

(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.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 9/107
A61K 38/00
A61K 39/00
A61K 39/35

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 9/107
A 61 K 39/00
A 61 K 39/35
A 61 K 39/39

Z N A A
H
A 61 K 39/35
A 61 K 39/39

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 5
4 C 07 6
4 C 08 4
4 C 08 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) 國際出願番号 PCT/EP2002/009122
(87) 國際公開番号 WO2003/016340
(87) 國際公開日 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)

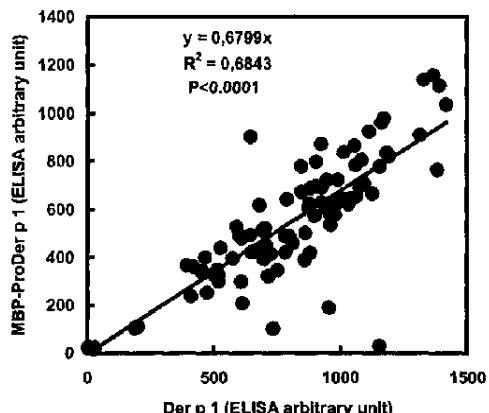
(71) 出願人 397062700
グラクソsmithkline バイオロジカル
ズ ソシエテ アノニム
ベルギー国 リキセンザール ビー 13
30 ルー デ ランスティテュート 8
9
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 苞輔
(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 D E R P 1 および P R O D E R 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、組換えヤケヒヨウヒダニ (*Dermatophagoïdes 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リで提供される。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、ヤケヒヨウヒダニ (*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Fc RI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-α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 (Fc RII) 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】**

即時の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- γ を産生する DerP1特異的 T 細胞の比の低下、または IL-5: IFN- γ 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 Pro 10 DerP1の免疫原性に似ていると考えられる。

【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 (timothy 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. 20. 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関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 *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関するシステイン変異体は分泌されなかった。

【0007】

ハウスダストダニであるヤケヒヨウヒダニ (*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 (Topham 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。

【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、ヤケヒヨウヒダニ (*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。

【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% の相同意を有し、さらに詳しくは、酵素活性領域と、最も顕著には Cys34-His170 イオン対と相同意を有する (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 40 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晩の保存は、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、組換えヤケヒヨウヒダニ（*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产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、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单一の変異を含む。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。プロッキング溶液(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。

【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(pH7.4)、0.01M MgCl₂、0.01Mジチオスレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATPおよび0.1mg/mlウシ血清アルブミン中のT4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼを使用して、4

~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, 103:3185; 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て行われる。

【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を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)。

【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

10

20

30

40

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有り、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。

【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有り、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。

【0026】

この研究では、各ヤケヒヨウヒダニ (*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。

【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产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。

【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

10

20

30

40

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 10 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：

- 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；
- 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；
- 該ベクターで宿主細胞を形質転換する；
- 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
- 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有し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、CaCl₂の溶液（Cohenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 69:2110）を用いて、またはRbCl、MnCl₂、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、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、リポフェクチンにより、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制御要素は、ターミネーターとリーダー配列である。リーダー配列は、典型的には、細胞からのタンパク質の分泌を指令する疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードするため、特に有用である。適当なシグナル配列は、分泌される酵母タンパク質の遺伝子、例えば酵母インベルターゼおよびa-因子遺伝子、酸性ホスファターゼ、キラー毒素、a-接合因子遺伝子によりコードされ、より最近は、クロイベロミセス・マルキシアヌス（*Kluyveromyces marxianus*）のINU1A遺伝子から誘導される異種イヌリナーゼシグナル配列によりコードされることができる。ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）およびサッカロミセスセレビッシェ（*Saccharomyces cerevisiae*）中の発現に適したベクターが開発されている。

20

【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・セレビッシェ（*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・セレビッシェ（*S.*

30

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、発現力セットの複数の組み込みコピーを含有する組換え株は、單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)。

【 0 0 4 0 】

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。

【 0 0 4 1 】

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。

【 0 0 4 2 】

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クロマトグラフィー (モノクローナル抗体アフィニティカラムを含む) がある。

【 0 0 4 3 】

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。

【 0 0 4 4 】

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、ヤケヒヨウヒダニ (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。

【 0 0 4 5 】

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充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)。

【 0 0 4 6 】

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、膣内、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 (microseedling) 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) ウィルス、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、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；陽イオン的または陰イオン的に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-γ、TNF-α、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。

【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。

【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）、カリホルニア州、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。

【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。

【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変更する工程、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）、ニューヨーク

10

20

30

40

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、1～1000μgのタンパク質、好ましくは1～200μgを含むことが予測される。特定のワクチンの最適量は、被験体中の抗体力値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。

20

【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とウェスタンプロット解析

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、セミドライターンスプロットシステム(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、プ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：ガランタス・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ショウセンアサガオ（*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。

【0068】

3. 酵素アッセイ

総量1ml中に1mM 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100μM）の加水分解を、SLM8000分光蛍光計を使用して、ex=380nmとem=460nm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。

【0069】

4. タンパク質測定

総タンパク質濃度は、ビシンコニニック酸（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、2.5μg/mlの濃度であった。

【0071】

6. IgE結合活性

イムノプレートを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100μl/ウェルの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。次に、ヤケヒヨウヒダニ（*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の特異的抗ヤケヒヨウヒダニ（*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。

【0072】

10

20

30

40

50

IgE阻害アッセイのために、プレートを同じ濃度 (0.12 μM) のDerP1またはProDerP1で被覆した。アレルギー患者 (RAST値 > 100 KU/L) からの20のヒト血清のプールを、種々の濃度 (3.6~0.002 μM) のDerP1またはrecProDerP1をインヒビターとして4℃で一晩ブ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ヘ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)) で細胞を破碎後、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5μgの異なるタンパク質または100μg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 (13×19×37.5cm) に入れ、7日間続けてエアゾル化粗ヤケヒヨウヒダニ (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300μg/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0.5ml/分であり、エアゾルの平均粒子サイズは1~5μm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

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 (500ng/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。プレートをTBS-Tweenバッファーで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バッファー中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。

30

【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バッファーと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シン (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OD415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。

40

【0079】

12. DerP1特異的IgEの測定

50

イムノプレートをラット抗マウス 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 150 μl 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シン (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

