



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년10월06일
 (11) 등록번호 10-0919914
 (24) 등록일자 2009년09월24일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7006644

(22) 출원일자 2001년11월16일

심사청구일자 2006년09월29일

(85) 번역문제출일자 2003년05월15일

(65) 공개번호 10-2003-0076577

(43) 공개일자 2003년09월26일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2001/000764

(87) 국제공개번호 WO 2002/40676

국제공개일자 2002년05월23일

(30) 우선권주장

PA200001718 2000년11월16일 덴마크(DK)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

W0199730150 A1

전체 청구항 수 : 총 53 항

심사관 : 권오희

(54) 신규한 돌연변이체 알레르겐

(57) 요약

본 발명은 다중 돌연변이 및 감소된 IgE 결합 친화성을 갖는 신규한 재조합 알레르겐을 공개한다. 본 알레르겐은 자연발생적 알레르겐의 비자연발생적 돌연변이체이다. 전체적인 α-탄소 골격의 3차 구조는 본질적으로 보존된다. 또한 상기 재조합 알레르겐을 제조하는 방법 및 그들의 용도에 대하여 공개한다.

대표도 - 도1

돌연변이체 1에 사용된 돌연변이체-특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

밑줄은 돌연변이된 뉴클레오타이드이다.

Bet v 1 센스	5'- AATTATGAGACTGAGACCCTCTGTTATCCAGCAGCTCG -3'
Bet v 1 역-센스	3'- TTAATACTCTGACTCTGGTGGAGACAATAGGGTCGTCGAGC -5'
센스 프라이머	5'- TGAGACC <u>CC</u> CTCTGTTATCCAG -3'
역-센스 프라이머	3'- ATACTCTGACTCTGGGGGAGACA -5'

(72) 발명자

네데르가라르센, 조르겐

덴마크, 디케이-3230그래스테드, 니베즈11

스판포르트, 미첼도

스웨덴, 에스이-26040비켄, 되술츠배겐483

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 필리핀, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 오만, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 잠비아, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아, 잠비아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터어키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

(30) 우선권주장

60/249,361 2000년11월16일 미국(US)

60/298,170 2001년06월14일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

집 먼지 진드기 유래의 자연발생적 흡입 알레르겐의 돌연변이체인 재조합 알레르겐으로, 상기 돌연변이체 알레르겐은 상기 자연발생적 흡입 알레르겐의 IgE 결합 능력과 비교하여 돌연변이된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 돌연변이들을 포함하고, 여기서, 각 돌연변이는 하나의 표면-노출된 아미노산 잔기를 다른 잔기로 치환한 것으로, 이는 상기 자연발생적 흡입 알레르겐이 기원하는 분류학적인 종 내의 어떠한 알려진 상동성 단백질의 아미노산 서열의 동일한 위치에서도 발생하지 않고, 상기 돌연변이체는 서로 15Å 이상의 간격으로 떨어진 4개 이상의 돌연변이들을 포함하고, 그리고 800\AA^2 의 면적을 갖는 하나 이상의 원형 표면 영역은 돌연변이를 포함하지 않는 방식으로 상기 돌연변이들이 배열되는 것인 재조합 알레르겐.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이들은 20Å, 바람직하기는 25Å 그리고 가장 바람직하기는 30Å의 간격으로 떨어져 있는 것인 재조합 알레르겐.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 각각이 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐의 결합 능력과 비교하여 돌연변이된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 다수의 추가 돌연변이들을 포함하고, 여기서 각각의 추가 돌연변이는 하나의 표면-노출된 아미노산 잔기를 다른 잔기로 치환한 것으로, 이는 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐이 기원하는 분류학적인 종 내의 어떠한 알려진 상동성 단백질의 아미노산 서열의 동일한 위치에서도 발생하지 않고, 상기 추가 돌연변이들은 상기 원형 표면 영역 외부에 배열되는 것인 재조합 알레르겐.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐에서 치환되는 표면-노출된 아미노산들 중 하나 이상은 20%보다 큰 용매 접근성을 갖는 재조합 알레르겐.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐에서 치환되는 표면-노출된 아미노산들 중 하나 이상은 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 알려진 상동성 단백질에서 70%를 넘는 동일성을 가지고 보존되는 재조합 알레르겐.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 자연발생적 흡입 알레르겐과 본질적으로 동일한 α-탄소 골격의 삼차 구조를 갖는 재조합 알레르겐.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 돌연변이체 알레르겐으로 병합되는 각각의 아미노산 잔기는 상기 자연발생적 흡입 알레르겐이 기원하는 분류학적인 종 내의 어떠한 알려진 상동성 단백질의 아미노산 서열의 같은 위치에서도 발생하지 않는 것인 재조합 알레르겐.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 돌연변이된 알레르겐에 대한 특이적 IgE 결합은 5% 이상 감소되는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 돌연변이체와 상기 자연발생적 흡입 알레르겐 분자의 α-탄소 골격의 삼차 구조를 비교할 때, 원자 좌표의 평균적 제곱근평균제곱 편차는 2Å 미만인 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 10

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 원형 표면 영역은 15-25개의 아미노산 잔기들의 원자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 11

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 표면-노출된 아미노산 잔기들은 용매 접근성에 대해서 평가되고, 더 큰 용매 접근성을 갖는 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 12

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 표면-노출된 아미노산 잔기들은 상기 자연발생적 흡입 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 알려진 상동성 단백질들에서 보존 정도에 대하여 평가되고, 더 높은 보존 정도를 갖는 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 13

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 돌연변이체 알레르겐은 비-자연발생적 흡입 알레르겐인 재조합 알레르겐.

청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 5 내지 20개의 돌연변이를 포함하는 재조합 알레르겐.

청구항 15

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 돌연변이체 알레르겐은 서로 15Å 이상의 간격으로 떨어져 있는, 돌연변이 당 1개 내지 4개의 추가 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 16

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 치환 중 하나 이상은 부위-특이적 돌연변이유발에 의하여 행하여지는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 17

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 치환 중 하나 이상은 DNA 서플링에 의하여 행하여지는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 재조합 알레르겐은 *Dermatophagoides*에서 기원한 진드기 알레르겐의 돌연변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 27

제 26항에 있어서, 재조합 알레르겐은 Der p 1 또는 Der p 2의 돌연변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 28

제 27항에 있어서, 재조합 알레르겐은 Der p 2의 돌연변이체이고, 그리고

R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, D-114, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15 및 K-6로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 29

제 28항에 있어서, 재조합 알레르겐은 다음의 돌연변이체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐:

돌연변이체 1: K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N;

돌연변이체 2: K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, R128Q;

돌연변이체 3: K15E, S24N, H30G, K48A, K77N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 4: K15E, S24N, H30G, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 5: K15E, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 6: S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 7: K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N;

돌연변이체 8: K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, R128Q;

돌연변이체 9: K15E, S24N, R31S, K48A, H74N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 10: K15E, S24N, R31S, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 11: K15E, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q;

돌연변이체 12: S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q; 및

돌연변이체 13: K6A, K15E, H30N, E62S, H74N, K82N.

청구항 30

제 27항에 있어서, 재조합 알레르겐은 E13, P24, R20, Y50, S67, R78, R99, Q109, R128, R156, R161, P167 및 W192로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐.

청구항 31

제 30항에 있어서, 재조합 알레르겐은 다음의 돌연변이체로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 알레르겐:

- 돌연변이체 1: P24T, Y50V, R78E, R99Q, R156Q, R161E, P167T;
- 돌연변이체 2: P24T, Y50V, R78Q, R99E, R156E, R161Q, P167T;
- 돌연변이체 3: R20E, Y50V, R78Q, R99Q, R156E, R161E, P167T;
- 돌연변이체 4: R20Q, Y50V, R78E, R99E, R156Q, R161Q, P167T;
- 돌연변이체 5: P24T, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161Q, P167T;
- 돌연변이체 6: R20E, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161E, P167T;
- 돌연변이체 7: R20Q, Y50V, S67N, R99Q, R156E, R161E, P167T;
- 돌연변이체 8: E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E, P167T;
- 돌연변이체 9: E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q, P167T;
- 돌연변이체 10: E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E, P167T, W192F; 및
- 돌연변이체 11: E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q, P167T, W192F.

청구항 32

제 27항 내지 제 31항 중 어느 하나의 항에 따른 재조합 알레르겐을 코딩하는 DNA 서열.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 재조합 알레르겐.

청구항 36

알레르기의 예방 또는 치료를 위한, 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐을 포함하는 약제.

청구항 37

제 1항 또는 제 2항에 따른 2 이상의 재조합 돌연변이체 알레르겐 변이체들을 포함하는 조성물로, 각각의 변이체는 하나 이상의 나머지 변이체들에는 부재인 돌연변이를 하나 이상 갖는 것으로 정의되고, 각각의 변이체의 경우 각각의 부재인 돌연변이로부터 반경 15Å 내에는 추가 돌연변이가 존재하지 않는 것인 조성물.

청구항 38

제 37항에 있어서, 2개 내지 12개의 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 39

제 37항에 있어서, 알레르기의 예방 또는 치료를 위한 약제로서 사용하기 위한 조성물.

청구항 40

알레르기의 예방 또는 치료를 위한 제 37항에 따른 조성물을 포함하는 약제.

청구항 41

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐, 또는 제 37항에 따른 조성물과, 임의 성분인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 보조제, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 42

제 41항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 알레르기 환자에게서 자연발생적인 흡입 알레르겐에 의해 유발된 알레르기 반응에 대한 백신의 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 43

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐을 포함하는, 개체에서 면역 반응을 일으키기 위한 약제.

청구항 44

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐을 포함하는, 개체의 백신화용 또는 치료용 약제.

청구항 45

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐, 또는 제 37항에 따른 조성물과 약제학적으로 허용가능한 물질, 부형제, 또는 이들의 혼합물을 혼합하는 단계를 포함하는 제 41항에 따른 약제학적 조성물의 제조방법.

청구항 46

제 45항에 따른 방법에 의하여 얻을 수 있는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 47

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐을 포함하는, 개체의 알레르기 반응을 치료, 예방 또는 경감하기 위한 약제.

청구항 48

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐의 제조방법으로,

- a) 자연발생적 흡입 알레르겐에서, 20% 이상의 용매 접근성을 갖는 다수의 아미노산 잔기를 동정하고;
- b) 각각의 선택된 아미노산이 각각의 다른 선택된 아미노산으로부터 15Å 이상의 간격으로 떨어지고, 그리고 상기 선택된 아미노산이 800Å²의 면적을 갖는 하나 이상의 원형 표면 영역이 선택된 아미노산을 포함하지 않도록 배열되는 식으로 상기 동정된 아미노산 잔기 중 4개 이상을 선택하고; 그리고
- c) 상기 선택된 아미노산 각각에 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐의 결합 능력과 비교하여 돌연변이된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 돌연변이를 일으키고, 여기에서 각각의 돌연변이는 선택된 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환한 것으로, 이 치환이 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐이 기원한 분류학적인 종 내에서 어떠한 알려진 상동성 단백질의 아미노산 서열에서도 같은 위치에서는 발생하지 않는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 49

제 48항에 있어서, 상기 동정된 아미노산 잔기들을 용매 접근성에 대해서 평가하고, 더 큰 용매 접근성을 갖는 아미노산 중 하나 이상의 아미노산을 치환하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제 48항에 있어서, 상기 자연발생적 흡입 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 알려진 상동성 단백질에서 70%보다 높은 동일성으로 보존되는, 동정된 아미노산 잔기들을 선택하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제 50항에 있어서, 상기 동정된 아미노산 잔기들을 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 알려진 상동성 단백질에서 보존성 정도에 따라 평가하고, 더 높은 보존성을 갖는 아미노산들 중의 하나 이상의 아미노산을 치환하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제 48항에 있어서, 상기 자연발생적인 흡입 알레르겐과 본질적으로 동일한 α -탄소 골격의 3차 구조를 갖는 돌연변이체 알레르겐을 형성하기 위하여 동정된 아미노산들을 선택하는 것을 포함하는 방법.

청구항 53

제 48항에 있어서, 상기 아미노산 잔기들의 치환은 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐의 제조방법으로, 상기 알레르겐은 상응하는 자연발생적인 흡입 알레르겐을 코드화하는 DNA의 DNA 서플링(분자 육종)에 의하여 얻어진 DNA 서열로부터 생산되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐을 코드화하는 DNA 서열.

청구항 56

삭제

청구항 57

제 55항에 있어서, 서열번호 SEQ ID No: 3의 유도체 또는 SEQ ID No: 1의 유도체인 DNA 서열.

청구항 58

제 55항에 있어서, 서열번호 SEQ ID No: 4의 유도체인 DNA 서열.

청구항 59

삭제

청구항 60

제 55항에 있어서, 상기 서열은 도 16에 도시된 서열의 유도체이고, 상기 DNA 서열은

R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109 and R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109 및 K-15

으로 이루어진 군으로부터 선택된 4개 이상의 돌연변이를 갖는 알레르겐을 코드화하도록 돌연변이된 것인 DNA 서열.

청구항 61

제 55항에 따른 DNA를 포함하는 발현 벡터.

청구항 62

제 61항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 63

제 62항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 재조합 돌연변이체 알레르겐의 제조방법.

청구항 64

자연발생적인 흡입 알레르겐에 특이적인 T 세포 클론 또는 T 세포계를 자극할 수 있는 하나 이상의 T 세포 에피토프를 포함하는, 제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 알레르겐 또는 제 55항에 따른 DNA 서열에 의하여 코드화된 재조합 알레르겐.

청구항 65

제 1항 또는 제 2항에 따른 재조합 돌연변이체 알레르겐, 또는 제 37항에 따른 조성물을 사용하여 개체의 치료의 타당성, 안정성 또는 결과를 평가하기 위한 진단적 검사법으로, 개체의 IgE 함유 샘플을 상기 돌연변이체 또는 상기 조성물과 혼합하고, 상기 샘플 중의 IgE와 상기 돌연변이체 사이의 반응 수준을 평가하는 것으로 이루어지는 진단적 검사법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 자연발생적 알레르겐의 돌연변이체인 신규한 재조합 알레르겐에 관한 것이다. 또한 본 발명은 신규한 재조합 돌연변이체 알레르겐들의 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 백신을 포함한 재조합 돌연변이체 알레르겐을 포함하는 약학적 조성물 뿐만 아니라 그러한 재조합 돌연변이체 알레르겐을 제조하는 방법에 관한 것이다. 추가적 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 의한 조성물을 제조하는 공정, 뿐만 아니라 개체에 대하여 면역 반응을 일으키는 방법, 백신화 방법, 또는 개체에 대한 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 유전적 소인을 가진 사람들은 각종 환경적 원인으로부터 유래하는 항원에 대하여, 개인들이 노출되는 알레르겐에 대하여 민감하게 감작한다(알레르기 반응을 일으킨다). 알레르기 반응은 이미 감작된(sensitised) 개인이 같거나 또는 상동성 알레르겐에 재노출될 때 일어난다. 알레르기 반응의 범위는 예를 들어 꽃벌 또는 말벌 등의 썩 또는 벌레물림에 대한 반응으로, 고초열(hay fever), 비도관염(rhinoconductivitis), 비염, 및 천식으로부터 진신과민증 및 사망에까지 이른다. 반응은 즉각적이며, 울혈, 나무, 잡초, 벌레, 음식, 약물, 화학약품, 및 향수로부터 유래하는 화합물과 같은 각종 아토피성 알레르겐에 의하여 야기된다.

