTAC
601  CCCCCAATGSCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
15  651  CATCGCTGTCTATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701  ACGGCGCACAAATCATCCAGCGGACAAACGGATATCAGCCAACTACCAC
751  GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
801  CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
851  TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGTTG
20  901  ATCCTGTAA

```

## SEQ ID NO:7

```

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15
Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30
25  Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45
Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60
Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75
Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90
Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105
30  Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120
Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135
Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Arg Ala Ser Gln His Gly 150
Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165
Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180
35  Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195
Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210
Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225
Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 301  
 5 Ile Leu 302

## SEQ ID NO:8

1 CGGCCGAGCTCCATTAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 10 101 AAAGCGTGAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGTATGAGCGCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGAGACCAACGCTT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGATGCAAGGCGGCTGCGGTCTTGTGGGCTT  
 15 351 TTCAGGCTGGCGCGACAGATCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGAGCTCGTTGACCGTGCCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCTATGGGATACGATTCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCTGCC  
 551 GCGCTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATTGCCAGATCTAC  
 20 601 CCCCCTAATGCCACACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTCTATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTTCCGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCAATCATCCAGCGGACACACGGATATCAGCCAAACTACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACACGGCTACGGCTACT  
 25 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCGGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

## SEQ ID NO:9.

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 30 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 35 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
Arg His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 5 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 10 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

## SEQ ID NO:10

15 1 CGGCCGAGCTCCATTAGACCTTCGAGGAATACAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGCCGCGCGCAAGAATTCTCTGG  
 101 AAAGCGTGAATACGTGCAGAGCAACGCGGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTCTGATGAGCGCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCCT  
 20 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCGCTGAGATTGATCTGCGCGAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGCGCGCTGCGGGTCTTGTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 CGTCATCGGGGATACGATTCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGC  
 25 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCCAAATTATTGCGCAGATCTAC  
 601 CCCCCTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGCGCGAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTCTCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCGGGCACTATG  
 701 ACGGGCGCACATCATCCAGCGCGACACAGGATATCAGCCAAACTACCAC  
 30 751 GCGCTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGCGGACAAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG  
 901 ATCCTGTAA

## 35 SEQ ID NO:11

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 5 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 10 Gln Ser Arg Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 15 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

## 20 SEQ ID NO:12

1 CGGCCGAGCTCCATTAGACCITTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGTATGAGCGCGGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCC  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTGGGCCTT  
 351 TTCAGGCGTGGCGGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCTATGGGGATACGATTCCCAAGAGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCTGTGAGGAAAGCTATTACCGATAAGTAGCTAGGGAGCAGTCCCGTC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCGAATTTATGCCAGATCTAC  
 601 CCCCTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC  
 651 CATCGCTGTCTATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCAATTCGGCACTATG  
 701 ACGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAATACCAC  
 751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT  
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAATGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT  
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGT  
 901 ATCCTGTAA

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## SEQ ID NO:13

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe 15  
 Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys 30  
 5 Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala 45  
 Ile Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg 60  
 Phe Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe 75  
 Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala 90  
 Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile 105  
 10 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val 120  
 Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu 135  
 Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly 150  
 Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His 165  
 Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu 180  
 15 Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn 195  
 Tyr Arg Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala 210  
 Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys 225  
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val 255  
 20 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 270  
 Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala 285  
 Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val 300  
 Ile Leu 302