20

30

40

【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 30 μM -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 × 10⁵ / 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 (25 μg/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 1 μCi / ウェルの [³H] 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、³H-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 と IL-5 のレベルを ELISA アッセイで測定した。プレートを 1 μg/ml の抗マウス IL-5 モノクローナル抗体 (ファーミング (PharMingen)) と抗マウス IFN (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、150 μl 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 (ファーミング (PharMingen)、1 μg/ml) または抗マウス IFN (バイオソース (Biosource)、0.2 μg/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シン (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 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 1 ml 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 400 g で 4 で 10 分遠心分離した。細胞ペレットを 300 μl 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。50 μl アリコートからのサイトスピノ調製物を、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で制限切斷する前に、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' TTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGGACCGTGACTCCCATCCGCATGC3' (フォワード)と 5' CGGATGGAGTCACGGTCCTCATCTGGCGCAGATCAATCTCAGCGGGGCATTGCCGTTGATACTACGGCGTTGGCTCCCGCGTTGAGATCGAAACTGGTC3' (リバース)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AflII-SphI断片を作成する、5' CAAGGCGGCCGTGGTCTTGTGGCCTTTCAAGCGCTGGCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGAGCCTGGACCTCGC3' (フォワード)と 5' TCAGCGAGGTCCAGGCTCTGATTCCGATACCGAGGTATGCCGACTCTGTCGCGGCCACGCCTGAAAAGGCCAACAAAGACCCACGGCCGCCCTGCATG3' (リバース)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-BpuI断片を作成する、5' TGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCTCCAACACGATGTCATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATA3' (フォワード)と 5' CTGGATGTATTGATACTCTGGGAATCGTATCCCCATGACATCCGTGTTGGAGGCACGGTCAACGCGCTCTGC3' (リバース)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AflII-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-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(コンスタンツシステムズ社(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

10

20

30

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11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-XbaI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。

【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。

【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-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。

【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、イムノプレートを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人のヤケヒヨウヒダニ（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の反応性が無くなつた（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つたため、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。

【実施例7】

10

20

30

40

50

【0094】

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

【0095】

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、ヤケヒヨウヒダニ (*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。

【0096】

20

2. ワクチン製剤

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

【0097】

40

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)。

【0098】

50

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

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希釀血清のOD415nm値として表す。PBSまたはヤケヒヨウヒダニ（*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希釀血清のOD415nm値として表す。PBSまたはヤケヒヨウヒダニ（*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】

10

20

30

40

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またはヤケヒヨウヒダニ (*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

【0103】

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またはヤケヒヨウヒダニ(*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。

【0104】

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。

【0105】

表5のこれらの結果は、異なる型のProDerP1が天然のDerP1と共に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。

【0106】

表5:

PBSまたはヤケヒヨウヒダニ(*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またはヤケヒヨウヒダニ(*D. pteronyssinus*)抽出物でin vitroで再刺激した。刺激指数を[³H]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】

10

20

30

40

抗原	刺激抗原の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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

30

40

【 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 [IFN]/[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 [IL-5] と [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。

【 表 6 】

抗原	[IL-5] (pg/ml)			[IFN γ] (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

【 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。

【0110】

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。

【0111】

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 ⁵ /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

【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BglIIで制限切斷し、あらかじめHindIIIとBglIIで切斷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

10

20

30

40

50

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A_{III}-BamHIで制限切斷して、699 bpの断片を単離した。pNIV4846をA_{III}-HpaIで消化して480 bpの断片を単離した。2つの精製DN_A断片を、あらかじめHpaI-BamHIで切斷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】

【0 1 1 4】

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'ACTGAC AGGCCTCGGCCGAGCTCCATTAA3' (太字はStuI切斷部位、フォワード)と 5'CAGTCACCTAGGTCTA GACTC GAGGGAT3' (太字はAvrII切斷部位、リバース)。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で制限切斷した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・セレビッシェ (*S. cerevisiae*) 因子の下流にProDerP1カセットを含有する。

【0 1 1 5】

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A_{III}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、リバース)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、リバース)を使用して、ProDerP1配列に変異N52Qを導入した。

【0 1 1 6】

変異した317bpのA_{III}-SnaBI断片を3工程法により作成した。PCR no 1では、プライマー1と4をpNIV4878と混合して~200bpの断片を產生した。PCR no 2では、プライマー2と3をpNIV4878と混合して~140bpの断片を產生した。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の錫型として使用して~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A_{III}-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・セレビッシェ (*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。

【0 1 1 7】

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。

【0118】

3. 組換え酵母によるProDerP1の產生

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、100mI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。

【0119】

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(pH 9)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DEックス-75カラム(1 × 30cm、ファルマシア(Pharmacia))でゲル濃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。

配列情報

SEQ ID NO:1

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCCTGG
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGGGCTATAAATCACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCT
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCCTCCGCATGCAAGGCGCTGCCGTTGGCCTT
 351 TTCAAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCAACACGGA
 451 TGTCATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCCGTCTAACGCACAGCGCTCGGCATTCCAATTATTGCCAGATCTAC
 601 CCCCCCTAACGCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
 651 CATCGCTGTATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
 701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCAGAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAACAGTTGGACACTAACTGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCAACATCGACCTGATGATGAGTACGGAGTACCCGTACGTGGTG
 901 ATCCTGTAA

10

20

30

40

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 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

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 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTAACAA 40
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG
 101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCC
 251 GTAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGG

301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTTGGGCCTT
 351 TTCAGGCGTGGCCCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCAACACCGA
 451 TGTCATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATAACATCCAGCATAATGG
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCCGTCCCTAACGCACAGCGCTTCGGCAATTCCAATTATTGCCAGATCTAC
 601 CCCCCCTAACGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
 651 CATCGCTGTATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG 10
 701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAACAGTTGGGACACTAACTGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
 901 ATCCTGTAA

SEQ ID NO:5

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe	15	20
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 <u>Arg</u> 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	30
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	40
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:6

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTCAACAA
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG
 101 AAAGCGTAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAATCACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
 201 TTTGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCT
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGGCCGTGGGTCTTGTGGCCTT 10
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACTCGCTATCGGAATCAGA
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCAACACGGA
 451 TGTCAATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACTGACTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTCCAATTATTGCCAGATCTAC
 601 CCCCTTAATGCCAACAAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCACAGCACAGCGC
 651 CATCGCTGTATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
 701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCACAACGGATATCAGCAAACCTACCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT 20
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
 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	
Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala	45	30
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 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 <u>Arg</u> Ala Ser Gln His Gly	150	
Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His	165	40
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 301
 Ile Leu 302

SEQ ID NO:8

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTCAACAA 10
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACTTCCTGG
 101 AAAGCGTGAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCT
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCCTCCGCATGCAAGGGCGCTGGGTCTTGGCCTT
 351 TTCAGGCGTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCCTCCAAACCGGA
 451 TGTCAATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTCGGCATTCCAATTATTGCCAGATCTAC
 601 CCCCCCTAATGCCAACAAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
 651 CATCGCTGTCAATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
 701 ACGGGCGACAATCATCCAGCGCAGAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
 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 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTCAACAA
51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCCTGG
101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC
151 GACCTGTCTTAGACGAGTTCAAGAACCGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTCAACGCGGAGACCAACGCCT
251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGG
301 ACCGTGACTCCCCTCGCATGCAAGGCGGCTGCGGGTCTGTTGGCCTT
351 TTCAGGCCTGGCCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA
401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCAACACGGA
451 CGTCATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGCATTTCAATTATTGCCAGATCTAC
601 CCCCCCTAATGCCAACAAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
651 CATCGCTGTCAATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701 ACGGGCGCACAATCATCCACCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
751 GCGGTCAACATCGTGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT
801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGACAACGGCTACGGTACT
851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGGAGTACCCGTACGTGGTG
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 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 <u>Arg</u> 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