<3> 그러나, 그 반응은 개인이 처음으로 알레르겐에 노출되었을 때는 일어나지 않는다. 초기 적응 반응은 시간이 걸리며, 통상적으로 아무런 증상을 일으키지 않는다. 하지만 알레르겐과 반응할 수 있는 항체 및 T 세포가 생산되었을 때, 그 후의 어떤 노출에 대해서도 증상을 일으킬 수 있다. 따라서 알레르기 반응은 면역 반응 그 자체가 생명을 위협할 수 있는 심각한 병적 상태를 일으킬 수 있다는 것을 보여준다.

<4> 아토피성 알레르겐에 관여하는 항체는 원래 IgE 종의 면역 글로블린에 속한다. IgE는 마스트 세포(mast cell) 및 호염기성구(basophils)의 표면에 있는 특이적 수용체에 결합한다. 마스트 세포에 결합한 IgE와 특이적 알레르겐의 복합체 형성에 이어서, 세포 표면 상에서의 수용체 교차결합(cross-linking)은 수용체를 통한 신호전달 및 대상 세포의 생리적 반응을 생성한다. 탈과립(degranulation)은 히스타민, 헤파린, 호산성 백혈구(eosinophilic leukocyte)를 위한 주화성 인자, 류코트리엔(leucotriene) C4, D4, 및 E4 등이 방출되게 하며, 이는 기관지 평활근 세포의 연장된 수축을 일으킨다. 결과적 효과는 사실상 진신성 또는 국소성일 수 있다.

<5> 항체-매개 과민감성 반응(antibody-mediated hypersensitivity reaction)은 4가지 유형, 즉 I형, II형, III형 및 IV형으로 나눌 수 있다. I형 알레르기 반응은 항원 노출 후 수초 내지 수분 내에 일어나는 고전적인 즉각적 과민감성 반응이다. 이들 증상은 알레르겐 특이적 IgE에 의하여 매개된다.

<6> 통상적으로 알레르기 반응은 꽃가루, 집 먼지 진드기, 동물의 털 및 비듬, 독, 및 식품 등에 존재하는 단백질

알레르겐에 대한 반응으로 관찰된다.

- <7> 알레르기 반응을 감소 또는 제거하기 위해서, 잘 조절되고 반복된 알레르기 백신의 투여가 통상 사용된다. 알레르기 백신화는 전통적으로 적당히 오랜 기간 동안 투여량을 늘리면서 비경구적, 비강내(intranasal), 또는 설하(sublingual) 투여에 의하여 행하여져서, 개체의 탈감작(desensitisation)을 생성한다. 정확한 면역학적 기작은 알려지지 않았으나, 알레르겐 특이적 T 세포 표현형에서의 유도된 차이가 특히 중요하다고 생각된다.
- <8> 알레르기 백신화
- <9> 백신화(vaccination)의 개념은 면역계의 2가지 기본적 특징, 즉 특이성 (specificity) 및 기억화(memory)에 기초한다. 백신화가 수용자의 면역 시스템을 준비시켜서, 비슷한 단백질에 반복적으로 노출될때 면역 시스템은 미생물 감염 등의 도전에 더욱 격렬하게 반응할 수 있을 것이다. 백신은 수용자에서 이러한 방어적 면역 반응을 일으키기 위한 목적으로 백신화에 사용되도록 의도된 단백질들의 혼합물이다. 방어는 백신 및 상동적 항원에 존재하는 성분들만을 포함할 것이다.
- <10> 다른 형태의 백신화와 비교하여, 알레르기 백신화는 알레르기 환자에게 진행중인 면역 반응이 존재하므로 복잡하다. 이 면역 반응은 알레르겐에 노출된 후, 알레르기 증상의 발현을 매개하는 알레르겐 특이적 IgE의 존재를 특징으로 한다. 따라서, 천연의 알레르겐을 사용하는 알레르기 백신화는 궁극적으로 환자의 생명을 위협하는 부작용이라는 내재적 위험을 가진다.
- <11> 이 문제를 피하기 위한 접근은 세가지 카테고리로 나눌 수 있다. 실제로 1 이상의 카테고리로부터 나온 수단들이 종종 결합된다. 첫번째 카테고리의 수단은 실질적 축적량에 이르게 하기 위한, 장기간 동안 소량을 수회 투여하는 것을 포함한다. 두번째 카테고리의 수단은 수산화알루미늄과 같은 겔 물질 속으로의 알레르겐의 병합에 의한 알레르겐의 물리적 변형을 포함한다. 수산화알루미늄 제제는 보조제 효과, 및 활성적 알레르겐 성분의 조직내 농축을 감소하는 느린 알레르겐 방출의 축적질(depot) 효과를 가진다. 세번째 카테고리의 수단은 예를 들면, IgE 결합과 같은, 알레르기유발(allergenicity)을 감소시키기 위한 알레르겐의 화학적 변형을 포함한다.
- <12> 성공적인 알레르기 백신화 이면의 구체적 기작은 아직 논쟁 중이다. 그러나, T 세포가 면역 반응의 전체적 조절에 중요한 역할을 한다는 것에는 의견이 일치한다. 최근의 의견 일치에 의하면, 두가지 극단적인 T 세포 표현형, Th1과 Th2 간의 관계가 개인의 알레르기 상태를 결정한다. 알레르겐에 의하여 자극된 후, Th1 세포는 인터페론- γ 에 의하여 우세화된(dominated) 인터로킨을 방출하여 방어적 면역작용을 유도하며, 이때 개체는 건강하다. 반면에 Th2 세포는 IgE 합성 및 호산성구를 유도하는 인터로킨 4 및 5를 우세하게 분비하며, 이때 개체는 알레르기를 일으킨다. 생체외(in vitro) 연구는, 관련된 T 세포 에피토프들을 포함한 알레르겐 유래 펩티드의 공격에 의하여, 알레르겐 특이적 T 세포의 반응이 변화할 가능성을 보여준다. 그러므로, 새로운 알레르기 백신에 대한 최근의 연구는 크게는 T 세포의 어드레싱(addressing)에 기초를 두고 있으며, 이는 T 세포를 침묵화하거나(아내르기 유도), 또는 Th2 표현형으로부터 Th1 표현형으로 반응을 변화시키는 것을 목적으로 한다.
- <13> 항체 결합 에피토프 (B 세포 에피토프)
- <14> F_{ab}-항원 복합체에 대한 X선 결정학적(crystallography) 분석은 항체-결합 에피토프(antibody binding epitopes)에 대한 이해를 증가시킨다. 이런 형태의 분석에 의하면, 항체 결합 에피토프는 15-25개의 아미노산 잔기로부터의 원자들을 포함하는 항원 표면의 일부로 정의되며, 이는 항체의 원자로부터 직접적 상호작용을 가능하게 하는 거리 내에 있다. 항원-항체 상호작용의 친화성은 반데르발스 결합, 수소 결합 또는 이온 결합 단독에 의해 부여된 엔탈피로부터 예측할 수 없다. 계면으로부터의 거의 완전한 물 분자의 제거와 관련된 엔트로피는 크기면에서 유사한 에너지 기여를 나타낸다. 이것은 상호작용을 하는 분자들의 율곽 간의 완벽한 일치가 항원-항체 고친화성 상호작용의 기초가 되는 중요한 인자라는 것을 의미한다.
- <15> WO 97/30150(참고 1)에서, 단백질 분자가 모 단백질에 비하여 아미노산 서열에 특이적 돌연변이의 분포를 가진 한 군의 단백질 분자가 청구보호되었다. 상세한 설명으로부터, 본 발명은 모 단백질에 비하여 변형되었으나, 모 단백질(자연발생적 알레르겐)과 같은 방식으로 받아들여지고, 소화되며, T세포에 제시되는(presented) 유사체를 생산하는 것과 관계된다고 보인다. 그것에 의하여 변형된(modified) T 세포 반응이 얻어진다. 변형된 단백질들의 라이브러리는 PM(Parsimonious mutagenesis)이라고 명명된 기술을 사용하여 제조되었다.
- <16> WO 92/02621(참고 2)에서, 재조합 DNA 분자를 기술하는데, 상기 분자는 *Fagales* 목(目) 계통의 나무 알레르겐의 적어도 하나의 에피토프를 갖는 폴리펩티드를 코드화(encoding)하는 DNA를 포함하며, 상기 알레르겐은 *Aln g 1*, *Cor a 1*, 및 *Bet v 1*으로부터 선택된다. 상기 발명에서 기술된 재조합 물질들 모두는, 자연 발생적 알레르겐의

서열에 상응하는 아미노산 서열 또는 아미노산 서열의 일부를 가진다.

- <17> WO 90/11293(참고 3)은 단리된 두드러기쭉(ragweed) 꽃가루의 알레르겐 펩티드 및, 변형된 두드러기쭉 꽃가루의 펩티드에 관한 것이다. 상기 발명에서 밝혀진 폴리펩티드는 자연발생적 알레르겐 또는 자연발생적인 그의 아이소폼(isoform)의 서열 중 하나에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.
- <18> 알레르겐의 화학적 변형
- <19> 알레르겐의 화학적 변형을 위한 몇가지 접근이 시도되어왔다. 70년대 초반의 접근은 폴리머에 대한 알레르겐의 화학적 결합(coupling), 및 포름 알데히드 등을 사용하여 소위 '알레르고이드(allergoids)'를 생성하는 알레르겐들의 화학적 교차결합을 포함한다. 이들 접근의 이론적 근거는 화학적 리간드의 부착에 의하여 IgE-결합 에피토프를 임의적으로 파괴하여 IgE-결합을 감소시키는 반면, 그 복합체의 증가된 분자량에 의하여 면역성은 보유하는 것이다. '알레르고이드' 생산의 내재적 단점은 화학적 교차 결합 과정을 조절하는 어려움, 및 생성되는 고 분자량 복합체의 표준화 및 그 분석의 어려움과 관계된다. '알레르고이드'는 최근 임상적으로 사용되며, IgE-결합 에피토프의 임의적 파괴 때문에 전통적인 백신과 비교하여 더 높은 투여량이 투여될 수 있으나, 안정성 및 효능의 매개변수는 전통적 백신의 사용에 비하여 개선되지 않았다.
- <20> 알레르겐의 화학적 변형에 대한 보다 최근의 연구는 본질적 치료 대상이 알레르겐 특이적 T세포라고 추정하고, 알레르겐의 3차 구조를 전체적으로 붕괴시켜, IgE-결합을 제거하는 것을 목적으로 한다. 그러한 백신은 최소한의 T세포 에피토프를 나타내는 알레르겐 서열 유래의 합성 펩티드, 연결된 T세포 에피토프를 나타내는 더 긴 펩티드, 면역우위(immunodominant) T세포 에피토프의 영역을 나타내는 더 긴 알레르겐 유래의 합성 펩티드, 또는 재조합 기술에 의하여 두 개의 반쪽으로 잘리는 알레르겐 물질을 포함한다. 이 원리에 기초한 다른 접근은 '저 IgE 결합(low IgE binding)' 재조합 아이소폼의 사용을 제안하여 왔다. 최근 천연적 알레르겐은 이소알레르겐(isoallergen) 및 그들의 아미노산이 대략 25%까지 치환된 변이체(variants)를 포함하는 이종체들이며 것이 명백해졌다. 일부 재조합 이소알레르겐은 아마도 비가역적 변성, 및 나아가 3차 구조의 전체적 붕괴 때문에 IgE 결합에 덜 효율적이라는 것이 발견되었다.
- <21> 생체의 돌연변이유발 및 알레르기 백신화
- <22> 생체의 부위-특이적 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)에 의하여 알레르기 발생을 감소하기 위한 시도들이, Der f 2(Takai et al, 참고 4), Der p 2(Smith et al, 참고 5), 39 kDa *Dermatophagoides farinae* 알레르겐(Aki et al, 참고 6), 벌 독 포스포리파제 A2(Forster et al, 참고 7), Ara h 1(Burks et al, 참고 8), Ara h 2(Stanley et al, 참고 9), Bet v 1(Ferreira et al, 참고 10 및 11), 자작나무 프로필린(Wiedemann et al, 참고 12) 및 Ory s 1(Alvarez et al, 참고 13)를 포함하는 각종의 알레르겐을 사용하여 실시되어 왔다.
- <23> 이들 접근의 이론적 근거는 재조합 돌연변이체 알레르겐의 3차 구조의 붕괴에 의한 IgE 결합의 감소 및 제거에 의하여 IgE 매개 부작용의 위험을 줄이는 동시에, 알레르겐 특이적 T세포를 다시 어드레싱하는 것이다. 이들 접근 이전의 이론적 근거는 우세한 IgE 결합 에피토프의 개념을 포함하지 않고, 또한 B 세포 및 항체 생산에 관여하는 새로운 방어적 면역 반응이 개시된다는 개념도 포함하지 않는다.
- <24> Ferreira 등(참고 11)에 의한 논문은 IgE 결합을 감소시키기 위한 부위-특이적 돌연변이유발의 사용을 기술한다. Bet v 1의 3차원 구조가 논문에 언급되지만, 저자들은 돌연변이를 위해 용매에 노출된 아미노산 잔기의 예측을 위하여 상기 구조를 사용하지 않고, 그들의 반은 낮은 정도의 용매 노출을 가진다. 저자들은 오히려 본 논문에서 설명된 보존된 표면 영역의 동정에 기초한 구조의 개념과는 다른, 단백질에서의 기능성 잔기의 예측을 위하여 개발된 방법을 사용한다. 저자들이 α-탄소 골격 3차 구조의 보존에 대하여 논의하고 있기는 하지만, 이 개념은 치료적 전략의 일부가 아니라, 단지 생체의 IgE 결합을 측정하기 위하여 포함된다. 나아가, 제시된 증거들은 CD-스펙트럼의 정상화가 일부 샘플에서의 변성을 평가하는 것을 방해하므로 적당하지 않으며, 이것은 통상적인 문제이다. 기술된 치료적 전략은 알레르겐 특이적 T 세포에 대한 내성을 유도하는 것을 목적으로 하며, 새로운 면역 반응의 개시는 언급되지 않는다.
- <25> Wiedemann 등(참고 12)에 의한 논문은 모노클로날 항체 에피토프의 특성화를 위한 부위-특이적 돌연변이유발 및 펩티드 합성의 용도를 기술한다. 저자들은 항원의 3차 구조에 대한 지식을 가지며, 그들은 돌연변이를 위해 표면-노출된 아미노산을 선별하는데 이 지식을 사용하였다. 사용된 알고리즘은 상동의 서열들과 다른 아미노산들이 선별되기 때문에, 본 발명자들에 의하여 명시된 것과 반대라고 말할 수 있다. 본 연구는 표면에 노출된 아미노산의 치환이 모노클로날 항체의 결합 특성을 변형시킬 수 있는 능력을 가진다는 것을 입증하며, 이는 통상의 지식을 고려할 때 놀라운 일이 아니다. 명시된 실험들은 알레르기 개체의 혈청 IgE와 같은 폴리클로날 항체의

결합에서 변화를 평가하도록 고안되지 않았다. 포함된 실험 중의 하나는 혈청 IgE를 사용하며, 이들 실험이 양적 평가를 위하여 적합하지는 않지만 IgE 결합이 실행된 돌연변이에 의하여 영향을 받는 것 같지는 않다.