## 25 SEQ ID NO:14

1 CGGCCGAGCTCCATTAAAGACCTTCGAGGAATCAAGAAGCCTTCAACAA  
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCGCGCAAGAACTTCCTGG  
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCAOCTGTCC  
 151 GACCTGTCTTTAGACGAGTTCAAGAACCCTTCTGATGAGCGCCGAGGC  
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGATCTCAACCGGAGACCAACGCCT  
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG  
 301 ACCGTGACTCCCATCCGATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGTGGGCCCTT  
 351 TTCAGGCGCTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA  
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTCCCAACACGGA  
 451 TGTCTATGGGGATACGATTCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG  
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCCTGCC  
 551 GCCGTCTTAACGCACAGCGCTTCGGCATTCCCAATTATCGTCAGATCTAC  
 601 CCCCCCTAATGCCCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```
651  CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701  ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAACTACCAC
751  GCGGTCAACATCGTGGGTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
801  CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
5  851  TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
901  ATCCTGTAA
```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## CLAIMS

1. A recombinant *Dermatophagoides pteronyssinus* DerP1 or ProDerP1 (DerP1/ProDerP1) protein allergen derivative wherein said allergen derivative has a  
5 significantly reduced allergenic activity compared to that the wild-type allergen.
2. A recombinant DerP1/ProDerP1 derivative as claimed in claim 1, wherein said derivative has been thermally treated.
3. A recombinant DerP1/ProDerP1 derivative as claimed in claim 1, wherein said derivative has been genetically mutated.
- 10 4. A recombinant DerP1/ProDerP1 mutant as claimed in claim 3, wherein said mutant comprises one or more of the DerP1 following mutation: a mutation of the cysteine 4 residue, a mutation of the cysteine 31 residue, a mutation of the cysteine 65 residue, a mutation of the cysteine 71 residue, a mutation of the cysteine 103 residue and a mutation of the cysteine 117 residue.
- 15 5. A recombinant mutant allergen having any of the sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13.
6. An isolated nucleic acid molecule encoding a mutated version of an allergen as claimed in any one of claims.
- 20 7. A nucleic acid sequence according to claim 6 wherein the codon usage pattern resembles that of highly expressed mammalian genes.
8. An expression vector containing a nucleic acid of claim 6 or 7.
9. A host cell transformed with a nucleic acid sequence of claim 6 or 7 or with a vector as claimed in claim 8.
- 25 10. An immunogenic composition comprising a recombinant protein or mutant allergen as claimed in any one of claims 1 to 5, or an encoding polynucleotide as claimed in claim 6 to 8, and, optionally, an adjuvant.
11. An immunogenic composition as claimed in claim 10, wherein the adjuvant is a preferential stimulator of Th1-type immune responses.
- 30 12. An immunogenic composition as claimed in claim 10 or 11 wherein the adjuvant comprises one or more of 3D-MPL, QS21, a CpG oligonucleotide, a polyethylene ether or ester or a combination of two or more of these adjuvants.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

13. An immunogenic composition as claimed in any of claims 10 to 12 wherein the allergen is presented in an oil in water or a water in oil emulsion vehicle.
14. A immunogenic composition as claimed herein for use in medicine.
15. Use of a recombinant protein or mutant allergen as claimed in any one of claims 1 to 5 in the manufacture of a medicament for the treatment of allergy.
16. A method of treating a patient suffering from or preventing a patient susceptible to allergic responses, comprising administering to said individual an immunogenic composition as claimed in claims 10 to 13.

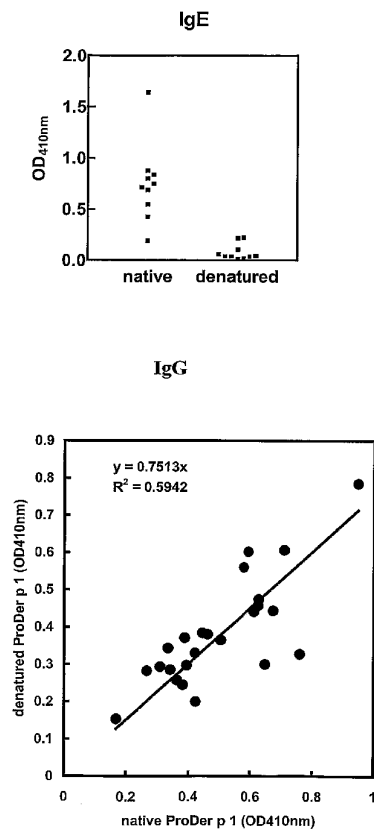
10

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

1/3

**FIG. 1:** IgG and IgE-binding reactivity of denatured ProDerP1 expressed in CHO cells.

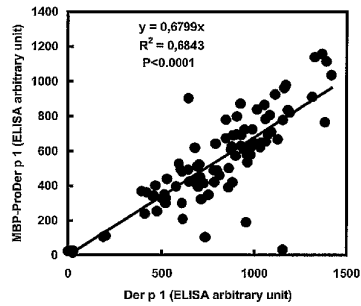


WO 03/016340

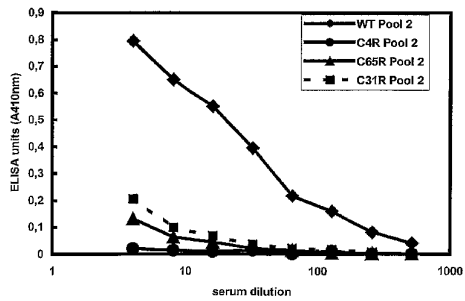
PCT/EP02/09122

2/3

**FIG. 2:** Correlation between the IgE reactivity of MBP-ProDerP1 and natural DerP1.



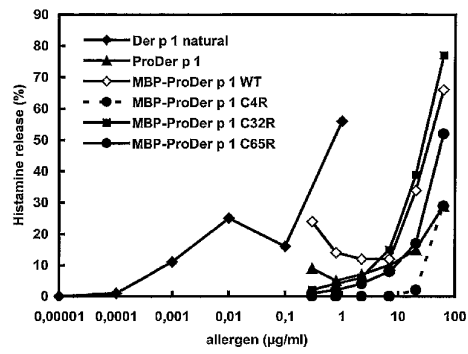
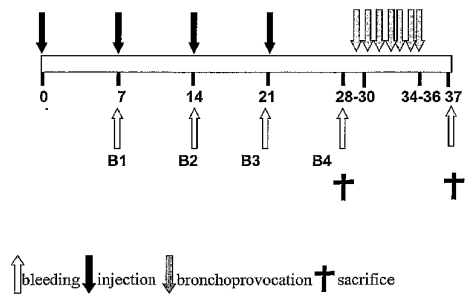
**FIG. 3:** IgE-binding reactivities of MBP-ProDerP1 mutants, carrying the mutations C4R, C31R and C65R.



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

3/3

**FIG. 4:** Histamine release activity of allergens.**Fig. 5:** Schematic representation of the animal model of house dust mite allergy.

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

&lt;120&gt; Novel Compounds

&lt;130&gt; B45282

&lt;150&gt; 26

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 909

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Dermatophagoides pteronyssinus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(906)

&lt;400&gt; 1