SEQ ID NO:12

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA	
51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCCTGG	
101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGGGCTATAAATCACCTGTCC	
151 GACCTGTCTTGTAGACGAGTTCAAGAACGGTCTCTGATGAGCGCCGAGGC	
201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCT	
251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGGCCAGATGAGG	30
301 ACCGTGACTCCCATTCCGATGCAAGGGCTGCGGGTCTGTTGGCCTT	
351 TTCAGGCGTGGCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA	
401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTCCAACACGGA	
451 TGTCAATGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG	
501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCCCTC	
551 GCGTCCTAACGCACAGCGCTCGGCATTCCAATTATTGCCAGATCTAC	
601 CCCCCCTAACGCAACAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC	
651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG	
701 ACGGGCGCACAAATCATCCAGCGCACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC	
751 GCGGTCAACATCGTGGGTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT	
801 CGTGAGAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT	
851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG	
901 ATCCTGTAA	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 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	
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 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCCTGG	
101 AAAGCGTGAAATACGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC	
151 GACCTGTCTTGTACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC	
201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACGCGGAGACCAACGCCT	
251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG	
301 ACCGTGACTCCCATCCGCATGCAAGGCGCTGCGGGTCTTGTGGCCTT	
351 TTCAGGCGTGGCCCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA	
401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTCCAACACGGA	40
451 TGTCATGGGGATACGATTCCCAGAGGTATCGAATAACATCCAGCATAATGG	
501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATTACCGATACTAGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC	
551 GCCGTCTAACGCACAGCGCTCGGCATTCCAATTAT <u>CGT</u> CAGATCTAC	
601 CCCCCCTAACGCAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC	

651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCACAACGGATATCAGCCAAACTACCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
 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。イムノプレートを500ng/ウェルの精製した未変性のもしくは変性ProDerP1で被覆し、ヤケヒヨウヒダニ(*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、ヤケヒヨウヒダニ(*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。

【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、ヤケヒヨウヒダニ(*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。

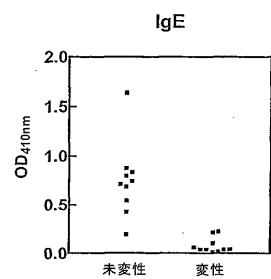
30

【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。

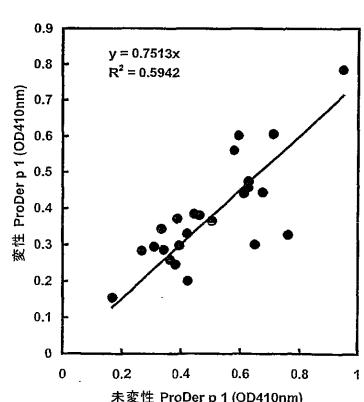
【図5】ハウスダストダニアレルギーの動物モデルの模式図。

【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

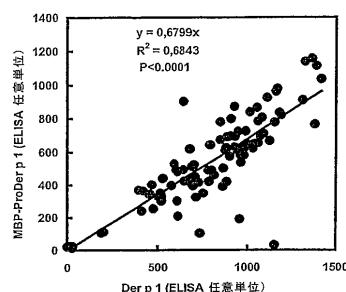


IgG



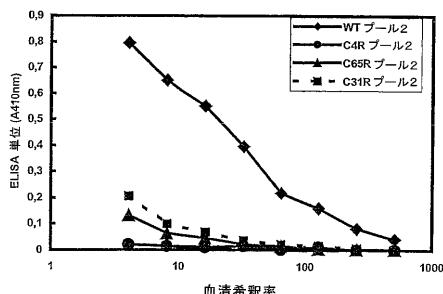
【図2】

図2: MBP-ProDerP1と天然のDerP1のIgE反応性の相関



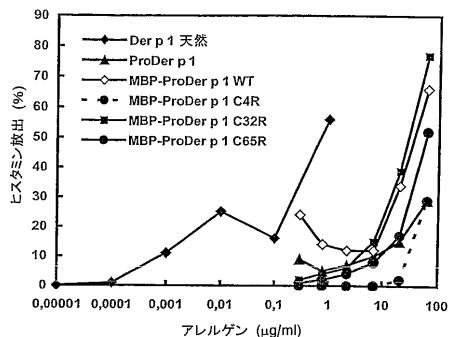
【図3】

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



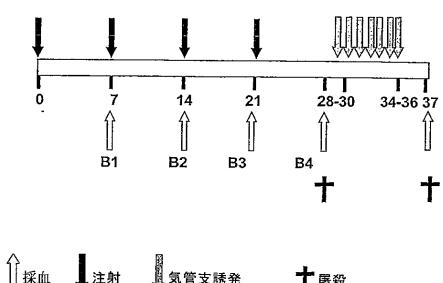
【図4】

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).
MAGL, Mauro [IT/BE]; Rue des Professors Jeener et Brachet 12, B-6041 Gosselies (BE).

(21) International Application Number: PCT/EP02/09122

(74) Agent: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)

(81) Designated States (national): AL, 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, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, 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, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(26) Publication Language: English

(73) Continuation on next page

(30) Priority Data: 01/20150.8 17 August 2001 (17.08.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO-

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOLLEN, Alex

[BE/BE]; Rue des Professors Jeener et Brachet 12, B-6041

Gosselies (BE). JACQUET, Alain [BE/BE]; Rue des

l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(54) Title: DERP1 AND PRODERP1 ALLERGEN DERIVATIVES

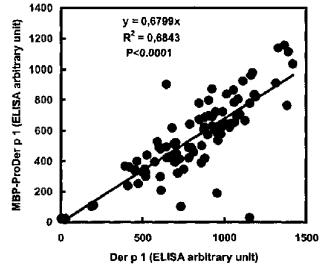
(56) Abstract: The present invention provides a novel treatment for allergy comprising the provision of a recombinant

DerP1/ProDerP1 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.

Correlation between the IgE reactivity of MBP-ProDerP1 and natural DerP1.



WO 03/016340 A1

(57) Abstract: The present invention provides a novel treatment for allergy comprising the provision of a recombinant DerP1/ProDerP1 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

TR), OAPI patent (B1, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NH, 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 Fc ϵ RI 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 neformed 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 (Fc ϵ RII) 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 5 local administration of anti-inflammatory corticosteroids. Other strategies which are under development include those which use the host's 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 (Hoynes *et al.*, J.Exp.Med., 1993, 178, 1783-1788; Holt *et al.*, Lancet, 1994, 344, 456-458).