- <26> Smith 등에 의한 논문(참고 5)은 모노클로날 항체 에피토프의 맵핑(mapping) 및 IgE 결합의 감소를 위한 부위-특이적 돌연변이유발의 용도를 명시한다. 저자들은 3차 구조에 대한 지식이 없고, α-탄소 골격의 3차 구조의 보존을 평가하기 위한 시도를 하지 않았다. 사용된 알고리즘은 돌연변이를 위하여 선별된 아미노산이 실질적으로 분자 표면에 노출되었는지를 확신시키지 못한다. 기술된 돌연변이체 중 오직 하나만이 IgE 결합에서의 실질적인 감소를 유도한다. 이 돌연변이체는 테스트한 모든 항원에 대한 결합이 부족하며, 이는 3차 구조가 붕괴된 것을 나타낸다. 저자들은 치료적 전략에 한정하지 않고, 새로운 면역 반응의 개시를 언급하지 않았다.
- <27> Colombo 등(참고 14)에 의한 논문은 부위-특이적 돌연변이유발 및 펩티드 합성을 사용한 IgE 결합 에피토프 연구에 대하여 기술한다. 저자들은 분자 표면상의 에피토프의 존재를 입증하기 위하여 상동적 단백질의 결정 구조에 기초한 3차원 컴퓨터 모델 구조를 사용한다. 1차 구조의 상동성을 보이는 다른 알레르겐 상의 에피토프의 추가적 존재는 에피토프를 나타내는 합성 펩티드를 사용하여 설명된다. 치료적 전략은 단량체 IgE 결합 에피토프를 나타내는 이 합성 펩티드를 사용하는 치료에 기초한다. 새로운 방어적 면역 반응을 개시하는 치료적 개념 뿐만 아니라 상동적 알레르겐 간의 보존된 표면 영역 또한 언급되지 않았다.
- <28> Spangfort 등에 의한 논문(참고 15)은 다수의 자작나무 알레르겐의 3차원 구조 및 보존된 표면-노출된 패치(patch)에 대하여 기술한다. 논문은 주요한 IgE 결합 에피토프 또는 부위-특이적 돌연변이유발 중 어느 것에 대해서도 언급하지 않았고, 이들 중 어느 것도 치료적 적용은 설명하지 않는다.
- <29> 상기의 어느 연구들에서도 IgE 결합은 α-탄소 골격의 3차 구조를 보존하면서 표면에 노출된 아미노산을 치환함에 의하여 감소하지 않는다. 상기 언급된 접근들의 근본적 원리는 우세한 IgE 결합 에피토프의 개념을 포함하지 않으며, 새로운 방어적 면역 반응을 개시하는 치료적 개념을 포함하지 않는다.
- <30> WO 99/47680에서는 알레르겐의 α-탄소 골격 3차 구조를 유지하면서, 인공적인 아미노산 치환을 제한된 주요 위치로 도입하는 것을 공개하였다. 특히 WO 99/47680에서는 자연발생적 알레르겐으로부터 유래된 비자연발생적 돌연변이체인 재조합 알레르겐을 공개하였고, 상기에서 B 세포 에피토프의 표면-노출되고 보존된 적어도 하나의 아미노산 잔기는 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 분류학적 목 내에서 공지된 어떤 상동성 단백질의 아미노산 서열의 같은 위치에서도 발생하지 않는 다른 잔기로 치환되며, 상기 돌연변이체 알레르겐은 본질적으로 상기 자연발생적 알레르겐과 같은 α-탄소 골격의 3차 구조를 가지며, 상기 자연 발생적 알레르겐으로의 결합에 비하여 돌연변이된 알레르겐에 대한 특이적 IgE 결합이 감소된다.
- <31> WO 99/47680에서 공개된 재조합 알레르겐은 a) 상기 자연발생적 알레르겐이 유래하는 분류학적 목 내의 모든 공지된 상동 단백질들에서 70% 이상의 동일성을 갖도록 보존된 자연 발생적 알레르겐에서의 아미노산 서열을 동정하고, b) 적어도 20%의 용매 접근성을 갖는 것으로 정의하여, 알레르겐 분자의 3차원 표면의 적어도 400Å²에 걸쳐서 밀착하여(cohesively) 연결되어 있는 적어도 하나의 보존된 아미노산 잔기의 패치를 한정하며, 상기에서 적어도 하나의 패치는 적어도 하나의 B 세포 에피토프를 포함하며, c) 본질적으로 알레르겐 분자의 전체적 α-탄소 골격의 3차 구조를 유지하면서, 상기 적어도 하나의 패치에 있는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 특정 위치에서 비보존적인 다른 아미노산으로 치환함으로써 얻을 수 있다.

실시예

- <74> **본 발명의 목적**
- <75> 본 발명의 이론적 근거
- <76> 본 발명은 독특한 이론적 근거에 기초한다. 이 원리에 따르면, 성공적인 알레르기 백신화의 기작은 진행중인 Th2-형 면역 반응의 변형이 아니라, 오히려 B 세포에 의한 3차 에피토프 인식 및 항체 형성을 포함한 새로운 면역 반응의 병렬적 개시이다. 이 새로운 면역 반응은 부분적으로는 Th1-형 면역 반응이라고 믿어진다. 이 모델은 특이적 IgE의 수준이 성공적인 백신 치료에 의하여 영향을 받지 않으며, 성공적인 치료가 종종 알레르겐 특이적 IgG4의 상당한 상승과 동시에 이루어진다는 관찰에 의하여 뒷받침된다. 게다가, 코의 생체검사법(biopsy)의 연구는 알레르겐 침입 전후에 Th2-유사 표현형을 가진 T 세포의 감소가 일어나지 않고, 오히려 Th1-유사 T세포의 증가를 나타낸다. 백신(또는 약학적 조성물)이 기도(airway) 이외의 다른 경로를 통하여 투여될 때, 진행 중인 Th2 반응으로부터 물리적으로 간격을 둔 위치에서 새로운 면역 반응이 전개되어, 2개의 반응이 병렬적으로 존재할 수 있게 한다는 가설을 세운다.

- <77> 면역 시스템의 다른 중요한 태양은 소위 우세한(dominant) IgE 결합 에피토프의 존재의 주장이다. 이들 우세한 IgE 결합 에피토프는 항체 결합을 수용하기에 충분히 큰 3차 구조 의존적 응집성 표면 영역을 포함하며, 관련 종 유래의 상동성 알레르겐, 이소알레르겐(isoallergen), 및/또는 변이체 사이에서 보존되는 것으로 생각된다. 상동성 알레르겐에서 비슷한 에피토프와 결합할 수 있는 교차반응성 IgE의 존재는, 알레르기 개체들이 종종 밀접하게 관련된 몇몇의 종들, 예를 들면, 오리나무(alnus), 자작나무(birch), 및 개암나무(hazel), 다중 풀 종류, 또는 집 먼지 진드기 속 *Dermatophagoids*에 반응을 일으킨다는 임상적 관찰에 의하여 뒷받침된다. 이것은 관련된 종류들로부터의 상동성 알레르겐 사이의 IgE 교차 반응성 및 상동성 알레르겐에 대한 IgE 결합을 저해할 수 있는 하나의 알레르겐의 능력을 증명하는 실험에 의하여 더욱 뒷받침된다(Ipsen et al. 1992, 참고 16). 노출 및 면역 반응이 투여량 의존적 경향으로 관계된다는 것은 잘 알려져 있다. 이들 관찰의 종합에 기초하여, 보존된 표면 영역들이 비보존적 표면 영역보다 더 높은 투여량으로 면역 시스템에 노출되어서 더 높은 친화성을 가진 IgE 항체를 생산한다는 가설을 세우고, 이것을 지금부터 "우세한 IgE 결합 에피토프"라고 부른다.
- <78> 이 원리에 의하면, 알레르겐이 천연적 알레르겐의 구조와 근본적으로 동일한 α -탄소 3차 구조를 가지며, 따라서 IgE 결합의 감소를 목적으로 하는 돌연변이유발의 대상에 해당하는 보존된 패치를 둘러싼 영역의 표면 위상(topology)을 확실히 보존하게 하는 것이 필수적이다. 이들 기준(criteria)을 만족시킴으로써, 안정성이 손상되지 않고도 방어적 면역 반응을 일으키는 능력을 개선하여, 비교적 높은 투여량으로 투여될 가능성을 갖는다.
- <79> 게다가 본 발명은 알레르기 증상이 고친화성 IgE 수용체, FcεR1을 통하여, 알레르겐과 마스트 세포 및 호염기 성구 등의 작용기 세포(effector cell)에 결합한 2개의 특이적 IgE가 교차 결합함으로써 유도된다는 발견에 기초한다. 예시를 위하여 본 발명자들은 도 15을 언급하며, 이는 IgE 결합 에피토프를 가진 알레르겐의 이론적 모델을 묘사한다. 도 15A를 참고하면, 마스트 세포로부터 방출된 매개자(mediator)의 유도 및 그 후의 알레르기 증상은 마스트 세포의 표면에 결합한 IgE의 알레르겐-매개 교차 결합에 의하여 영향을 받는다. 도 15B에서 나타난 상황에서, 2개의 에피토프는 그들의 IgE 결합 능력이 감소되도록 돌연변이화되고, 따라서 알레르겐-매개 교차결합이 방지된다. 그에 더하여, 알레르겐이 통상 3개 이상의 B 세포 에피토프를 포함한다는 것을 주목해야 할 것이다. 그러나, 도 15에서 묘사된 이론적 상황으로부터, IgE 결합 능력을 제거 또는 감소하도록 돌연변이된 에피토프들이 많을수록, 알레르겐-매개 교차결합 및 결과적인 알레르기 증상의 위험이 작아진다고 추측된다.
- <80> 그러나, 돌연변이화된 알레르겐이 IgG 반응을 포함하는 새로운 면역 반응을 일으키게 하기 위하여, 알레르겐은 적어도 하나의 손상되지 않은(intact) 에피토프를 포함하여야 한다. 상기 돌연변이화된 알레르겐은 백신화를 위하여 사용될 때 개선된 방어를 제공할 것이므로, 손상되지 않은 에피토프가 우세한 에피토프인 것이 바람직하다.
- <81> 결론적으로, 본 발명의 진보적 아이디어는 다중 B 세포 에피토프에서 IgE 결합을 감소시키는 돌연변이 및 적어도 하나의 손상되지 않은 에피토프를 갖는 돌연변이화된 알레르겐이, 한편으로는 알레르겐-매개 교차결합을 감소시키고, 다른 한편으로는 IgE 반응과 경쟁적인 결합능력을 갖는 IgG 반응을 일으킨다는 인식에 기초한다. 따라서, 상기 돌연변이화된 알레르겐은 과민성 반응의 위험이 크게 감소될 것이라는 점에서 고도로 유리한 알레르겐을 구성한다.
- <82> 또한, 본 발명은 이상적으로는 많은 또는 모든 에피토프가 손상되지 않다고 나타나는, 다양한 이와 같은 돌연변이화된 알레르겐의 혼합물을 포함하는 백신은 알레르기 증상에 대한 방어를 유도하는 능력에 있어서 그로부터 돌연변이화된 알레르겐이 유도되는 자연발생적 알레르겐과 균등하게 효율적일 것이라는 인식에 기초한다.
- <83> 본 발명의 요약
- <84> 본 발명은 각 돌연변이화된 에피토프의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시킬 목적으로, 다수의 한정된 중요 위치, 예를 들면 IgE 결합 에피토프에 인공적 아미노산 치환을 도입하는 것에 관한 것이다.
- <85> 본 발명은 자연발생적 알레르겐의 돌연변이체인 재조합 알레르겐을 제공하며, 상기에서 돌연변이 알레르겐 각각은 상기 자연발생적 알레르겐의 IgE 결합 능력에 비하여 돌연변이화된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 적어도 4개의 1차 돌연변이를 가지며, 상기에서 1차 돌연변이 각각은 표면-노출된 아미노산 잔기 1개를 다른 잔기로 치환하며 이는 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 분류학적인 종 내의 어느 기지의 상동적 단백질의 아미노산에서의 같은 위치에서도 일어나지 않고, 여기서 각각의 1차 돌연변이는 각 1차 돌연변이들 사이에 적어도 15Å의 간격으로 떨어져 있고, 상기에서 1차 돌연변이들은 800Å² 면적을 갖는 적어도 하나의 원형 표면 영역이 돌연변이를 포함하지 않는 방식으로 위치되었다.
- <86> 이론에 구속됨 없이, B 세포 에피토프는 알레르겐의 거의 전체 표면에 걸쳐서 분포할 수 있다고 믿어진다. 나아

가, 적어도 일부의 에피토프들이 다수의 중첩적(overlapping) 에피토프들로 구성되는 에피토프의 클러스터의 일부를 구성한다는 실험적 증거들이 있다. 따라서, 본 발명에 대한 이론적 기초는 어떤 표면-노출된 아미노산이 돌연변이를 위한 잠재적 부위(site)를 구성하며, 이는 특이적 IgE와 결합하는 능력의 감소로 나타날 수 있다는 것이다.