```

cgg cgg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc ggg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20     25     30

ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac ggc ggg gct ata aat cac 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35     40     45

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50     55     60

gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65     70     75     80

acc aac gcc tgc agt atc aac ggc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85     90     95

cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa ggc gcc tgc ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100    105    110

tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115    120    125

gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130    135    140

tgc gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

145          150          155          160
gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165          170          175

gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180          185          190

att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
195          200          205

gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210          215          220

aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225          230          235          240

cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Ser Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245          250          255

tac tog aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260          265          270

gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275          280          285

gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290          295          300

taa 909

<210> 2
<211> 302
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 2
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125

```



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130      135      140
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145      150      155      160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165      170      175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180      185      190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195      200      205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210      215      220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225      230      235      240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245      250      255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260      265      270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275      280      285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290      295      300

```

```

<210> 3
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> C4R mutant of ProDerP1

```

```

<400> 3
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20      25      30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35      40      45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50      55      60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65      70      75      80
Thr Asn Ala Arg Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85      90      95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100      105      110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115      120      125
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130      135      140
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145      150      155      160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165      170      175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180      185      190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195      200      205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210      215      220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

225          230          235          240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
          245          250          255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
          260          265          270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
          275          280          285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
          290          295          300

<210> 4
<211> 909
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(906)

<223> C4R mutant of ProDerP1

<400> 4
cgg ccg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac ggc ggg gct ata aat cac 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

acc aac gcc cgt agt atc aac ggc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Arg Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95

cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa ggc gcc tgc ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110

tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125

gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130 135 140

tgc gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145 150 155 160

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165 170 175

gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180 185 190

att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
195 200 205

gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210 215 220

aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225 230 235 240

cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245 250 255

tac tgg aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260 265 270

gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275 280 285

gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290 295 300

taa 909

<210> 5
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C31R mutant of ProDerP1

<400> 5
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Arg Gly
100 105 110

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115      120      125
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130      135      140
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145      150      155      160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165      170      175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180      185      190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195      200      205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210      215      220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225      230      235      240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245      250      255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260      265      270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275      280      285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290      295      300