10 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 15 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 20 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 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, 25 121, 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- γ producing DerP1 specific 30 T-cells, or alternatively a reduction of the IL-5:IFN- γ 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 disulfides 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, 5 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 10 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 autoproteolytic degradation (Machado *et al.*, 1996, Eur.J.Immunol. 26, 2972-2980). The DerP1 encoding cDNA sequence reveals that, like 15 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 20 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 25 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) 30 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-mercaptopropanol or DTT. Still more preferably the protein is treated during 5 minutes at about 100°C in the presence of 50 mM beta-mercaptopropanol. 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 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.

- 20 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 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
- 25 section.

30 “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 5 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 10 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 15 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 wells will be coated with 100 ng of purified wild type or mutated DerP1 overnight at 20 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 25 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 30 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 5 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 MgCl₂, 0.01M dithiothreitol, 1mM spermidine, 1mM ATP and 0.1mg/ml bovine serum albumin, at a temperature of 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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.

15 Although DerP1 is well characterized in terms of its enzymatic activity, 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.

25 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 (MBP) fusion protein. Accordingly there is provided a process for expressing the mutated ProDerP/DerP1 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 ProDerP/DerP1 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 5 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 20 DNA polymer to produce the protein; and
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 25 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 30 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

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.

5 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.

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

15 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.

20 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.

25 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.

30 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 CaCl₂ (Cohen *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) or with a solution comprising a mixture of RbCl, MnCl₂, potassium acetate and glycerol, and then with 3-[N-morpholino]-propane-sulphonic acid, 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 5 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 10 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* 15 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 20 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 25 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 all 1985, Mol.Cell.Biol. 5: 3376-3385).

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

30 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.

10 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.

15 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 20 the codon usage pattern of the polynucleotide sequence is typical of highly expressed mammalian genes, particularly human genes.

25 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 30 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 5 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 10 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. 15 Typically the nucleic acid is administered in an amount in the range of 1pg to 1mg, preferably 1pg to 10 μ g nucleic acid for particle mediated gene delivery and 10 μ g 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 20 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 25 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 30 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 5 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 10 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 15 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 quill A. Cytokines, such as GM-CSF or interleukin-2, -7, or -12, and chemokines may also be used as adjuvants.

20 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- γ , TNF α , 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 25 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 30 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

dimucleotide 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 5 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 10 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 15 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.

20 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 25 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.

30 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 5 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* 10 *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. 15 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 20 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 25 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.

30 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 5 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_{410nm} values.

10 **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 15 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 IgG antibodies, followed by an enzymatic assay. Results are expressed as OD_{410nm} values.

20 **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 25 incubation with mouse anti-human IgE and alkaline phosphatase-labelled anti-mouse IgG antibodies, followed by an enzymatic assay. Results are expressed as OD_{410nm} values.

25 **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.

30 **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 10 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 15 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

20 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 25 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 30 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

methylcoumarin (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC) (Sigma) (both substrates at a final concentration of 100 μ M) was monitored using a SLM 8000 spectrofluorimeter with $\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 460\text{nm}$. 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 μ 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 μ l per well of TBS-Tween buffer (50mM Tris-HCl pH 20 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 80) and saturated for 1 hr at 37°C with 150 μ 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. 25 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). 30 OD_{410nm} was measured in a Biorad Novapath ELISA reader.

For IgE inhibition assays, plates were coated with DerP1 or ProDerP1 at the same concentration (0.12 μ 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 10 detergent IGEPAL CA-630 (Sigma).

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 20 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.

10. - Bronchoprovocation

Within 72h after immunisations, all mice were placed in a Plexiglas chamber (13 x 19 x 25 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.

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_{415nm} 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.₄₁₅ 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_{415nm} was measured in a Biorad Novapath ELISA reader.

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 5 x 10⁵/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 [³H] thymidine (Amersham) for 10 16 hours. Cells were harvested and ³H-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.

15 14. - Cytokines assay

The level of IFN γ 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 IFN γ (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. 20 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 IFN γ (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 25 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 IFN γ .

15. - Bronchoalveolar lavage

30 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 pNIV 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:
5' TTAAGACCCAGTTGATCTCAACGGAGACCAACGCCGTATCAACGGCA
ATGCCCGCGCTGAGATTGATCTGCCAGATGAGGACCGTGACTCCCATCCG
CATGC3' (forward) and 5' CGGATGGGAGTCACGGTCCATCTG
30 GCGCAGATCAATCTCAGGGGGCATTGCCGTTGATACTACGGCGTTGGTC
TCCCGCGTTGAGATCGAAACTGGGTC3' (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'CAAGGC~~GGCC~~**GT**GGGTCTTGGGCC~~TTT~~CAGGCGTGGCCGACAG
 AGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGAGCCTGGACCTCGC3' (forward) and
 5'ICAGCGAAGTCCAGG CTCGAGGTATGCCGACT
 CTGTCGCCGCCACGCCCTGAAAAGGCCAACAGACCCACGGCCGCTTGCAT
 5 G3' (reverse) to generate a 98bp *Sph* I-*Bsp* I fragment for the mutation of cysteine residue
 31 to arginine (C31R), 5'TGAGCAGGAGCTCGTTGACCGTGCCTCC
 CAACACGGATGTCTGGGATACGATCCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGC
 ATA3' (forward) and 5'CTGGATGTATTCGATACTCTGGGAATCGTAT CC
 CCCATGACATCCGTGTTGGAGGCACGGTCAACGCGCTCCTGC3' (reverse) to
 10 generate a 82bp *Apa* 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 ultracentrifuged 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 ultracentrifuged 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 centrifuged 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 $A_{280\text{nm}}$ reached 5 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°C.

10 **EXAMPLE III****Expression of three different ProDerP1 mutants in CHO cells****1. – Site-directed mutagenesis**

15 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 *SphI*-*XbaI* to isolate a 714bp fragment. The purified DNA fragments were inserted into plasmid p4846 previously 20 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.

25 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 μ M methionylsulphoximin (MSX) selection, one round of gene amplification was carried out with 100 μ 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 β -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 reactivity. Our data suggest that denatured ProDerP1 could represent a hypoallergenic variant of ProDerP1.
- 10
- 15

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 DerP1 or MBP-ProDerP1. Figure 2 shows a strong correlation between the IgE binding to DerP1 and MBP-ProDerP1.

20

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 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-

30

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.

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

- 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). 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.