<87> 따라서, 1차 돌연변이들은 그들이 별개의 클러스터의 에피토프에 있는 돌연변이라는 것을 확신하게 하는, 예를 들어 그들이 간격을 두거나 하는 각각에 대한 그들의 위치에 의하여 정의된다.

<88> 본 발명은 또한 2 이상의, 청구항 1에 따른 재조합 돌연변이체 알레르겐 변이체를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기에서 각 변이체는 적어도 하나의 다른 변이체에서는 존재하지 않는 적어도 하나의 근본적 돌연변이를 갖는 것으로서 정의되며, 상기에서 각각의 변이체에 대하여 각각의 부재적 1차 돌연변이로부터 반경 15Å의 내에는 어떤 2차 돌연변이도 존재하지 않는다. 바람직하기는 조성물은 2 ~ 12개, 더욱 바람직하기는 3 ~ 10개, 더욱 바람직하기는 4 ~ 8개, 및 가장 바람직하기는 5 ~ 7개의 변이체를 포함한다.

<89> 본 발명은 또한 다음의,

<90> a) 자연발생적 알레르겐에서 용매 접근성이 적어도 20%인 다수의 아미노산 잔기를 동정하고,

<91> b) 각각의 선택된 아미노산이 다른 선택된 아미노산으로부터 15Å 간격으로 떨어져 있고, 선택된 아미노산들이 800Å²의 면적을 갖는 적어도 하나의 원형 표면 영역에 선택된 아미노산이 전혀 포함되지 않도록 위치하는 방식으로, 적어도 4개의 동정된 아미노산 잔기를 선택하고,

<92> c) 상기 선택된 아미노산 각각에 대해, 상기 자연발생적 알레르겐의 결합 능력과 비교할 때 돌연변이화된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 1차 돌연변이를 일으키고, 여기서 각각의 1차 돌연변이는 선택된 아미노산 잔기의 다른 아미노산으로의 치환체이고, 이는 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 분류학적 종 류의 어느 알려진 상동성 단백질의 아미노산 서열에서 동일한 위치에서 일어나지 않는 1차 돌연변이인 것을 특징으로 하는, 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐을 제조하는 방법을 제공한다.

<93> 선택적인 면에서, 본 발명은 알레르겐이 상응하는 자연발생적 알레르겐을 코드화하는 DNA의 DNA 서플링(DNA shuffling: 분자 육종)에 의하여 얻어지는 DNA 서열로부터 생산되는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 재조합 알레르겐을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<94> 나아가, 본 발명은 약학적 용도를 위한 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐에 관한 것이다.

<95> 또한 본 발명은 알레르기를 예방 및/또는 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한, 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐의 용도에 관한 것이다.

<96> 나아가, 본 발명은 약제로의 용도를 위한 청구항 37에 따른 조성물에 관한 것이다.

<97> 또한, 본 발명은 알레르기를 예방 및/또는 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 청구항 37에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다.

<98> 나아가, 본 발명은 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제, 및 선택적으로 보조제와 혼합되는 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐, 또는 청구항 37에 따른 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 알레르기 환자에서 자연발생적 알레르겐에 의하여 유발된 알레르기 반응에 대한 백신의 형태일 수 있다.

<99> 또한, 본 발명은 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐, 청구항 37에 따른 조성물, 또는 청구항 41 내지 42, 또는 46에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것으로 이루어지는, 개체에 면역 반응을 일으키는 방법에 관한 것이다.

<100> 나아가, 본 발명은 개체에 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐, 청구항 37에 따른 조성물, 또는 청구항 41 내지 42, 또는 46에 따른 약학적 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는, 개체의 백신화 또는 치료에 관한 것이다.

<101> 또한, 본 발명은 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐 또는 청구항 37에 따른 조성물을 약학적으로 허용되는 기질 및/또는 부형제와 혼합하는 것을 포함하는, 청구항 41 또는 42에 따른 약제학적 조성물을 제조하는 과정에 관한 것이다.

<102> 나아가, 본 발명은 청구항 45에 따른 공정에 의하여 얻을 수 있는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- <103> 또한, 본 발명은 개체에 청구항 1에 따른 재조합 알레르겐, 청구항 37에 따른 조성물, 또는 청구항 41 내지 42, 또는 46에 따른 약제학적 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는, 개체에 대한 알레르기 반응의 치료, 예방 또는 경감을 위한 방법에 관한 것이다.
- <104> 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 알레르겐을 코드화하는 DNA 서열, 그들의 유도체, 그들의 부분적 서열, 그들의 변성된(degenerated) 서열, 또는 스트린젠트 조건하에서 그들과 혼성화하는 서열에 관한 것으로, 상기에서 상기 유도체, 부분적 서열, 변성된 서열 또는 혼성화하는 서열은 적어도 하나의 B 세포 에피토프를 갖는 펩티드를 코드화한다.
- <105> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 DNA를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- <106> 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- <107> 부가적으로, 본 발명은 본 발명에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 재조합 돌연변이체 알레르겐을 생산하는 방법에 관한 것이다
- <108> 마지막으로, 본 발명은 자연발생적인 알레르겐에 특이적인 T 세포 클론 또는 T 세포주를 자극할 수 있는 적어도 하나의 T 세포 에피토프를 포함하는 본 발명에 따른 재조합 알레르겐, 또는 본 발명에 따른 DNA 서열에 의하여 코드화되는 재조합 알레르겐에 관한 것이다. 본 발명에 따른 돌연변이체는 바람직하기는 T 세포 자극지수에 의하여 측정될 때 비슷한 방법/정도로 알레르겐 특이적 T 세포주를 자극할 수 있어야 할 것이다.
- <109> 발명의 상세한 설명
- <110> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 1차 돌연변이들은 20Å, 바람직하기는 25Å, 및 가장 바람직하기는 30Å의 간격을 두고 있다.
- <111> 알레르겐은 특이적 IgE를 위한 다수의 잠재적 결합 영역을 포함하며, 각 영역은 약 800Å²의 크기를 가지며, 각 표면 영역은 다수의 중첩적 에피토프를 포함하는 것으로 믿어진다. 따라서 알레르겐은 800Å²로 나누어진 표면 영역의 다수의 잠재적인 1차 돌연변이를 갖는다.
- <112> 바람직하기는, 본 발명에 따른 재조합 알레르겐은 5 내지 20개의, 바람직하기는 6 내지 15개의, 더욱 바람직하기는 7 내지 12개의, 가장 바람직하기는 8 내지 10개의 1차 돌연변이를 포함한다.
- <113> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 돌연변이를 포함하지 않는 표면 영역은 700Å², 바람직하기는 600Å², 더욱 바람직하기는 500Å², 가장 바람직하기는 400Å²의 면적을 갖는다.
- <114> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 재조합 알레르겐은 상기 자연발생적 알레르겐의 결합 능력에 비하여 돌연변이화된 알레르겐의 특이적 IgE 결합 능력을 감소시키는 다수의 2차(추가) 돌연변이를 포함하며, 상기에서 각각의 2차 돌연변이는 표면-노출된 아미노산 잔기 1개를 다른 잔기로 치환하며, 이는 상기 자연발생적 알레르겐이 유래하는 분류학적 종 내의 어느 기지의 상동성 단백질의 아미노산에서의 같은 위치에서 발생하지 않으며, 상기에서 2차 돌연변이는 상기 원형 부위 외부에 위치한다.
- <115> 2차 돌연변이는 1차 돌연변이와 가깝게 위치할 수 있다. 예를 들면, 2차 돌연변이는 1차 돌연변이에 의하여 돌연변이화되는 같은 에피토프를 위한 부가적 돌연변이일 수 있다.
- <116> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 자연발생적 알레르겐에서 치환되는 적어도 하나의 표면-노출된 아미노산은 20% 이상, 바람직하기는 30% 이상, 더욱 바람직하기는 40% 이상, 및 가장 바람직하기는 50% 이상의 용매 접근성을 갖는다.
- <117> 본 발명의 다른 바람직한 구현예에서, 자연발생적 알레르겐에서 치환되는 적어도 하나의 표면-노출된 아미노산은 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 기지의 상동성 단백질과 70% 이상, 바람직하기는 80% 이상, 및 가장 바람직하기는 90% 이상의 동일성을 유지한다.
- <118> 바람직하기는, 본 발명에 따른 재조합 알레르겐은 본질적으로 상기 자연발생적 알레르겐과 같은 α-탄소 골격의 3차 구조를 갖는다.
- <119> 돌연변이와 자연발생적 알레르겐 물질의 α-탄소 골격의 3차 구조를 비교할때, 원자 좌표의 평균적 제곱근평균 제곱 편차는 바람직하기는 2Å 이하이다.

- <120> 본 발명의 재조합 알레르겐의 바람직한 구현예에서, 돌연변이 알레르겐으로 병합된 각각의 아미노산 잔기는 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 분류학적 속(屬: genus), 바람직하기는 아과(亞科), 더욱 바람직하기는 과(科), 더욱 바람직하기는 상과(上科), 더욱 바람직하기는 아강(亞綱: legion), 더욱 바람직하기는 아목(亞目), 및 가장 바람직하기는 목(目) 내의 어느 기지의 상동적 단백질의 아미노산에서의 같은 위치에서는 발생하지 않는다.
- <121> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 재조합 돌연변이 알레르겐은 비-자연발생적 알레르겐이다.
- <122> 돌연변이화된 알레르겐에 대한 특이적 IgE의 결합은, 출처-특이적 IgE 반응 알레르기 개체 또는 그들의 울혈에서 나온 혈청으로 행한 면역 검사법에서, 자연발생적 이소알레르겐 또는 비슷한 재조합 단백질에 비하여 적어도 5%, 바람직하기는 적어도 10% 감소한다.
- <123> 감소된 IgE 결합 및 돌연변이의 교차결합을 매개하는 감소된 능력을 측정하는 다른 방법은 히스타민 방출(HR)을 개시할 수 있는 돌연변이체의 능력이다. 히스타민의 방출은 몇몇 히스타민 방출 검사법으로 측정될 수 있다. 돌연변이체의 감소된 히스타민 방출은 교차결합을 할 수 있게 하는 그들의 감소된 능력 뿐만 아니라 세포 표면에 결합된 특이적 IgE에 대한 감소된 친화성에서 유래한다. HR은 자연발생적 알레르겐에 비하여 본 발명의 돌연변이에 대해서 바람직하기는 5-100%, 더욱 바람직하기는 25-100%, 더욱 바람직하기는 50-100%, 및 가장 바람직하기는 75-100% 감소한다.
- <124> 전형적으로, 돌연변이를 포함하지 않는 800Å²의 면적을 갖는 원형 표면 영역은 15-25개의 아미노산 잔기의 원자를 포함한다.
- <125> 본 발명의 바람직한 재조합 알레르겐은 표면-노출된 아미노산 잔기들이 용매 접근성에 대하여 평가되고, 좀더 용매 접근가능한 것들 중에서 1 이상의 아미노산이 치환된 것을 특징으로 한다.
- <126> 본 발명에 따른 재조합 알레르겐의 더욱 바람직한 구현예에서, 표면-노출된 아미노산 잔기들이 자연 발생적 알레르겐이 기원한 종 내의 모든 기지의 상동성 알레르겐에서 보존 정도에 대하여 평가되고, 더욱 보존된 아미노산 중에서 1 이상의 아미노산들이 치환된 것을 특징으로 한다.
- <127> 바람직하기는, 본 발명에 따른 재조합 알레르겐은 1차 돌연변이당 1 내지 4의 2차 돌연변이를 포함한다.
- <128> 본 발명의 바람직한 구현예는 1 이상의 치환이 부위-특이적 돌연변이유발에 의하여 행하여지는 것을 특징으로 한다.
- <129> 본 발명의 다른 바람직한 구현예는 1 이상의 치환이 무작위(random) 돌연변이유발에 의하여 행하여지는 것을 특징으로 한다.
- <130> 본 발명의 더욱 바람직한 구현예는 1 이상의 치환이 DNA 서플링에 의하여 행하여 지는 것을 특징으로 한다.
- <131> 본 발명에 따른 재조합 알레르겐은 적절하기는 나무, 풀, 약초(herb), 곰팡이, 집 먼지 진드기, 바퀴벌레, 및 동물의 털 및 비듬 등으로부터 유래하는 흡입 알레르겐의 돌연변이체일 수 있다. 나무, 풀, 및 약초로부터의 중요한 꽃가루 알레르겐은 자작나무(*Betula*), 오리나무(*Alnus*), 개암나무(*Corylus*), 서나무(*Carpinus*) 및 올리브(*Olea*) 등을 포함하는 *Fagales*, *Oleales*, 및 *Pinales*의 분류학적 목, *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, 및 *Secale* 속의 울혈 등을 포함하는 *Poales* 목, *Ambrosia* 및 *Artemisia*의 속의 약초 등을 포함하는 *Asterales* 및 *Urticales* 목으로부터 유래하는 것이다. 곰팡이로부터의 중요한 흡입 알레르겐은 *Alternaria* 및 *Cladosporium* 속 등으로부터 유래하는 것이다. 다른 중요한 흡입 알레르겐은 *Dermatophagoides* 속의 집 먼지 진드기로부터 유래하는 것, 바퀴벌레로부터 유래하는 것, 및 고양이, 개, 및 말 등의 포유동물로부터 유래하는 것이다. 나아가, 본 발명에 따른 재조합 돌연변이는 벌(*Apidae* 상과), 장수말벌(*Vespidae* 상과), 및 개미(*Formicoidae* 상과)를 포함하는 *Hymenoptera*의 분류학적 목의 벌레에 쏘이거나, 또는 물림으로써 유도되는 것을 포함하는 독 알레르겐의 돌연변이체일 수 있다.
- <132> 특이적 알레르겐 성분은 *Fagales* 목의 *Bet v 1*(*B. verrucosa*, 자작나무), *Aln g 1*(*Alnus glutinosa*, 오리나무), *Cor a 1*(*Corylus avelana*, 개암나무), 및 *Car b 1*(*Carpinus betulus*, 말벌) 등을 포함한다. 다른 것들은 *Cry j 1*(*Pinales*), *Amb a 1* 및 *2*, *Art v 1*(*Asterales*), *Par j 1*(*Urticales*), *Ole e 1*(*Oleales*), *Ave e 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol l 1*, *Lol p 1* 및 *5*, *Pas n 1*, *Phl p 1* 및 *5*, *Poa p 1*, *2* 및 *5*, *Sec c 1* 및 *5*, 및 *Sor h 1*(각종 풀꽃가루), *Alt a 1* 및 *Clah 1*(곰팡이), *Der f 1* 및 *2*, *Der p 1* 및 *2*(집 먼지 진드기, 각각 *D. farinae* 및 *D. pteronyssinus*), *Lep d 1* 및 *2*(*Lepidoglyphus* 박멸자; 창고 진드기), *Bla g 1* 및 *2*, *Per*

a 1(바퀴벌레, 각각 *Blatella germanica* 및 *Periplaneta americana*), *Fel d 1*(고양이), *Can f 1*(개), *Equ c 1*, 2, 및 3(말), *Apis m 1* 및 2(꿀벌), *Ves v 1*, 2, 및 5, *Pol a 1*, 2, 및 5(모든 장수말벌) 및 *Sol i 1*, 2, 3, 및 4(불개미) 등이다.