```

<210> 6  
 <211> 909  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(906)

<223> C31R mutant of ProDerF1

```

<400> 6
cgg cgg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20      25      30

ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac gcc ggg gct ata aat cac 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35      40      45

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50      55      60

gcc gag gct ttc gaa cac ott aag acc cag ttt gat ctg aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65      70      75      80

acc aac gcc tgc agt atc aac gcc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85      90      95

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

cgc cag atg agg acc gtg aot ccc atc cgc atg caa ggc ggc cgt ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Arg Gly
      100      105      110

tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
      115      120      125

gcg tat cgg aat cag ago ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
      130      135      140

tgc gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
      145      150      155      160

gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
      165      170      175

gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
      180      185      190

att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
      195      200      205

gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
      210      215      220

aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
      225      230      235      240

cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
      245      250      255

tac tgc aac gcc cag ggc gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
      260      265      270

gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
      275      280      285

gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
      290      295      300

taa 909

<210> 7
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C65R mutant of ProDerP1

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

<400> 7
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20      25      30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35      40      45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50      55      60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65      70      75      80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85      90      95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100     105     110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115     120     125
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130     135     140
Arg Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145     150     155     160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165     170     175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180     185     190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195     200     205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210     215     220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225     230     235     240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245     250     255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260     265     270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275     280     285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290     295     300

<210> 8
<211> 909
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(906)

<223> C65R mutant of ProDerPI

<400> 8
cgg ccg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15
aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20      25      30
ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac ggc ggg gct ata aat cac 144
8

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
   35           40           45
ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
   50           55           60
gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
   65           70           75           80
acc aac gcc tgc agt atc aac gcc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
   85           90           95
cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa gcc gcc tgc ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
   100          105          110
tct tgt tgg gcc ttt tca gcc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
   115          120          125
gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
   130          135          140
cgt gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Arg Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
   145          150          155          160
gaa tac atc cag cat aat gcc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
   165          170          175
gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc gcc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
   180          185          190
att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
   195          200          205
gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
   210          215          220
aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
   225          230          235          240
cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
   245          250          255
tac tgc aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
   260          265          270
gac act aac tgg gcc gac aac gcc tac gcc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
   275          280          285

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg      906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290                295                300

```

```

taa                                                    909

```

```

<210> 9
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> C71R mutant of ProDerP1

```

```

<400> 9
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20     25     30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35     40     45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50     55     60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65     70     75     80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85     90     95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100    105    110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115    120    125
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130    135    140
Cys Ala Ser Gln His Gly Arg His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145    150    155    160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165    170    175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180    185    190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195    200    205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210    215    220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225    230    235    240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245    250    255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260    265    270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275    280    285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290    295    300

```

```

<210> 10
<211> 909
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>

```



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(906)

&lt;223&gt; C71R mutant of ProDerP1

&lt;400&gt; 10

```

cgg ccg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac ggc ggg gct ata aat cac 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

acc aac gcc tgc agt atc aac ggc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95

cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa ggc ggc tgc ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110

tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125

gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130 135 140

tgc gcc tcc caa cac gga cgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Arg His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145 150 155

gaa tac atc cag cat aat gcc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165 170 175

gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180 185 190

att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
195 200 205

gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210 215 220

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225                230                235                240

cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245                250                255

tac tcg aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260                265                270

gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275                280                285

gac ctg atg atg atc gag gag tac cgg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290                295                300

taa 909

```

```

<210> 11
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> C103R mutant of ProDerP1