Table 2 : Titers of specific anti-DerP1 antibodies from mice immunized with different antigens. For IgE titers, results are expressed as OD_{415nm} 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

Table 3 : Titers of specific anti-DerP1 antibodies from mice immunized with different antigens. For IgE titers, results are expressed as OD_{415nm} 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
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_{415nm} 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	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.
- 15 These results in Table 5 indicated that the different forms of ProDerP1 shared common T-cell epitopes with natural DerP1. Moreover, destruction 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 [³H]-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 γ in the culture supernatants of restimulated splenocytes was determined in ELISA (Table 6). If we compared the ratio [IFN γ]/[IL-5], we could conclude that vaccinations with natural DerP1 or ProDerP1 adjuvanted with 15 alum induced a better production of IL-5 than IFN γ . The different forms of MBP-ProDerP1 (mutants and wild-type) as well as denatured ProDerP1 induced comparable levels of both cytokines.

Table 6: [IL-5] and [IFN γ] 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 γ] (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.
- 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 ($10^5/ml$)
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 *Hind*III and *Bgl*II, and inserted into plasmid pJW4304 previously cleaved with *Hind*III and *Bgl*II. 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 15 C4R, C31R and C65R were each restricted with *Afl*II-*Bam*HI to isolate a 699bp fragment. pNIV 4868 was digested with *Afl*II-*Hpa*I to isolate a 480bp fragment. The two purified DNA fragments were inserted into plasmid pJW4304 previously cleaved with *Hpa*I-*Bam*HI. 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'ACTGACAGGCCCTGGCCGAGCTCCATTAA3' (*Stu*I restriction site in bold, forward) and 5'CAGTCACCTAGGTCTAGACTC GAGGGGAT3' (*Avr*II 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 *Stu*I-*Avr*II to generate a 918bp fragment

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

which was introduced into the pPIC9K expression vector restricted with *SnaBI*-*AvrII*. The resulting plasmid, pNIV4878, contains the ProDerP1 cassette downstream to the *S.cerevisiae* α 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'GGCTTTCGAACAC**CTTAAG**ACCCAG3' (primer 1, *AflII* restriction site in bold, forward) and 5'GCTCCCTAG**CTACGTA** TCGGTAATAGC3' (primer 2, *SnaBI* restriction site in bold, reverse) were used to amplify a 317bp fragment encoding the ProDerP1 amino acid sequence 71-176.

15 The following primers 5'CCTCGCGTATCGGCAACAGAGCCTGGACC3' (primer 3, mutation N52Q in bold, forward) and 5'GGTCCAGG**CTCTGTTGCC** GATA CGCGAGG3' (primer 4, mutation N52Q in bold, reverse) were used to introduce mutation N52Q in the ProDerP1 sequence.

20 The mutated 317bp *AflII*-*SnaBI* 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 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 *AflII*-*SnaBI* 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* α 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⁺) prototrophy. The screening of His⁺ transformants for geneticin (G418) resistance was performed by 5 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

10 G418 resistant clones were grown at 30°C in BMG medium to an OD_{600nm} of 2-6. Cells were collected by centrifugation and resuspended to an OD_{600nm} 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 15 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 20 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.

25

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

SEQUENCE INFORMATION

SEQ ID NO:1

1 CGGCCGAGCTCCATTAAAGACCTTCGAGGAATCAAGRAAGCCTTCAACAA
 5 51 GAGCTATGCCACCTTCAGGACGAGGAGGCCGCCGAAGAACCTCTGG
 101 AAAGCGTGAAATACCGTGCAGAGCAACGGCGGGCTATAAATCACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTIAQACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGACCGGCCAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTCAACGGGAGACCAACGGCT
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCCCGCTGAGATTGATCTGCCGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCATCCGATTCAGCGCTGGGCTTCGCGGTCTTGTGGGCTT
 351 TTCAAGCCCTGGCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA
 401 GCGCTGGACACTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCCTCCCCAACACGGA
 451 TGTCATGGGGATAACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATAATGG
 501 CGTCTGTCAGGAAAGCTTAACTCCGAAACGCTAGCTAGGGAGCAGTCCCTGCC
 551 GCGGTCTCTAACGACAGCGCTTCGGCATTTCCAATTATGCGAGATCTAC
 601 CCCCTTAATGCCAACAAAGATCAGGGAGGCCCTGGCGACAGCCACAGCGC
 651 CAGCGCTTTCATCATCGGAATCAAGGATCTGAGCCTTCCGCACTATG
 701 ACGGGCGCACAATCATCCAGCGCGACAACGGATATCAGCCAAACTACCCAC
 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGTGAGAAACAGTTGGGACACTTAACCTGGCGGACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
 901 ATCCPTAA

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 Glu 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 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 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 CGGGCCGAGGCTCCATTAAAGACCTTCGAGGAATAACAGAAAGCCCTCAACCAA
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACCCAGGAGGCCGCGCAAGAACATTCTGG
 35 101 AAAGCCTGAAATACTGTCAGAGGCAACGGCGGGCTATAAACCTACCTGTCC
 151 GACCTGTCTTTAGACCCAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCGCCGAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTCAACGGAGACCAACGCC
 251 GTAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

301 ACCGTGACTCCCCATCCGCATGCAAGGGGGCTGCGGGTCTTGTGGGCTT
 351 TTCAAGCGTGGCCCGCACAGAGTCGGCATACCTCGCTATCCGAATCAGA
 401 GCCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCGCTCCCAACCGGA
 451 TGTCACTGGGATACGATTCCCAGGGTATCGAATACATCCAGCATATGG
 5 501 CGTCGTGCAAGGAAAGCTATTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCGGTCTCTAACGCAACAGCGCTTCGCAATTCCAAATTATTGGCCAGATCTAC
 601 CCCCTTAATGCCAAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCACAGCGCACAGCGC
 651 CATCGCTGTCATCATCGGAAATCAAGGATTCGGACGGATTCGGCACTATGG
 701 ACGGGGCACACATCCAGGGCACACACGGATATCAGCACAATACAC
 10 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAAAAGCTGGGACACTAACTGGGGGACAAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGAGTCGAGGAGTACCCCTACGTGGTG
 901 ATCCCTGTAA

15 SEQ ID NO:5

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr 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 Glu 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 Glu 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 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 CGCCGAGCTCCATTAAAGACCTTCGAGGAATACAGAAGAACCTTCAACAA
 5 GAGCTATCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCTGG
 10 AAAGCGTAAATACGUGAGCAACGGCGGGCTATAAAATCACCGTCC
 15 GACCTGCTTATAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGTATGAGCGCCGAGGC
 20 TTCGAAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACCGCGAGACCAACGCCT
 25 GCAGTATCAACGCCATGCCCGCTGAGATGATCTGCCAGATGAGG
 30 ACCGTGACTCCATCGGATGAGCGAGCTGGCTTGGCTTGGCCCTT
 35 TTCAGGGCTGGCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGGTATCGGAATCAGA
 40 GCTTGGACCTGCTGAGCAGGAGCTCGTTGACTGCCCTCCCAAACCGGA
 45 TGTCAATGGGATAACGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATATGG
 50 CGTCGTGAGGAAAAGCTTACCGATACCGTAGCTAGGGAGCAGTCTGCC
 55 GCGGTCCTAACGCAACGGCGCTTCGCAATTATGGCCAGATCTAC
 60 CCCCTTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCGCAGACGCACAGCGC
 65 CATCGCTGTCATCGGAATCAGGATCTGGACGATTCCGGACTATG
 70 ACCGGGGCACAAATCAACGGCGAACACGGATATCAGCCAACACTACAC
 75 GCGGTCACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGACTGGGACTGGAT
 80 CGTGAGRAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCACACGGCTACGGCTACT
 85 TCOCGCAACATCGACCTGATGATGAGTCGAGGAGTACCCGTACGTGGTG
 90 ATCCCTGTAA