<133> 한 구현예에서, 재조합 알레르겐은 Bet v 1의 돌연변이체이다. 잠재적으로 치환에 적합한 아미노산은 다음의 아미노산,

V2, D72, E87, K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, D-125, R-145, D-109, E-127, Q-36, E-131, L-152, E-6, E-96, D-156, P-63, H-76, E-8, K-134, E-45, T-10, V-12, K-20, S-155, H-126, P-50, N-78, K-119, V-2, L-24, E-42, N-4, A-153, I-44, E-138, G-61, A-130, R-70, N-28, P-35, S-149, K-103, Y-150, H-154, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141, E-87 and E-73.

<134> 을 포함한다. 하나 이상의 1차 및 2차 치환은 다음의,
 <135> 을 포함한다. 하나 이상의 1차 및 2차 치환은 다음의,

V2F, V2L, V2I, V2M, Y5V, T10P, T10A, K20N, D25E, N28T, K32Q, Q36A, Q36K, E42S, E45S, N47S, K55N, K65N, D72H, D72Q, D72N, T77A, N78K, E87G, E96L, K97S, K103V, P108G, D109N, K123I, D125Y, K129N, K134E, R145E, S149R, S149T, D156H and +160N,

<136> 으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 상기에서 +은 추가적인 아미노산이 병합된 것을 의미한다.

<137> 본 발명에 따른 Bet v 1 돌연변이체의 예들은 다음과 같다 (괄호는, 사용될 때, 1차 및 2차 돌연변이를 가리킨다).

<138> 돌연변이체 A

(Asn28Thr, Lys32Gln), (Asn78Lys, Lys103Val), Arg145Glu, (Asp156His, +160Asn).

<139> 돌연변이체 B

Tyr5Val, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, Lys123Ile, Lys134Glu, Asp156His.

<140> 돌연변이체 2595 (실시예 2):

N28T, K32Q, E45S, P108G

<141> 돌연변이체 2628 (실시예 4):

Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu.

<142> 돌연변이체 2637 (실시예 4):

Ala16Pro, (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys103Thr, Pro108Gly, (Leu152Lys, Ala153Gly, Ser155Pro).

- <149> 돌연변이체 2724:
- <150> N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H, +160N.
- <151> 돌연변이체 2733 (실시예 4):
- (Tyr5Val, Lys134Glu), (Asn28Thr, Lys32Gln), Glu45Ser,
Lys65Asn, (Asn78Lys, Lys103Val), Lys97Ser, Pro108Gly,
<152> Arg145Glu, (Asp156His, +160Asn)
- <153> 돌연변이체 2744 :
- (Tyr5Val, Lys134Glu), (Glu42Ser, Glu45Ser),
<154> (Asn78Lys, Lys103Val), Lys123Ile, (Asp156His, +160Asn).
- <155> 돌연변이체 2753 (실시예 4):
- (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, (Glu96Leu, Lys97Ser),
(Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser),
<156> Arg145Glu.
- <157> 돌연변이체 2744 + 2595 :
- Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V, P108G, K123I,
<158> K134E, D156H, +160N.
- <159> 돌연변이체 2744 + 2628 :
- Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, K123I, K134E,
<160> D156H, +160N.
- <161> 돌연변이체 2744 + 2595 + 2628 :
- Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V,
<162> P108G, K123I, K134E, D156H, +160N.
- <163> 나아가, 상기의 모든 돌연변이체는 1 이상의 다음 치환을 포함한다 : V2F, V2L, V2I, V2M, T10A, K20N, Q36A
또는 Q36K, D72H, D72Q, D72N, E87G, K129N, 및 S149R 또는 S149T.
- <164> 다른 구현예에서, 재조합 알레르겐은 Vespidae, Apidae 및 Formicoidea의 분류학적 목으로부터 나온 독(venom)
알레르겐으로부터 유래한다.

<165> 추가적 구현예에서, 재조합 알레르겐은 *Ves v 5*로부터 유래한다. 잠재적으로 치환에 적합한 아미노산은 다음의,

K-16, K-185, K-11, K-44, K-210, R-63, K-13, F-6, K-149, K-128, E-184, K-112, F-157, E-3, K-29, N-203, N-34, K-78, K-151, L-15, L-158, Y-102, W-186, K-134, D-87, K-52, T-67, T-125, K-150, Y-40, Q-48, L-65, K-81, Q-101, Q-208, K-144, N-8, N-70, H-104, Q-45, K-137, K-159, E-205, N-82, A-111, D-131, K-24, V-36, N-7, M-138, T-209, V-84, K-172, V-19, D-56, P-73, G-33, T-106, N-170, L-28, T-43, Q-114, C-10, K-60, N-31, K-47, E-5, D-145, V-38, A-127, D-156, E-204, P-71, G-26, Y-129, D-141, F-201, R-68, N-200, D-49, S-153, K-35, S-39, Y-25, V-37, G-18, W-85 and I-182.

<166>

<167> 아미노산을 포함한다. 하나 이상의 1차 및 2차 치환은 K29A, T67A, K78A, V84S, Y102A, K112S, K144A, K202M 및 N203G으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<168> 추가적 구현예에서, 재조합 알레르겐은 *Der p 2*로부터 유래된다. 잠재적으로 치환에 적합한 아미노산은 다음의 아미노산,

R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109 and R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15.

<169>

<170>

<171> 을 포함한다. 하나 이상의 1차 및 2차 치환은 K6A, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N, 및 R128Q로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<172> 본 발명에 따른 *Bet v 1* 돌연변이체의 예는 다음과 같다 :

<173> 돌연변이체 A:

K6A, K15E, H30N, E62S.

<174>

<175> 돌연변이체 B:

K6A, K15E, H30N, E62S, H74N, K82N.

<176>

<177> 돌연변이체 C:

K6A, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N and R128Q

<178>

<179> 백신

- <180> 백신의 제조는 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있다. 백신은 전형적으로 액체 용액 또는 현탁액 형태로 주사제로서 만들어진다. 그 백신은 또한 구강 및 설하 투여를 포함한 경구투여 뿐만 아니라 코를 통한 투여도 가능하도록 에멀전화되거나, 제제화될 수 있다. 본 면역적 성분(본 발명에서 제조합 알레르겐이라고 정의된)은 약제학적으로 허용되고 나아가 활성 성분과 양립할 수 있는 부형제와 적절하게 혼합할 수 있다. 적합한 부형제의 예에는 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 뿐만 아니라 그들의 혼합물이 있다. 백신은 부가적으로 백신의 능력을 강화하는 침윤제, 유화제, 완충제, 또는 보조제과 같은 다른 기질을 포함할 수 있다.
- <181> 백신은 가장 빈번하게는 피하 또는 근육 주사에 의하여 비경구적으로 투여된다. 다른 경로에 의한 투여에 적합한 제형은 경구 제제 및 좌약을 포함한다. 경구 투여를 위한 백신은 약학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 탄산 마그네슘 등의 이러한 제제화를 위하여 통상 사용되는 부형제와 함께 적절하게 제조될 수 있다. 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐, 서방형 제제(sustained release formulation), 에어로졸, 분말 또는 과립 등으로 제조될 수 있다.
- <182> 백신은 투여 제제와 양립할 수 있는 경로로, 치료적으로 효과적이며 면역반응을 일으킬 수 있는 양으로 투여된다. 백신 내에 포함된 활성 성분의 양은 치료받는 대상, 즉 치료에 반응하는 개체의 면역 시스템의 능력, 투여 경로, 개체의 나이 및 체중에 의존한다. 적합한 투여량은 약 0.0001 μ g 내지 1000 μ g의 범위 내에서 달라질 수 있다.
- <183> 상기에서 언급하였듯이, 제제에 보조제를 첨가함으로써 향상된 효과를 얻을 수 있다. 그 보조제의 예에는 인산 완충된 식염수에서 0.05 내지 0.1% 용액으로 존재하는 수산화알루미늄 및 인산(알루미늄) 또는 인산칼슘, 0.25% 용액으로 사용된 당의 합성 폴리머, 또는 폴리락티드 글리콜리드(PLG) 이다. *C. parvum*과 같은 세균 세포, 그람 음성 세균의 엔도독신 또는 리포폴리사카라이드 성분, 만니드 모노알레아트(Artacel A)와 같은 생리적으로 허용되는 기름 운반자(oil vehicle)에 담긴 에멀전, 또는 차단 대용물(block substitute)로 사용된 20% 퍼플루오로카본(예를 들면, Fluosol-DA)용액이 포함된 에멀전과의 혼합물을 또한 사용할 수 있다. MF-59와 같은 기름 에멀전을 또한 사용할 수 있다. QuilA, Qs-21 및 ISCOM 및 RIBI과 같은 사포닌 뿐만 아니라 프로인트 완전 및 불완전 보조제와 같은 다른 보조제가 또한 사용될 수 있다.
- <184> 가장 빈번하게는 백신의 다중 투여가 확실한 효과를 위해 필요할 것이다. 종종 백신이 최초 투여로서 투여된 후, 연속 접종 또는 다른 투여가 이어진다. 백신화의 횟수는 전형적으로는 1 내지 50회의 범위일 것이며, 통상 35회의 백신접종을 초과하지 않을 것이다. 백신화는 통상적으로 3달 내지 5년의 기간 동안 2주마다 내지 2달마다 행해질 것이다. 이것은 원하는 수준의 예방 또는 치료 효과를 제공하도록 고려된 것이다.
- <185> 제조합 알레르겐은 약학적 제제로서 사용될 수 있으며, 이는 증상(과민증)이 발현하는 수년간 알레르겐 반응에 대한 특정한 방어를 제공하는데 적당하다. 통상적으로, 치료는 방어적 효과를 지속하기 위하여 매해 반복되어야 할 것이다. 비강, 경구 및 설하 적용을 위해 제조된 약제는 이 목적에 특히 적합하다.
- <186> 본 발명에 따른 제조합 알레르겐을 제조하는 방법
- <187> 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 또한 제조합 돌연변이 알레르겐을 제조하는 방법에 관한 것이다(참고: 청구항 제48항).
- <188> 본 발명에 따른 치환에 적절한 표면-노출된 아미노산들은, 표면 노출의 정도를 표시하는, 용매(물) 접근성의 정보에 기초하여 동정될 수 있다. 본 발명의 방법의 바람직한 실시예는 용매 접근성과 관련된 상기 동정된 아미노산 잔기의 순위 및 더욱 용매에 접근가능한 것들 중에서 1 이상의 아미노산을 치환하는 것을 특징으로 한다.
- <189> 본 발명에 따른 치환에 알맞는 표면-노출된 아미노산의 동정에 기여할 수 있는 두번째 매개변수는, 상기 자연발생적 알레르겐이 기원하는 종(species) 내의 모든 알려진 상동성 단백질들에 보존된 아미노산의 양이다. 선택적으로, 상기 자연발생적 알레르겐이 기원한 분류학적인 속, 아과, 과, 상과, 아목 또는 목 내의 모든 알려진 상동성 단백질들에서의 상기의 양이 이러한 두번째 매개변수로 이용된다.
- <190> 따라서, 본 발명의 방법의 바람직한 구현예는 상기 자연발생적 알레르겐이 기원하는 종 내에 모든 알려진 상동성 단백질들에서 70% 이상, 바람직하기는 80% 이상, 가장 바람직하기는 90% 이상 유지된, 동정된 아미노산 잔기를 선택하는 것을 특징으로 한다.
- <191> 게다가, 본 발명의 방법의 특히 바람직한 구현예는 상기 자연 발생한 알레르겐이 기원한 종 내에서 모든 기지의 상동성 단백질들에서의 보존의 정도와 관련된 상기 동정된 아미노산 잔기를 평가하고 및 더 잘 보존된 것들 중에서 1 이상의 아미노산을 치환하는 것을 특징으로 한다.