```

```

<400> 11
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20     25     30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35     40     45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50     55     60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65     70     75     80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85     90     95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100    105    110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115    120    125
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130    135    140
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145    150    155    160
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165    170    175
Val Ala Arg Glu Gln Ser Arg Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180    185    190
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
195    200    205
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210    215    220
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225    230    235    240
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

                245                250                255
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
                260                265                270
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
                275                280                285
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
                290                295                300

<210> 12
<211> 909
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(906)

<223> C103R mutant of ProDerP1

<400> 12
cgg cgg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac ggc ggg gct ata aat cac 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

acc aac gcc tgc agt atc aac ggc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95

cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa gcc gcc tgc ggg 336
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110

tct tgt tgg gcc ttt toa ggc gtg gcc gcg aca gag tgc gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125

gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130 135 140

tgc gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145 150 155 160

gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
      165      170      175
gta gct agg gag cag tcc cgt cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
      180      185      190
att tcc aat tat tgc cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
      195      200      205
gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc gct gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
      210      215      220
aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
      225      230      235      240
cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cac gcg gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
      245      250      255
tac tcg aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
      260      265      270
gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
      275      280      285
gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
      290      295      300
taa 909

<210> 13
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C117R mutant of ProDerF1

<400> 13
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
 1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
 20      25      30
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
 35      40      45
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
 50      55      60
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65      70      75      80
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 85      90      95
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100      105      110
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115      120      125

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp  
 130 135 140  
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr  
 165 170 175  
 Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly  
 180 185 190  
 Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg  
 195 200 205  
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile  
 210 215 220  
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln  
 225 230 235 240  
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly  
 245 250 255  
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp  
 260 265 270  
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile  
 275 280 285  
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu  
 290 295 300

<210> 14  
 <211> 909  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(906)

<223> C117R mutant of ProDerP1

<400> 14  
 cgg cgg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aaa gcc ttc aac 48  
 Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn  
 1 5 10 15  
 aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96  
 Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe  
 20 25 30  
 ctg gaa agc gtg aaa tac gtg cag agc aac gcc ggg gct ata aat cac 144  
 Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His  
 35 40 45  
 ctg tcc gac ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc 192  
 Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser  
 50 55 60  
 gcc gag gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcg gag 240  
 Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu  
 65 70 75 80  
 acc aac gcc tgc agt atc aac gcc aat gcc ccc gct gag att gat ctg 288  
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu  
 85 90 95  
 cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa gcc gcc tgc ggg 336  
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

100          105          110
tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tgg gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115          120          125
ggc tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gag ctc gtt gac 432
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130          135          140
tgc gcc tcc caa cac gga tgt cat ggg gat acg att ccc aga ggt atc 480
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145          150          155          160
gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165          170          175
gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aac gca cag cgc ttc ggc 576
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180          185          190
att tcc aat tat cgt cag atc tac ccc cct aat gcc aac aag atc agg 624
Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
195          200          205
gag gcc ctg gcg cag acg cac agc gcc atc got gtc atc atc gga atc 672
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210          215          220
aag gat ctg gac gca ttc cgg cac tat gac ggg cgc aca atc atc cag 720
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225          230          235          240
cgc gac aac gga tat cag cca aac tac cag cgc gtc aac atc gtg ggt 768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245          250          255
tac tgg aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac agt tgg 816
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260          265          270
gac act aac tgg ggc gac aac ggc tac ggc tac ttc gcc gcc aac atc 864
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275          280          285
gac ctg atg atg atc gag gag tac ccg tac gtg gtg atc ctg 906
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290          295          300
taa 909

<210> 15
<211> 108
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 15
ttaagaccga gtttgatctc aacgaggaga ccaacgcccg tatcaacggc aatgcccccg 60

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

ctgagattga tctgcgccag atgaggaccg tgactcccat ccgcatgc 108

<210> 16
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 16
cggatgggag tcacggtcct catctggcgc agatcaatct cagcgggggc attgccgttg 60
atactacggg cgttggtctc ccggttgaga tcgaaactgg gtc 103

<210> 17
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17
caaggcgggc gtgggtcttg ttgggccttt tcaggcgtgg ccgcgacaga gtcggcatac 60
ctcgcgtatc ggaatcagag cctggacctc gc 92

<210> 18
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
tcagcagggt ccaggctctg attccgatac gcgaggtatg ccgactctgt cgcggccacg 60
cctgaaaagg cccaacaaga cccacggccg ccttgcatg 99

<210> 19
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 19
tgagcaggag ctcggtgacc gtgcctccca acacggatgt catggggata cgattccacg 60
aggtatcgaa tacatccaga ata 83

<210> 20
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 20
ctggatgtat tcgatacttc tgggaatcgt atcccccatg acatccgtgt tgggagggac 60
ggtcaacgcg ctctctgc 77

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

<210> 21  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 21  
actgacaggc ctgggccgag ctccattaa 29  
  
<210> 22  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 22  
cagtcaccta ggtctagact cgaggggat 29  
  
<210> 23  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 23  
ggctttcgaa caccttaaga cccag 25  
  
<210> 24  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 24  
gtccocotagc taegtatogg taatagc 27  
  
<210> 25  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
<400> 25  
cctcgcgat cygcaacaga gcctggacc 29  
  
<210> 26  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Primer



WO 03/016340

PCT/EP02/09122

<400> 26  
ggtcaggct ctgttgccga tacgcagg

29

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09122
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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)		
SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 25823 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;BOLLEN ALEX (BE); JACOBS PAUL (BE); BRU) 27 May 1999 (1999-05-27) cited in the application page 4, line 4 - line 13 page 6, line 30 -page 7, line 22; example 2	1-16
X	WO 01 29078 A (BEST ELAINE A ;HESKA CORP (US); MODERMOTT MARTIN J (US)) 26 April 2001 (2001-04-26) See SEQ ID NO:14 page 63, line 25 - line 29	1-16
A	US 5 670 356 A (SHERF BRUCE A ET AL) 23 September 1997 (1997-09-23) abstract column 9, line 19 -column 10, line 7 --- -/-	1-16
<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 claim 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 "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 December 2002		27/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Sprinks, M

Form PCT/ISA/210 (enclosure sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 02/09122

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 03870 A (HOULBROOK KENNETH) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document	1-16

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

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP 02/09122
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 16 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

 International Application No.  
 PCT/EP 02/09122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9925823	A	27-05-1999	CA 2309885 A1
		WO 9925823 A2	27-05-1999
		EP 1032669 A2	06-09-2000
		JP 2001523452 T	27-11-2001
WO 0129078	A	26-04-2001	AU 7878900 A
		WO 0129078 A2	26-04-2001
US 5670356	A	23-09-1997	NONE
WO 9603870	A	15-02-1996	AT 199476 T
		AU 687212 B2	15-03-2001
		AU 2749095 A	19-02-1998
		CA 2195978 A1	04-03-1996
		DE 69520275 D1	15-02-1996
		DE 69520275 T2	12-04-2001
		DK 773717 T3	31-10-2001
		EP 1043032 A2	02-07-2001
		EP 0773717 A1	11-10-2000
		ES 2156942 T3	21-05-1997
		WO 9603870 A1	01-08-2001
		PT 773717 T	15-02-1996
			30-08-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39	A 6 1 P 37/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/08	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 14/435	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ボレン, アレックス

ベルギー国 ベー - 6 0 4 1 ゴッスリー, リュ デ プロフェッスール ジーネル エ ブラシ  
エ 1 2, ユニベルシテ リブル ド ブリュッセル, インスティテュ ド ビオロジエ エ ド  
メドゥサン モレキュレール

(72)発明者 ジャケ, アラン

ベルギー国 ベー - 6 0 4 1 ゴッスリー, リュ デ プロフェッスール ジーネル エ ブラシ  
エ 1 2, ユニベルシテ リブル ド ブリュッセル, インスティテュ ド ビオロジエ エ ド  
メドゥサン モレキュレール

(72)発明者 マギ, マウロ

ベルギー国 ベー - 6 0 4 1 ゴッスリー, リュ デ プロフェッスール ジーネル エ ブラシ  
エ 1 2, ユニベルシテ リブル ド ブリュッセル, インスティテュ ド ビオロジエ エ ド  
メドゥサン モレキュレール

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA07 CA20 DA02 DA06 EA04 GA11 GA25  
HA03  
4B065 AA26X AA58X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA16  
CA24 CA43 CA44  
4C076 AA17 CC03  
4C084 AA02 DC50 MA22 NA14 ZB13  
4C085 AA03 AA38 BB03 DD86 EE06 FF11  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA51 DA86 EA22 FA74  
GA26