SEQ ID NO:7

Arg Pro 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 Glu 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 Glu 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 Glu Met Arg Thr Val Thr Pro Ile	105
30 Arg Met Gln Gly Gly Cys 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 CGGCCGAGCTCCATTAGACCTTCGAGGAATACAGAAAGCCTTCAACAA
 51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCCCTGG
 10 101 AAAGCCTGAAATACCTGCAAGAGCAACCGCGGGCTATAAAATCACCGCTCC
 151 GACCTGTCTTTAGACCGAGTTCAAGAACCGGCTCTGATGAGGCCGAGGC
 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTTGTCTAACCGGGAGACCAACGCCT
 251 GCAGTATCAACGGCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCCATCCGCGATGCAAGGGCGCTGCGGTCTTGTGCGGCTT
 15 351 TTCAGGGGTGGCCCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA
 401 GCTTGGACCTGGCTGAGCAGGAGCTGGTTGACCGCTGGCTCCAAACCGGA
 451 TGTCTATGGGATACCGATTCCGAGGGTATCGAATACATCCAGCATATAAGG
 501 CGTCGTGCAGGAAAGCTATACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
 551 GCCGTCTTAACGGCAACGGCGCTTCGCAATTCCANTTATTCGGAGATCTAC
 20 601 CCCCTTAATGCCAACAGATCAGGGATCTGGACGGCATTCGGCACTATG
 651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGGCATTCGGCACTATG
 701 ACGGGGCACATCATCCAGGGCGACACGGGATATCAGGCCAACTACAC
 751 CGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
 801 CGTGGAAAACAGITGGGACACTAACTGGGGCGACAACGGCTACGGCTACT
 25 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCGTACGTGGTG
 901 ATCCCTGTAAC

SEQ ID NO:9.

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr 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 Glu 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 Glu 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 Pro Ile 105
 Arg Met Gln Gly Gly Cys 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 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATACAAGAAAGCCTTCAACAA
51 GAGCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTCTGG
101 AAAGCGTGAATACCGTCAGAGCAACGGCGGGCTATAATCACCTGTCC
151 GACCTGCTTTAGACGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGACCGCGGAGGCC
201 TTTGAAACACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACCGGGAGACCAACGCCT
20 251 GCACTATAACGCCAATGCCCGCGCTGAGATTGATCTGGCCAGATGAGG
301 ACCGIGACTCCCCATCCGATGCAAGGGCGCTGCGGGTCTTGTGGGCGT
351 TTCAAGGCTGGCGCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGATCTGA
401 GCCCTGGACCTGCTGAGCAGGAGCTGCTGACTGCCCCCTCCAAACCGGA
451 CGTCATGGGGATACTGATTCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATATGG
25 501 CGTCGTGAGGAAAGCTTACCGATACGTAGCTAGGGAGCAGTCCTGCC
551 GCCGTCCTAACGCCAACAGCGCTTCGGCAATTCCAATTATTGCCAGATCTAC
601 CCCCTTAATGCCAACAGATCAAGGGGGGCCCTGGCCCGAGGCCACAGCGC
651 CATCGCTGTCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701 ACGGGGCAAAATCATCCAGGGACAACGGGATATCAGCCAAACTACCCAC
30 751 GCGGTCAACATCGTGGGTTACTCGAACGCCAGGGGTTGACTACTGGAT
801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGGACAACGGCTACGGCTACT
851 TCGCGGCCAACATCGACCTGATGATGAGTCGAGGAGTACCCGATACGIGGTG
901 ATCCGTAA

35 SEQ ID NO:11

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Ala Phe 15
Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Ala Ala Arg Lys 30
Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn 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 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATAAGAAAAGCCCTCAACAA
 51 GACCTATGCCACCTTCGAGGACGAGGAGCCGGGGCAAGAACCTCTGG
 101 AAAGCGTGAATACGTGCAAGGCAACGGGGGCTATATAATCACCCTGTC
 151 GACCTGCTTTAGACCGAGTTCAAGAACCGGTTCTGATGAGCCGAGGC
 201 TTTGAAACCTTAAGACCCAGTTGATCTAACCGGGAGACCAACGCCT
 251 GCAGTATCAACGSCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGCGCCAGATGAGG
 301 ACCGUGACTCCCATCCGCATGCCAGGGCTGGGGCTTGTGGCCCTT
 351 TTCAAGCGTGGCCGACAGAGTCGCCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA
 401 GCTGGACCTCGCTGAGCAGGAGCTGACTGCCCTCCCCAACACCGA
 451 TGTCAATGGGATACGATTCCAGAGGTATCGAAATCATCCAGCATATGG
 501 CGTCGTGCAGGAAGCTTACCGATACGCTAGCTAGGGAGCAGTCCGTC
 551 GCCGTCCTAACGCACAGCGCTTCGGATTCCAATTATGCCAGATCTAC
 601 CCCCTTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCCAGAGGACACAGCG
 651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCAATTCCGGCACTATG
 701 ACGGCGCACAAATCATCGGCGAACACGGATATCAGCCAAACTACCCAC
 751 CGCGTCACATCGGGTTACTCGAACGCCAGGGGTGACTACTGGAT
 801 CGTGAGAACAGTTGGGACACTAACTGGGGGACAACGGCTACGGCTACT
 851 TCGCCGCCAACATCGACCTGATGATCGAGGAGTACCGTACGTGGTG
 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 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 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 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 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 Tyr Pro Tyr Val Val 300
 Ile Leu 302