- <192> 본 발명의 방법의 더 바람직한 구현에는 상기 자연발생적 알레르겐과 본질적으로 동일한 α -탄소 골격의 3차 구조를 갖는 돌연변이 알레르겐을 형성하는, 동정된 아미노산을 선택하는 것으로 구성된다.
- <193> 본 발명의 방법의 다른 바람직한 구현에는 아미노산 잔기의 치환이 부위지정 돌연변이유발에 의하여 행하여지는 것을 특징으로 한다.
- <194> 본 발명의 방법의 선택적인 바람직한 실시에는 아미노산 잔기들의 치환이 DNA 서플링에 의해 행하여지는 것을 특징으로 한다.
- <195> 치환의 기준
- <196> 3차 구조가 결정된 분자들에 대해서(예를 들어 X-선 결정법, 또는 NMR 전자현미경에 의해), 치환된 아미노산을 갖고 있는 돌연변이체는 바람직하기는 다음 기준들을 충족시켜야 한다 :
- <197> 1. 분자의 전체적인 α -탄소 골격의 3차 구조는 바람직하기는 유지된다. 유지된다는 것은 2Å 미만의 구조들을 비교한 원자 좌표의 평균적인 제곱근평균제곱 편차로 정의된다. 이는 두가지 이유에서 중요하다 즉: a) 천연 알레르겐의 전체 표면은 잠재적인 항체-결합 에피토프의 중첩되는 연속체를 구성하는 것으로 예상된다. 분자 표면의 대부분은 치환(들)에 의해 영향받지 않으므로 항체 결합을 유도하는 성질을 유지하는 데, 이는 천연 알레르겐에도 존재하는 에피토프를 향한 새로운 방어 항체 특이성의 생성에 중요하다. b) 유효기간 및 체액에 대한 주입과 관련된 안정성.
- <198> 2. 치환된 아미노산은 바람직하기는 표면에 위치해 있어서 항체-결합에 접근가능하다. 3차원적인 구조에서 표면에 위치한 아미노산들은 대개 적어도 20%, 바람직하기는 20~80%, 더욱 바람직하기는 30~80%의 용매(물) 접근성을 갖는다. 용매 접근성은 용매(물, $r=1.4\text{\AA}$) 분자와 균등한 반지름을 갖는 구에 접근 가능한 분자의 면적으로 정의된다.
- <199> 3. 각각의 치환된 아미노산은 바람직하기는 400\AA^2 보다 큰 면적을 갖는 보존된 패치에 위치한다. 보존된 패치는 표면 노출된 아미노산 잔기 및 골격의 밀착적으로 연결된 부분으로 정의된다. 보존된 아미노산 잔기들은 동일한 분류학적인 종, 속, 아과, 과, 상과, 속아목, 목 내의 상동적인 단백질들의 모든 기지의(추론된) 아미노산 서열의 서열 정렬에 의해 정의된다. 서열의 70% 이상에서 동일한 아미노산 서열을 갖는 아미노산 위치는 보존된 것으로 간주된다. 보존된 패치는 대부분 개체의 IgE가 목표하는 에피토프를 포함하는 것으로 예측된다.
- <200> α -탄소 골격의 3차 구조의 보존은 돌연변이생성 전후의 X-선 결정법이나 NMR에 의해 동일한 구조를 얻음으로써 가장 잘 결정된다. 돌연변이체를 기술하는 구조적 자료가 없는 경우, 구별불가능한 CD-스펙트럼 또는 항체 반응성 같은 면역화학적 자료는, 구조적으로 결정된 분자의 분석에 의해 얻어진 자료와 비교된다면, α -탄소 골격의 3차 구조의 보존이라고 볼 수 있을 것이다.
- <201> 4. 보존된 패치 내에서 돌연변이생성에 관한 아미노산들은 바람직하기는 보존된 패치의 중심 부근에 위치한 것에 접근할 수 있는 대부분의 용매(물) 중에서 우선적으로 선택되어진다.
- <202> 5. 우선적으로, 극성 아미노산 잔기는 다른 극성 잔기에 의해 치환되며, 비극성 아미노산 잔기는 다른 비극성 잔기로 치환된다.
- <203> 알레르겐의 3차원적 구조를 본질적으로 보유하기 위한 목적으로, 통합되는 아미노산은, 예를 들어 단백질과 같은 알레르겐과 구조적 상동체이고, 알레르겐과 동일한 분류학적인 목에 속하고, 알레르겐과 어떠한 교차-반응성도 갖지 않는 단백질의 비교를 근거로 선택될 것이다.
- <204> 본 발명에 따른 DNA
- <205> 바람직한 실시예에서, 본 발명의 DNA 서열은 자연발생적 알레르겐을 코드화하는 DNA 서열의 유도체이다. 바람직하기는, DNA 유도체는 자연발생적 알레르겐을 코드화하는 DNA의 특정부위 또는 랜덤 돌연변이발생에 의해 얻어진다.
- <206> 첫번째 특히 바람직한 구현예에서, DNA 서열은 도3에 나타난 서열의 유도체이며, 그 DNA 서열은

K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, D-125, R-145, D-109, E-127, Q-36, E-131, L-152, E-6, E-96, D-156, P-63, H-76, E-8, K-134, E-45, T-10, V-12, K-20, S-155, H-126, P-50, N-78, K-119, V-2, L-24, E-42, N-4, A-153, I-44, E-138, G-61, A-130, R-70, N-28, P-35, S-149, K-103, Y-150, H-154, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141, E-87, E-73

<207>

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 4개의 돌연변이를 갖는 알레르겐을 코드화하도록 돌연변이화되었다.

<208>

두번째 특히 바람직한 구현예에서, DNA 서열은 도13에 나타난 서열의 유도체이며, 그 DNA 서열은

<209>

K-16, K-185, K-11, K-44, K-210, R-63, K-13, F-6, K-149, K-128, E-184, K-112, F-157, E-3, K-29, N-203, N-34, K-78, K-151, L-15, L-158, Y-102, W-186, K-134, D-87, K-52, T-67, T-125, K-150, Y-40, Q-48, L-65, K-81, Q-101, Q-208, K-144, N-8, N-70, H-104, Q-45, K-137, K-159, E-205, N-82, A-111, D-131, K-24, V-36, N-7, M-138, T-209, V-84, K-172, V-19, D-56, P-73, G-33, T-106, N-170, L-28, T-43, Q-114, C-10, K-60, N-31, K-47, E-5, D-145, V-38, A-127, D-156, E-204, P-71, G-26, Y-129, D-141, F-201, R-68, N-200, D-49, S-153, K-35, S-39, Y-25, V-37, G-18, W-85 및 I-182

<210>

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 4개의 돌연변이를 갖는 알레르겐을 코드화하도록 돌연변이화되었다.

<211>

세번째 특히 바람직한 구현예에서, DNA 서열은 도16에 나타난 서열의 유도체이며, 그 DNA 서열은

<212>

R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109 및 R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15

<213>

으로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 4개의 돌연변이를 갖는 알레르겐을 아호화하도록 돌연변이화되었다.

<214>

DNA 서플링

<215>

본 발명에 따른 재조합 돌연변이 알레르겐은 상응하는 천연 DNA의 DNA 서플링 (분자 육종, molecular breeding)에 의해 만들어질 것이다. DNA 서플링은 본 참고문헌에 의해 모두 포함되어 있는 언급된 문헌에 기재된 절차 뿐만 아니라 Punnonen 등(참고문헌 25)에 의한 문헌에 기재된 절차에 의해 수행될 수 있다.

<217>

진단적 검사법

<218>

게다가, 본 발명에 따른 재조합 돌연변이 알레르겐은 진단적인 가능성 및 이점을 갖고 있다. 선행 기술에서 알레르기 백신은 자연발생적인 알레르겐 소스의 추출물에 기초하고, 따라서 매우 다양한 아이소폼(isoform)을 나타낸다. 알레르기 체질의 개인은 처음에 감작되고 현존하는 1 이상의 아이소폼에 대한 IgE를 갖는다. 아이소폼의 일부는 개인이 알레르기를 보이는 아이소폼과의 상동관계 및 그에 수반되는 교차-반응성 때문에 알레르기 체

질의 개인의 알레르기 반응에 대하여 관계가 있는 반면, 다른 아이소폼들은 알레르기 체질의 개인이 갖고 있는 특이적 IgE에 대한 IgE 결합 에피토프를 갖고 있지 않기 때문에 무관할 것이다. IgE 집단의 특이성의 이 이중성 때문에, 몇몇 아이소폼들은 IgE를 통해 알레르기 반응을 보이지 않으므로 투여하기에 안전한 반면, 다른 아이소폼들은 바람직하지 않은 부작용을 야기하므로 위험할 수 있다.

<219> 따라서, 치료학적으로 투여될 예정인 본 발명의 돌연변이체 및 조성물은 상기 돌연변이체 또는 구성으로의 치료에 대한 타당성, 안전성 또는 결과를 모니터하는 생체 내 또는 생체 외 진단학적 분석에도 이용될 수 있다. 적용되는 진단학적인 샘플은 혈청 같은 인체 샘플을 포함한다.

<220> 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 제조합 돌연변이 알레르겐이나 조성물을 이용한 개체의 치료의 타당성, 안전성 또는 결과를 평가하는 진단학적인 분석과도 관련이 있는 데, IgE를 포함하는 개체의 샘플을 상기 돌연변이체 또는 구성물과 혼합하고 상기 샘플 및 돌연변이체에서 IgE간의 반응성의 수준이 평가된다. 샘플 및 돌연변이체에서의 IgE 사이에 반응성의 수준을 평가하는 것은 기지의 면역적분석법을 이용해 수행될 것이다.

<221> 정의

<222> 본 발명과 관련하여 "상기 자연발생적 알레르겐의 IgE 결합 능력과 비교해서 특이적 IgE 결합능력의 감소"라는 표현은, 상기 감소가 자연발생적 알레르겐에 대한 알레르기를 갖는 개체로부터 얻어진 혈청을 이용하여 적어도 한 가지 이상의 면역학적 분석에서 통계학적으로 유의적인 방식으로($p < 0.05$) 측정가능하다는 것을 의미한다. IgE 결합 능력은 바람직하기는 적어도 5%, 더 바람직하기는 적어도 10% 감소된다.

<223> "표면에 노출된 아미노산"이란 표현은 아미노산 잔기가, 알레르겐이 용액 중에서 적어도 아미노산 잔기 한 원자의 적어도 한 부분이 주위의 용매와 접촉에서 접근가능한 방식으로 3차원적인 구조의 표면에 위치하고 있는 것을 의미한다. 바람직하기는, 3차원적인 구조에서 아미노산 잔기는 적어도 20%, 적절하게는 적어도 30%, 더 적절하게는 적어도 40%, 가장 바람직하기는 적어도 50%의 의 용매(물)접근성을 갖는다.

<224> "용매 접근성"이란 표현은 한 개의 용매(물, $r=1.4\text{\AA}$) 분자에 견줄만한 반지름을 갖는 구에 접근가능한 분자의 면적으로 정의된다.

<225> "표면-노출된" 및 "용매-노출된"이란 표현은 호환성 있게 사용된다.

<226> "상기 자연 발생적인 알레르겐이 기원한 분류학적인 종"은 분류학적인 체계에서 종을 의미한다.

<227> 나아가, "상기 자연 발생적 알레르겐과 본질적으로 동일한 α -탄소 골격의 3차 구조를 갖는 상기 돌연변이 알레르겐"은, 구조를 비교했을 때 원자 좌표의 평균 제곱평균제곱근 표준편차가 2Å미만인 것을 의미한다.

<228> 본 발명과 관련하여 "치환"이란 표현은 자연발생적 알레르겐의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산의 결실, 치환 또는 첨가를 의미한다.

<229> 실시예

<230> 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 더 설명될 것이다.

<231> 실시예 1

<232> 실시예 1은 1개 및 3개의 1차 돌연변이를 갖는 제조합 돌연변이 알레르겐의 제조를 기술하고 있다. 본 발명에 따른 제조합 돌연변이 알레르겐, 즉 적어도 4개의 1차 돌연변이를 포함하고 있는 알레르겐은 동일한 공정을 통해 제조될 것이다.

<233> Fagales 꽃가루 알레르겐 내의 일반적인 에피토프의 동정

<234> 대부분의 자작나무 꽃가루 알레르겐 Bet v 1은 분류학적으로 연관된 나무, 즉 *Fagales* (예를 들어 개암나무, 서나무) 꽃가루의 주된 알레르겐과 약 90%의 아미노산 서열의 동일성을 보이며, 자작나무 꽃가루에 알레르기를 보이는 개체들은 종종 이들 Bet v 1과 상동적인 단백질에 대해 알레르기성 교차-반응성의 임상적 증상을 종종 보인다.

<235> Bet v 1은 또한 특정 과일 (예를 들어 사과 및 체리) 및 야채 (예를 들어 샐러리 및 당근)에 존재하는 알레르기성 단백질들과 약 50~60%의 서열 동일성을 보이며, Bet v 1과 이들 과일과 연관된 단백질들 사이에 알레르기성 교차-반응성에 대한 임상적인 증거가 있다.

<236> 게다가, Bet v 1은 발병-연관 단백질(PR-10)로 불리는 식물 단백질 군과 상당한 서열 동일성 (20~40%)을 공유하

지만, 이들 PR-10 단백질에 대한 알레르기성 교차-반응성에 대한 보고는 없다.

- <237> 분자 모델링은 *Fagales*, 식품 알레르겐 및 PR-10 단백질의 구조가 Bet v 1 구조와 동일에 가깝하다는 것을 제시한다.
- <238> 알레르기성 Bet v 1 교차 반응성에 대한 구조적 기초는 (Gajhede et al 1993, 참고 17)에 Bet v 1 의 분자 표면에 있는 세 개의 패치가 알려진 주요 나무 꽃가루 알레르겐에 대해 공통적으로 동정될 수 있다고 보고되어 있다. 따라서, Bet v 1의 이들 패치를 인식하는 어떤 IgE는 다른 *Fagales* 주요 꽃가루 알레르겐과 교차-반응 및 결합하여 알레르기 증상을 유발할 수 있다. 이들 공통된 패치의 동정은 참고문헌 17에서 보고된 α-탄소 골격의 3차 구조에 의해 밝혀진 Bet v 1의 분자 표면의 분석과 함께, 주된 나무 꽃가루 알레르겐의 모든 기지의 아미노산 서열의 정렬 후에 행해졌다. 그 외에, 패치들은 항체 결합으로 덮이는 부분에 기초한 특성의 최소 크기(>400Å)를 갖는 것으로 밝혀졌다.
- <239> 부위-특이적 돌연변이유발을 위한 아미노산 잔기의 선택
- <240> 부위-특이적 돌연변이유발을 위한 아미노산 잔기는, 이들의 변형이 임상적인 나무 꽃가루 알레르기성 교차-반응성을 보이는 대다수 개체들로부터의 혈청 IgE의 결합에 영향을 미치는 것으로 예상되기 때문에, Bet v 1 특이적 부분 및 공통적인 패치에 존재하는 잔기들 중에서 선택되었다.
- <241> 각각의 패치 내의 각 아미노산 잔기들의 용매-노출의 상대적인 방향성 및 백분율은 그들의 원자 좌표에 기초하여 계산하였다. 용매 노출의 정도가 낮은(<20%) 잔기들은 구조의 가능한 붕괴나 항체 상호작용의 결여 때문에 돌연변이와 연관이 없는 것으로 간주 되었다. 나머지 잔기들은 그들의 용매-노출의 정도에 따라 등급을 매겼다.
- <242> 서열 정렬
- <243> 본 서열(Bet v 1 No. 2801, 알레르겐에 대한 WHO IUIS 명명 분과위원회)에 상동적인 서열은 BLAST 조사 (Altschul et al., ref. 18)에 의한 GenBank 및 EMBL 서열 데이터베이스로부터 얻어졌다. 0.1 이하의 가능성이 보고된 BLAST를 갖는 모든 서열들이 고려되었고, 과다하지않은 상동성 서열의 목록을 함유하는 하나의 목록이 작성되었다. 이들은 CLUSTAL W (Higgins et al., 참고 19)에 의해 정렬되었고, 동일성 백분율은 완전한 목록 또는 분류학적으로 관련된 종만을 고려한 서열에서 각 위치에 대해 계산되었다. 122 서열 모두는 57 서열들이 분류학적으로 관련된 종으로부터 기원한 Bet v 1 No. 2801과 상동적이다.
- <244> Bet v 1을 코드화하는 유전자의 클로닝
- <245> RNA는 페놀 추출 및 LiCl 침전에 의해 *Betula verrucosa* 꽃가루(Allergon, Sweden)로부터 만들어졌다. 올리고(dT)-셀룰로스 친화성 크로마토그래피가 에펜도르프 튜브에서 배치 양식으로(batch-wise) 시행되었고, 이중 가닥 cDNA는 시판되는 키트(Amersham)를 이용하여 합성되었다. 요컨대, PCR은 주형으로서의 cDNA와, 각각 Bet v 1의 아미노 말단 및 3'-비번역 부분에 상응하는 위치에서 cDNA 서열과 매치되도록 고안된 프라이머를 사용하여 수행되었다. 프라이머들은 pKK233-2로의 특정적 클로닝을 위한 제한효소 부위(NcoI 및 HindIII)에 상응하도록 5'-말단에서 연장되었다.
- <246> pMAL-c로의 서브클로닝
- <247> Bet v 1을 코드화하는 유전자는 순차적으로 말토스 결합 단백질 융합 벡터 pMAL-c (New England Biolabs)로 서브클론 되었다. 유전자는 PCR에 의해서 증폭되고 malE가 있는 프레임으로 서브클론 되어서, MBP 및 Bet v 1이 참고문헌 15에 기재된 바와 같이 분열에 의해 Bet v 1의 진정한 아미노말단 서열을 복구하도록 위치된 팩터 Xa 프로테아제 분할부위에 의해 분리된 말토스 결합 단백질 (MBP)-Bet v 1단백질 융합 오피론을 생성하였다. 요컨대, PCR은 주형으로서 삽입된 Bet v 1을 갖는 pKK233-3 및 각각, 단백질의 아미노- 및 카르복시 말단에 대응하는 프라이머를 사용하여 수행되었다. 프로모터 인접 프라이머는 프레임 내 팩터 Xa 프로테아제 분열부위를 코드화하는 4개의 코돈을 수용하기 위해 5'-말단에서 연장되었다. 두 프라이머는 클로닝을 위한 제한부위 (KpnI)를 수용하기 위해 5'-말단에서 더욱 연장되었다. Bet v 1 코드화 유전자는 PCR 인공산물의 빈도를 감소시키기 위해 PCR 20 사이클을 이용해 서브클로닝하였다.
- <248> 생체의 돌연변이유발
- <249> 생체의 돌연변이유발은 주형으로서 삽입된 Bet v 1을 갖는 재조합 pMAL-c를 이용한 PCR에 의해 행해졌다. 각 돌연변이 Bet v 1 유전자는 4개의 프라이머를 이용한 3회의 PCR 반응으로 생성되었다.
- <250> 두개의 돌연변이-특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각 돌연변이, 즉 각각의 DNA 가닥에 하나의 돌연변이

를 수용하도록 합성되었다(참고:도 1 및 2). 출발점으로서 돌연변이된 뉴클레오티드(들)을 이용하여 두 프라이머는 5'-말단에서는 7개 뉴클레오티드가, 3'-말단에서는 15개의 뉴클레오티드가 연장되었다. 연장된 핵산은 실제 부위에서 Bet v 1 유전자에 대한 서열에서 동일하였다.

- <251> 두개의 일반적으로 적용가능한 프라이머 (도 2에서 "모두 센스" 및 "모두 넌센스"로 표시된)가 추가로 합성되었고 모든 돌연변이체에 사용되었다. 이들 프라이머들은 15 핵산 길이이며 Bet v 1로부터 상류 및 하류의 약 1 킬로베이스의 pMAL-c 벡터의 부분의 서열과 상응한다. 상류 프라이머의 서열은 센스 가닥으로부터, 하류 프라이머의 서열은 넌센스 가닥으로부터 유도되었다(도 2 참고).
- <252> 두 독립적인 PCR 반응들이 PCR 인공산물의 빈발을 감소시키기 위해 단지 20 온도 사이클만 수행된 것을 제외하고는 본질적으로 표준 방법(Saiki et al 1988, 참고 20)에 따라 시행되었다. 각 PCR 반응은 주형으로서 삽입된 Bet v 1이 있는 pMAL-c 및 각각 하나의 돌연변이-특이한 및 일반적으로 적용가능한 프라이머를 이용하였다.
- <253> 삼중-패치 돌연변이체에서 4개의 아미노산 치환(Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly)의 도입은 단계적으로 상기와 같이 수행되었다. 첫번째 Glu45Ser 돌연변이, 그리고 나서 Pro108Gly 돌연변이 그리고 마지막으로 Asn28Thr, Lys32Gln 돌연변이가 주형으로 각각, Bet v 1 No. 2801, Bet v 1 (Glu45Ser), Bet v 1 (Glu45Ser, Pro108Gly)가 삽입된 pMAL-C를 이용하여 도입되었다.
- <254> PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동 및 전기-용출로 정제하고 에탄올로 침전시켰다. 세번째 PCR 반응은 주형으로서 처음 두 PCR 반응으로부터의 결합 PCR 산물들과 및 일반적으로 적용가능한 프라이머를 사용하여 수행되었다. 즉, 표준 PCR 20 사이클이 이용되었다. PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동 및 전기-용출로 정제된 뒤 에탄올로 침전시키고, 제한효소(BsiWI/EcoRI)로 절단하고, 동일한 효소로 제한된 삽입된 Bet v 1을 갖는 pMAL-c에 방향성 있게 연결되었다.
- <255> 도3은 다음과 같은 Thr10Pro, Asp25Gly, Asn28Thr + Lys32Gln, Glu45Ser, Asn47Ser, Lys55Asn, Glu60Ser(비-패치), Thr77Ala 및 Pro108Gly의 모두 9 Bet v 1 돌연변이의 개관을 보여준다. 또한 4개의 돌연변이를 갖는 추가적인 돌연변이체 (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly)가 제조되었다. 이들 중, 5개의 돌연변이체가 다음 실험을 위해 선택되었다: Asn28Thr + Lys32Gln, Glu45Ser, Glu60Ser, Pro108Gly 및 삼중-패치 돌연변이 Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly.
- <256> 뉴클레오티드 서열화
- <257> 유전자를 코드화하는 Bet v 1의 핵산 서열의 결정은 서브클로닝 전후 및 생체의 돌연변이유발 후 각각 수행되었다.
- <258> 0.1g/ℓ 암피실린으로 보충된 LB 배지에서 하룻밤 포화되도록 배양한 세균 배양액 10ml로부터의 플라스미드 DNA의 것은 Qiagen-tip 20 컬럼으로 정제되고 공급자의 추천에 따른 Sequenase version 2.0 DNA 분석 키트(USB)를 이용하여 분석하였다.
- <259> 제조합 Bet v 1 및 돌연변이체의 발현 및 정제
- <260> 제조합 Bet v 1 (Bet v 1 No. 2801 및 돌연변이체)은 말토스-결합 단백질에 융합된 Escherichia coli DH 5a에서 과발현되었고, 참고문헌 15에 기술된 대로 정제되었다. 요컨대, 제조합 E. coli 세포는 37°C에서 436nm에서 흡광도 1.0에 이를 때까지 배양되었고, 그 후에 Bet v 1 융합 단백질의 발현이 IPTG의 첨가로 유도되었다. 세포를 유도 3시간 후 원심분리로 수확하여, 세포용해 완충액 중에서 재-부유시킨 후 초음파처리로 분쇄하였다. 초음파 처리 및 부가적인 원심분리 후, 제조합 융합 단백질이 아밀로스 친화성 크로마토그래피에 의해 분리되었고 연이어 팩터 Xa와 배양하여 분할하였다. F Xa 분열 후에, 제조합 Bet v 1은 겔 여과에 의해 분리되었고, 필요하다고 여겨지면 미량의 말토스-결합 단백질을 제거하기 위해 한 번 더 아밀로스 친화성 크로마토그래피를 실시했다.
- <261> 정제된 제조합 Bet v 1은 한외여과(ultrafiltration)에 의해 약 5mg/ml까지 농축하고 4°C에서 저장하였다. 정제된 제조합 Bet v 1 조제물의 최종 수율은 E. coli 세포 배양 1리터당 2~5mg 사이 었다.
- <262> 정제된 제조합 Bet v 1 조제물은 17.5 kDa의 겔보기 분자량을 갖는 은-착색된 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동에서 단일 밴드로 나타났다. N-말단 분석은 cDNA 핵산 서열에서 유래된 대로 예상된 서열을 보였고, 정량적인 아미노산 분석은 예상된 아미노산 조성을 보였다.
- <263> 본 발명자들은 앞서 제조합 Bet v 1 No. 2801이 자연 발생한 Bet v 1으로부터 면역화학적으로 분간할 수 없음

을 살핀 바 있다(참고문헌 15).

- <264> 토끼 폴리클로날 항체를 이용한 면역전기영동법
- <265> 7개의 돌연변이 Bet v 1은 재조합 Bet v 1 단백질로 만들어졌고 상기 기술한 대로 정제된 후 자작나무 꽃가루에서 단리된 Bet v 1에 대해 만들어진 폴리클로날 토끼 항체에 대한 그들의 반응성이 시험되었다. 본래의 조건 하에서 면역전기영동법(로켓-라인 면역전기영동법)에 의해 분석하였을 때, 토끼 항체는 모든 돌연변이체를 침전시킬 수 있었고, 이는 돌연변이체가 보존된 α -탄소 골격의 3차 구조를 갖고 있다는 것을 나타낸다.
- <266> 인간의 폴리클로날 IgE-반응에 대한 영향을 분석하기 위해, 돌연변이체 Glu45Ser, Pro108Gly, Asn28Thr+Lys32Gln 및 Glu60Ser을 다음 분석을 위해 선택하였다.
- <267> Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체
- <268> 위치 45의 글루탐산은 높은 정도의 용매-노출(40%)을 보이며 *Fagales* 알레르겐 (패치I)에 일반적인 분자 표면 패치 내에 위치한다. 세린 잔기는, 글루탐산이 α -탄소 골격의 3차 구조의 변형 없이 세린에 의해 대체될 수 있음을 주장하면서 Bet v 1 상동성 PR-10 단백질의 몇몇에서 위치 45를 차지하는 것으로 밝혀졌다. 게다가, 알려진 *Fagales* 이소알레르겐(isoallergen) 서열의 어떤 것도 45 위치에 세린을 갖고 있지 않으므로, 글루탐산의 세린으로의 치환은 비-자연발생적 Bet v 1 분자를 낳는다.
- <269> 재조합 Glu45Ser Bet v 1 돌연변이체를 이용한 T 세포 증식 검사법
- <270> 분석은 Spanfort et al 1996a에서 기술된 대로 수행되었다. 재조합 Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체는 재조합 및 자연 발생한 것과 유사한 자극 지수를 갖는 3명의 다른 자작나무 꽃가루에 알레르기를 보이는 개체로부터의 T 세포주에서 증식을 야기할 수 있었다는 것이 발견되었다.
- <271> 재조합 Glu45Ser Bet v 1의 결정화 및 구조 결정
- <272> 재조합 Glu45Ser Bet v 1 결정은 25°C에서, 특히 Sangfort et al 1996b, 참고 21에서 기술된 대로 본질적으로 증기 확산에 의해 성장되었다. 5mg/ml 농도에서 Glu45Ser Bet v 1은 pH 6.0에서 같은 부피의 2.0M 황산 암모늄, 0.1M 시트르산 나트륨, 1%(v/v) 다이옥산과 혼합하고, pH 6.0에서 100배 부피의 2.0M 황산 암모늄, 0.1M 시트르산 나트륨, 1%(v/v) 다이옥산에 대해 평형을 이루었다. 평형 24시간 후 결정의 성장은, 씨드 원으로서 재조합 야생형 Bet v 1의 결정을 이용해, 참고문헌 21에 기술된 씨딩(seeding) 기술을 적용하여 유도되었다.
- <273> 약 2개월 후, 결정을 모아서 참고 21에 기술된 대로 Rigaku 회전 양극에서 발생한 X-선을 이용하여 분석하였고, 그 구조는 분자 치환을 이용해 용해되었다.
- <274> Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체의 구조
- <275> 돌연변이의 구조적 효과는 회전 양극으로부터 발생된 X-선에 의해 분석되었을 때 3.0Å 해상도로 회절된 3차원적인 Bet v 1 Glu45Ser 단백질 결정의 성장에 의해 설명된다. 위치 45에서 글루탐산의 세린으로의 치환은 총 α -탄소 골격의 3차 구조가 보존된 것을 또한 보여주는 Bet v 1 Glu45Ser 구조 전자 밀도 지도에 의해 증명되었다.
- <276> Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체의 IgE 결합 성질
- <277> Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이의 IgE 결합 성질은 자작나무에 알레르기가 있는 개체로부터의 혈청 IgE 울혈을 이용한 액상 IgE 억제 분석에서 재조합 Bet v 1과 비교되었다.
- <278> 재조합 Bet v 1 no. 2801은 1:5의 물비(Bet v 1 no. 2801 : 비오틴)로 비오틴화하였다. 저해 검사법은 다음과 같이 수행되었다: 혈청 샘플(25 μ l)을 고체상 항-IgE과 배양하고, 세척하고, 재-부유시킨 후 이어 비오틴화된 Bet v 1 no. 2801(3.4nM) 및 주어진 돌연변이체 (0~28.6 nM)의 혼합물과 배양하였다. 고형상에 결합한 비오틴화된 Bet v 1 no. 2801의 양은 아크리디늄 에스테르 표지된 스트렙타비딘과 배양한 후 측정된 RLU로부터 계산되었다. 저해의 정도는 완충액과 저해제로서의 돌연변이체를 이용하여 얻어진 RLU 간의 비로 계산되었다.
- <279> 도 4는 비오틴화 되지 않은 Bet v 1 및 Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체에 알레르기를 보이는 개체들 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합의 저해를 나타낸다.
- <280> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE에 대한 결합의 50% 저해에 도달하는 데 필수적인 각각의 재조합 단백질의 양에서 명확한 차이가 있다. 재조합 Bet v 1은 약 6.5ng에서 50%의 저해에 달하는 반면 그에 상응하는 Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체의 농도는 약 12ng이었다. 이는 Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체에서 도입된 점 돌연변이가 약 2의 인자로 특이적인 혈청 IgE의 친화성을 감소시키는 것을 보여준다. Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이체에 의해 얻

어진 저해의 최고 수준은 재조합 Bet v 1에 비하여 명확히 더 낮다. 이는 Glu45Ser 치환 후, 혈청 울혈에 존재하는 특이한 IgE의 일부는 Bet v 1 Glu45Ser 돌연변이를 인식할 수 없다는 것을 알려주고 있다.