SEQ ID NO:14

1 CGGCCGAGCTCCATTAAGACCTTCGAGGAATAACAAGAAAGCCTTCAACAA
 51 GAGCTATGCCACCTCGAGGACGAGGAGGCCGCGCAAGAACCTTCCTGG
 101 AAAGCCTGAAAATACGTCAGAGCAACCGCGGGCTATAAAATCACCTGTC
 151 GACCTGTCTTTAGACCGAGTCAAGAACCGTGTCTGATGACGCCGAGAGC
 30 201 TTTCGAACACCTTAAGACCCAGTTGGATCTCAACCGCCGAGACCAACGCC
 251 GCAGTATCAACGCCAATGCCCGCTGAGATTGATCTGGCCAGATGAGG
 301 ACCGTGACTCCCATCCGATGCCAGGGCGCTGCGGGCTTGTGGCCCTT
 351 TTCAGGCGTGGCCCGACAGAGTCGGCATACCTCGCGTATCGGAATCAGA
 401 GCCCTGGACCTCGCTGAGCAGGGCTGTTGACTGCCCTCCCCAACACGGA
 451 TGTCAATGGGATATCAGATTCCCAGAGGTATCGAATACATCCAGCATATA
 501 CGTCGTGAGGAAAGCTATTACCGATACTAGCTAGGGAGGAGCTCTGCC
 551 CCCGCTCTAACGCCAACCGCGCTTCGGATTTCATTATCGTCCAGATCTAC
 601 CCCCTTAATGCCAACAGATCAGGGAGGCCCTGGCCAGACGCCACAGGCC

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

651 CATCGCTGTCATCATCGGAATCAAGGATCTGGACGCATTCCGGCACTATG
701 ACGGGGCGACAATCATCCAGGGCGACAAACGGATATCAGCCAAACTACCCAC
751 GCGGTCACACATCGTGGGTTACTCGAACCCCCAGGGGGTGGACTACTGGAT
801 CGTGAGAAACAGTTGGGACACTAACTGGGGCGACACGGCTACGGCTACT
5 851 TCGCCGCCAAACATCGACCTGATGATGATCGAGGAGTACCCCTACGTGGTG
901 ATCCGTAA

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 significantly reduced allergenic activity compared to that the wild-type allergen.
- 5 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

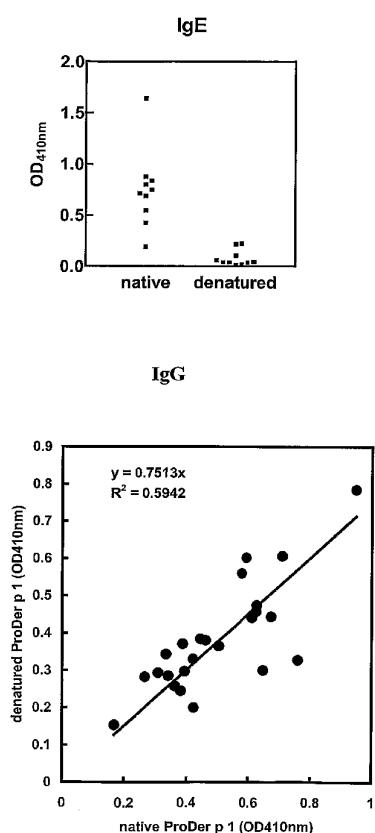
PCT/EP02/09122

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

1/3

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



2/3

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

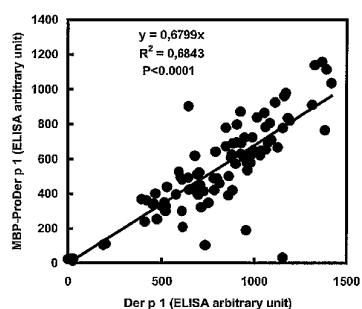
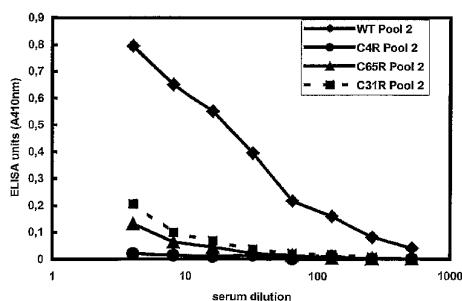
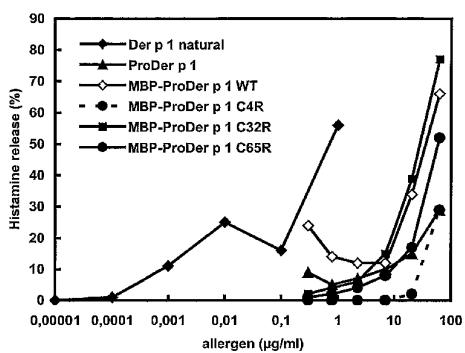
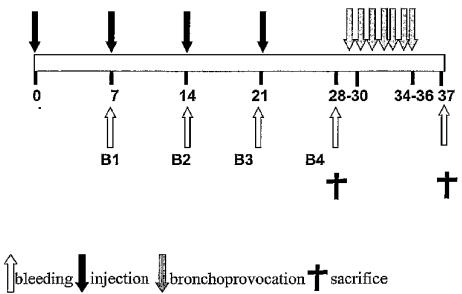


FIG. 3: IgE-binding reactivities of MBP-ProDerP1 mutants, carrying the mutations C4R, C31R and C65R.



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

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

<120> Novel Compounds

<130> B45282

<160> 26

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 909

<212> DNA

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(906)

<400> 1

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 Ala Phe Asn
1 5 10 15aag agc tat gcc acc ttc gag gag gag gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30ctg 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 45ctg 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 60gcc 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 80acc 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 95cgc 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 110tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcg aca gag tct gca tac ctc 384
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125gcg 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 140tgc 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
1

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 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 stg ggt				768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly				
245	250	255		
tac tgg aac 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 stg gtc atc ctg				906
Asp Ile Met Met Ile Glu 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 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		
2				

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> PRF
 <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 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 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 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 Iys Asn Arg Phe Leu Met Ser			
50	55	60	
gcc gag gct ttc gaa cac 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 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 tcc gca tac ctc	384		
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu			
115	120	125	
gct 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 gtc cag gaa aco 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 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 ggc 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 ggc gtc aac atc gtc ggt 768
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 245 250 255
 tac tcc aac gcc cag ggg gtc gac tac tgg atc gtc aca aac aat tgg 816
 Tyr Ser Asn Asn 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
 gac ctg atg atc gag gag tac cgg tac gtc gtc 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 ProDerPI
 <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 Glu 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 Glu His Asn Gly Val Val 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 Glu
 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 ProDerP1

<400> 6

ccg 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 Ala Phe Asn	
1 5 10 15	

aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag ggc ggc 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 gag agc aac ggc ggg gct ata aat cac	144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Glu Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His	
35 40 45	

ctg tcc gag ctg tct tta gac gag ttc aag aac cgg ttc ctg atg agc	192
Leu Ser Asp Leu Ser Ile 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	

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

cgc cag atg agg acc gtc act 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 tgg tgg gcc ttt tca ggc gtc ggc ggc 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
 gcg tat cgg aat cag agc ctg gac ctc gct gag cag gtc 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 ggc tgg 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 gtc 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 ggc atc gtc atc atc gga atc 672
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val 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 ggc gtc aac atc gtc 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 gtc gac tac tgg atc gtc aga aac aat 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 ggc ggc 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 atc gag ggg tac cog tac gtc gtc gtc atc ctg 906
 Asp Ile 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 ProDerPi

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

<400> 7
 Arg Pro Ser Sex 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 Glu His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 165 170 175
 Val Ala Arg 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 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 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
 (1) (2-2)

<223> C65R mutant of ProPep1

```

<400> 8
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 gac gcc gcg cgc aag aac ttc 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp 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

```

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 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 ggc aca gag tcc gca bac 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
 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 ggc gtc gtg cag gaa agc tat tac cga tac 528
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 165 170 175
 gta gct agg gag cag tcc tgc cgc cgt cct aat gca cag cgc ttc ggc 576
 Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys 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 ggg 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 aat 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

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 Glu 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>

10

WO 03/016349

PCT/EP02/09122

```

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

<223> C71R mutant of ProDerP1

<400> 10
cgg cgg acc tcc att aag acc ttc gg gaa tac aag aaa gcc ttc aac
Alg 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 gg gac gg gg gcc cgc aac atc
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
 20           25                           30           35

ctg gaa agg gtg aaa tac gtg cag aac acc ggg ggg gtt ata aat cac
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
 35           40                           45           50

ctg tcc gac ctg tct tta gac gag gtt aag aac cgg ttc ctg atg agc
Leu Ser Asp Leu Ser Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Ile Met Ser
 50           55                           60           65

gcc ggg gct ttc gaa cac ctt aag acc cag ttt gat ctc aac gcc gag
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
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 85           90                           95           100

cgc cag atg agg acc gtg act ccc atc cgc atg caa ggc ggc tgc ggg
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 100          105                          110          115

tct tgt ttg gcc ttt tca ggc gtg gcc gcc aca gag tcg gca tac ctc
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 115          120                          125          130

gcg tat ccg aat cag agc ctg gac ctc gct gat gcg agg ctc gtt gac
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Glu Leu Val Asp
 130          135                          140          145

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

gaa tac atc cag cat aat ggc gtc gtg cag agc tat tac cga tac
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gln Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 165          170                          175          180

gta gtc agg gag cag tcc tgc cgt cct aac acc gca cgc gcc ttc ggc
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
 180          185                          190          195

att tcc aat tat tgc cag atc ccc cct aat gcc aac aag atc agg
Ile Ser Asn Tyr Cys Glu Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
 195          200                          205          210

gag gcc ctg gcg cag agc cac agc gcc atc gct gtc atc agg atc
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 210          215                          220          225

```

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 sac 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 ttg ggc gac aac ggc tac ggc ttc gcc gcc aac atc 864
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 275 280

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

<220>
<223> C103R mutant of ProDerPi

<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 Ala Ala Arg Lys Asn Phe
 20 25 30
 Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Glu 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 Glu 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
 12

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 ProDerPI			
<400> 12			
cgg ccg agc tcc att aag acc ttc gag gaa tac aag aac gcc ttc aac	48		
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Ala Phe Asn			
5	10	15	
aag agc tat gcc acc ttc gag gac gag gag gcc gcg ccc aac 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 ggc 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	
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		
	13		

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 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 tcc aac gcc cag ggg gtg gac tac tgg atc gtg aga aac aat 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 ProDerP1
 <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 Glu 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 Glu 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	Hic	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					240
Arg	Asp	Asn	Gly	Tyx	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ile	Ala	Val	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	Tyx	Gly	Tyr	Phe	Ala	Ala	Asn	Ile
							275			280					285
Asp	Leu	Met	Met	Ile	Glu	Glu	Tyx	Pro	Tyr	Val	Val	Ile			
							290			295					300

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

100	105	110	
tct tgt tgg gcc ttt tca ggc gtc gcc gcg aca gag tac gtc 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 ctc 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 aca 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 gtc cag gaa agc tac cga tac			528
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val 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 ggc cag acg cac agc gcc atc 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 ggc gtc aac atc gtc ggt			768
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly			
245 250 255			
tac tcc aac gcc cag ggg gtc gac tac tgg atc gtc aga aac aat 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 atc gag gag tac cgg tac gtc gtc 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			
ttaaagaccca gtttgatctc aacgccccg acaacgccccg tatcaacggc aatgcccccg 60			

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

```

ctgagattga tctgcgccag atgaggacg tgactcccat ccgcacgc          108
<210> 16
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 16
cggatggag tcacggctct catctggcgc agatcaatct cagcgggggc attgccgttg 60
atactacggg cggtggctc cgcgttggaga tcgaaactgg gtc          103

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

<220>
<223> Primer

<400> 17
caagcgcgcc gtgggtcttg ttgggccttt tcaggcgtgg ccgcgcacaga gtcggcatac 60
ctcgcgtatc ggaatcagag cctggaccc tc          92

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

<220>
<223> Primer

<400> 18
tcagcgaggc ccaggctctg attccgatac gcgaggatag cggactctgt cgccggccacg 60
cctgaaaagg cccaaacaaga cccacggccg ccttgcatg          99

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

<220>
<223> Primer

<400> 19
tgagcaggag ctgcgttggacc gtgcctccca acacggatgt catggggata cgattccag 60
aggtatcgaatcatacatccagc ata          83

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

<220>
<223> Primer

<400> 20
ctggatgtat tcgataacctc tggaaatcg atccccatg acatccgtgt tggaggcac 60
ggtaaaccgcg ctctgc          77

```

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 21
actgacaggc ctccggccgag ctccattaa 29

<210> 22
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 22
cagtccaccta ggtcttagact 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
gtcccttagc tacgtatccg taatagc 27

<210> 25
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 25
cctcgcgtat cggcaacaga gcctggacc 29

<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

WO 03/016340

PCT/EP02/09122

<400> 26
ggccaggct ctgttgcgta tacgcgagg

29

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		
International Application No PCT/EP 02/09122		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K147/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ⁵	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); McDERMOTT 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 citation or other special reason (as specified) *C* 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		
Date of the actual completion of the international search 18 December 2002		Date of mailing of the international search report 27/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2290 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 (second sheet) (July 1992)

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)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/EP 02/09122	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<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>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<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>Remark on Protest</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>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

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 EP 1032669 A2 JP 2001523452 T	27-05-1999 27-05-1999 06-09-2000 27-11-2001
WO 0129078	A	26-04-2001	AU 7878900 A WO 0129078 A2	30-04-2001 26-04-2001
US 5670356	A	23-09-1997	NONE	
WO 9603870	A	15-02-1996	AT 199476 T AU 687212 B2 AU 2749095 A CA 2195978 A1 DE 69620275 D1 DE 69620275 T2 DK 773717 T3 EP 1043032 A2 EP 0773717 A1 ES 2156942 T3 WO 9603870 A1 PT 773717 T	15-03-2001 19-02-1998 04-03-1996 15-02-1996 12-04-2001 31-10-2001 02-07-2001 11-10-2000 21-05-1997 01-08-2001 15-02-1996 30-08-2001

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 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,N0,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 ビオロジー 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 ビオロジー 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 ビオロジー 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