- <281> Asn28Thr+Lys32Gln Bet v 1 돌연변이체
- <282> 28 및 32 위치에서의 아스파르트산 및 리신 각각은 높은 용매-노출 정도(각각 35% 및 50%)를 보이며 *Fagales* 알레르겐에서 일반적인 분자 표면 패치(패치 II)에 위치하고 있다. 구조에서, 아스파르트산 28 및 리신 32는 분자 표면에서 서로 가깝게 위치하고 있으며 가장 유사하게는 수소결합을 통해 상호작용한다. 트레오닌과 글루탐산 잔기는 각각 α -탄소 골격의 3차 구조의 변형 없이 아스파르트산과 리신이 트레오닌과 글루탐산으로 치환될 수 있다고 주장하는 Bet v 1에 상동적인 PR-10 단백질의 일부에서 각각 28 및 32 위치를 차지하고 있는 것이 밝혀졌다. 더우기, 자연발생적 이소알레르겐(isoallergen) 서열은 각각 28 및 32 위치에 트레오닌과 글루탐산을 갖고 있지 않기 때문에, 치환은 비-자연적으로 발생한 Bet v 1 분자를 만든다.
- <283> Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln의 IgE-결합 성질
- <284> 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln의 IgE-결합 성질은 상기 기술한 자작나무에 알레르기를 보이는 개체로부터 얻은 혈청 IgE의 울혈을 이용한 액상 IgE-저해 검사법에서 재조합 Bet v 1과 비교되었다.
- <285> 도 5는 비오틴화되지 않은 Bet v 1과 Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln에 의해 알레르기 반응을 보이는 개체들의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합의 저해를 나타낸다.
- <286> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE에 대한 결합의 50% 저해에 도달하기 위해 필요한 각각의 재조합 단백질의 양에서 현저한 차이가 있다. 재조합 Bet v 1은 약 6.5ng에서 50%의 저해에 달하는 반면 Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln의 그에 상응하는 농도는 약 12ng이었다. 이는 Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln에서 도입된 점 돌연변이가 약 2배로 특이적인 혈청 IgE의 친화성을 감소시키는 것을 보여준다.
- <287> Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln에 의해 얻어진 억제체의 최고 수준은 재조합 Bet v 1에 비하여 명확히 더 낮다. 이는 Asn28Thr+Lys32Gln 치환 후, 혈청 울혈에 존재하는 특이한 IgE의 몇몇은 Bet v 1 돌연변이체 Asn28Thr+Lys32Gln를 인식할 수 없다는 것을 알려준다.
- <288> Bet v 1 돌연변이체 Pro108Gly
- <289> 108 위치의 프롤린은 높은 용매-노출 정도 (60%)를 보이며 *Fagales* 알레르겐에 대한 일반적인 분자 표면 패치(패치III) 내에 위치한다. 글리신 잔기는 α -탄소 골격의 3차 구조의 변형 없이 프롤린이 글리신에 의해 대체될 수 있다고 주장되는 Bet v 1 상동성 PR-10 단백질의 몇몇에서 위치 108을 차지하는 것으로 밝혀졌다. 게다가, 자연발생적인 너도밤나무 이소알레르겐 서열의 어떤 것도 위치 108에 글리신을 갖고 않기 때문에, 프롤린의 글리신으로의 치환은 비-자연발생적 Bet v 1 분자를 낳는다.
- <290> Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체의 IgE 결합 성질
- <291> Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체의 IgE 결합 성질은 상기의 자작나무에 알레르기가 있는 개체로부터의 혈청 IgE 울혈을 이용한 액상 IgE 저해 검사법에서 재조합 Bet v 1과 비교되었다.
- <292> 도 6은 비오틴화 되지 않은 Bet v 1 및 Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체에 의한 알레르기를 보이는 개체들 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합의 저해를 나타낸다.
- <293> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE에 대한 결합의 50% 저해에 도달하는 데 필수적인 각각의 재조합 단백질의 양에서 명확한 차이가 있다. 재조합 Bet v 1은 약 6.5ng에서 50%의 저해에 달하는 반면, Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체의 그에 상응하는 농도는 약 15ng이었다. 이는 Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체에서 도입된 하나의 점 돌연변이가 약 2배로 특이적인 혈청 IgE의 친화성을 감소시키는 것을 보여준다.
- <294> Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체에 의해 얻어진 저해의 최고 수준은 재조합 Bet v 1에 견주어 다소 더 낮다. 이는 Pro108Gly 치환 후, 혈청 울혈에 존재하는 특이한 IgE의 몇몇은 Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체를 인식할 수 없다는 것을 알려주고 있다.
- <295> Bet v 1 돌연변이체 Glu60Ser (비-패치 돌연변이체)
- <296> 60위치의 글루탐산은 높은 용매-노출 정도 (60%)를 보이지만, *Fagales* 알레르겐에 대한 일반적인 분자 표면 패치 내에 위치하지 않는다. 세린 잔기는 α -탄소 골격의 3차 구조의 변형 없이 글루탐산이 세린에 의해 대체될 수 있다고 주장되는 Bet v 1 상동성 PR-10 단백질의 몇몇에서 위치 60를 차지하는 것으로 밝혀졌다. 게다가,

자연발생하는 이소알레르겐 서열의 어떤 것도 위치 60에 세린을 갖고 있기 때문에, 글루탐산의 세린으로의 치환은 비-자연적으로 발생한 Bet v 1 분자를 만든다.

- <297> Bet v 1 Glu60Ser 돌연변이체의 IgE 결합 성질
- <298> Bet v 1 Glu60Ser 돌연변이체의 IgE 결합 성질은 상기의 자작나무에 알레르기가 있는 개체로부터의 혈청 IgE 울혈을 이용한 액상 IgE 저해 검사법에서 재조합 Bet 1과 비교되었다.
- <299> 도 7은 비오틴화 되지 않은 Bet v 1 및 Bet v 1 Glu60Ser 돌연변이체에 의해 알레르기를 보이는 개체들 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합의 억제를 나타낸다. Glu45Ser, Pro108Gly 및 Asn28Thr+Lys32Gln 돌연변이체와 대조적으로, 글루탐산 60의 세린으로의 치환은 그 IgE-결합 성질에 어떤 유의성 있는 영향을 보이지 않았다. 이는, 보존된 알레르겐 분자 표면 영역이 우세한 IgE-결합 에피토프를 갖고 있다는 생각을 지지하여, 정의된 *Fagales* 일반적인 패치의 외부에서 치환은 특이적인 혈청 IgE의 결합에 근소한 효과를 미칠 뿐이라는 것을 알려준다.
- <300> Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체
- <301> 삼중-패치 돌연변이체에서, 상기 세 다른 일반적인 *Fagales* 패치에 도입된 점 돌연변이 (Glu45Ser, Asn28Thr+Lys32Gln 및 Pro108Gly)는 네 아미노산 치환을 수행하는 인공 돌연변이체를 만드는 데 있어 동시에 도입되었다.
- <302> Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체의 구조적 분석
- <303> 정제된 삼중-패치 돌연변이의 구조적 완전성(integrity)이 원형이색성(circular dichroism, CD) 분광분석법에 의해 분석되었다. 도8은 동일 농도 부근에서 기록된 재조합 및 삼중-패치 돌연변이의 CD 스펙트럼을 보여준다. 두 재조합 단백질로부터의 CD 스펙트럼에서 진폭 및 위치에서의 중첩은 α-탄소 골격의 3차 구조는 도입된 아미노산 치환에 영향받지 않는다는 것을 제시하여 두 조제물이 동일한 양의 2차 구조를 포함하고 있다는 것을 말해준다.
- <304> Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체의 IgE-결합 성질
- <305> Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체의 IgE 결합 성질은 상기의 자작나무에 알레르기가 있는 개체로부터의 혈청 IgE 울혈을 이용한 액상 IgE 저해분석법에서 재조합 Bet 1과 비교되었다.
- <306> 도 9는 비오틴화 되지 않은 Bet v 1 및 Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체에 의해 알레르기를 보이는 개체들 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합의 저해를 나타낸다. 상기 단일 돌연변이체와 대조적으로, 삼중-패치 돌연변이체의 저해 곡선은 재조합체와 더 이상 평행적인 관계가 아니었다. 이는 삼중-패치 돌연변이체에 도입된 치환이 재조합에 비교시 IgE-결합 성질 및 에피토프 프로필을 변화시켰다는 것을 보여준다. 평행성의 결여는 특이적인 혈청 IgE에 대한 삼중-패치 돌연변이 친화성 감소를 정량하는 것을 어렵게 만든다.
- <307> 재조합 Bet v 1은 약 6ng에서 50%의 억제에 달하는 반면 Bet v 1 삼중-패치 돌연변이의 그에 상응하는 농도는 30ng, 즉 5배로 친화성이 감소하였다. 그러나, 80% 억제에 도달하기 위해 그에 상응하는 값은 각각 20ng 및 400 ng, 즉 20배의 감소이다.
- <308> 재조합 Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체를 이용한 T 세포 증식 검사법
- <309> 분석은 참고문헌 15에 기술된 대로 수행되었다. 재조합 Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체는 재조합 및 자연 발생한 것과 유사한 자극 지수를 갖는 세 다른 자작나무 꽃가루에 알레르기를 보이는 개체로부터의 T 세포주에서 증식을 야기할 수 있었다는 것이 발견되었다. 이는 삼중-패치 돌연변이는 항체 생성에서 필수적인 세포적 면역 반응을 개시할 수 있다는 것을 암시한다.
- <310> **실시예 2**
- <311> 실시예 2는 하나의 1차적인 돌연변이를 갖는 재조합 돌연변이 알레르겐의 제조를 기술한다. 본 발명에 따른 재조합 돌연변이 알레르겐, 즉 적어도 4개의 1차 돌연변이를 포함하는 알레르겐은 동일한 방법을 통해 만들어질 것이다.
- <312> *Vespula vulgaris* 독의 주된 알레르겐 항원 5 내의 공통적인 에피토프의 동정
- <313> 항원 5는 3개의 말벌 독 단백질의 하나이며, 이들은 사람에게 알레르겐으로 알려져 있다. 말벌류는 호박벌, 옐로우-자켓(yellow-jacket), 장수말벌을 포함한다. 말벌 독의 다른 두개의 알려진 알레르겐은 포스포리파제 A1

및 히알루로니다제이다. *Vespula vulgaris*의 항원 5(Ves v 5)는 클론되고 효모 시스템(Monsalve et al. 1999, 참고 22)에서 재조합 단백질로 발현된다. 재조합 Ves v 5의 3차원적인 결정 구조는 (조제물에서) 1.8Å 해상도에서 확인되었다. 구조의 주된 모습은 세 쌍인 층으로 정렬된 β-가닥 및 네 α-나선으로 구성되어 "α-β-α 샌드위치"로 된다. 다른 *Vespula* 종으로부터 항원 5 상동적인 알레르겐 사이의 서열 동일성은 약 90%로 보존된 분자 표면 영역 및 B 세포 에피토프의 존재를 제안한다.

- <314> 공통적인 패치들의 존재 및 동정은, 상기 나무 꽃가루 알레르겐에서와 같이, Ves v 5의 3차원적인 구조에 의해 밝혀진 항원 5의 분자 표면의 분석과 함께 땅벌 항원 5 알레르겐의 모든 알려진 아미노산 서열들의 정렬 후에 수행되었다. 도10은 개별적으로 정렬된 항원 5 잔기의 용매접근성과 *Vespula* 항원 5 서열 (왼쪽 패널)의 서열 정렬을 나타낸다. 도 10의 오른쪽 패널에서는 *Vespula* 항원 5 사이의 채색된 보존부분을 갖는 항원 5의 분자 표면을 나타낸다.
- <315> 부위-특이적 돌연변이 유발을 위한 아미노산의 선택
- <316> 부위-특이적 돌연변이유발을 위한 아미노산 잔기는 이들 변형이 임상적으로 땅벌에 알레르기성 교차반응을 보이는 대부분의 개체들로부터의 혈청 IgE의 결합에 영향을 미치는 것으로 예상되기 때문에 *Vespula* 에 일반적인 패치에 존재하는 잔기들 가운데서 선택되었다.
- <317> 각각의 패치 내의 각 아미노산 잔기의 용매-노출의 상대적인 방향성 및 백분율은 그들의 원자 좌표에 기초하여 계산되었다. 용매 노출의 정도가 낮은 잔기들은 구조의 변형 가능성 또는 항체 상호작용 결여 때문에 돌연변이 유발에 적절한 것으로 간주되지 않았다. 나머지 잔기들은 그들의 용매-노출의 정도에 따라 등급을 매겼다.
- <318> Ves v 5를 코드화하는 유전자의 클로닝
- <319> 총 RNA를 (Fang et al. 1998, 참고. 23)에 기술된 대로 *Vespula vulgaris* 말벌의 독선으로부터 분리하였다.
- <320> 첫-가닥 cDNA합성, PCR 증폭 및 Ves v 5 유전자의 클로닝을 (Lu et al. 1993, 참고 24)에 기술된 대로 수행하였다.
- <321> pPICZ αA로의 서브클로닝
- <322> Ves v 5를 코드화하는 유전자는 *Pichia pastoris*에서 Ves v 5의 분비된 발현을 위해 pPICZ αA 벡터 (인비트로젠)로 순차적으로 서브클론되었다. 유전자는 PCR에 의해 증폭되고 *Saccharomyces cerevisiae*의 α-팩터 분비 신호에 대한 서열을 코드화하는 프레임에 서브클론되었다. 이 구조 내에서 α-팩터가 생체내에서, 단백질이 분비되는 동안 *Pichia pastoris* Kex2 프로테아제 시스템에 의해 분할된다.
- <323> 간단히 PCR은 주형으로서의 Ves v 5 및 각 단백질의 아미노-및 카르복시 말단에 상응하는 프라이머를 이용해서 수행되었다. 프라이머들은 클로닝에 대한 각각의 EcoRI 및 XbaI 제한 효소 자리를 수용하도록 5'-말단에 연장되었다. Kex2 분열부위를 코드화하는 뉴클레오티드가 구조 내에서 단백질의 아미노 말단 상류 18 핵산에 위치하여, 아미노 말단에서 6개의 추가적인 아미노산, Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Phe를 가진 Ves v 5를 발현시키는 결과를 가져온다.
- <324> pPICZ αA-Ves v 5의 *P. pastoris*로의 삽입
- <325> 삽입된 Ves v 5 유전자를 가진 pPICZ αA 벡터는 Sac I 제한으로 선형화되고 *Pichia pastoris* 계놈의 AOX1 위치에 삽입되었다. 삽입은 Invitrogen의 권고에 따라 *Pichi pastoris* KM71 세포들에 상동성 재조합에 의해 수행되었다.
- <326> 생체의 돌연변이 유발
- <327> 생체의 돌연변이유발은 주형으로 삽입된 Ves v 5를 갖는 재조합 pPICZ αA 를 이용한 PCR에 의해 수행되었다. 각 돌연변이체 ves v 5 유전자는 4개의 프라이머를 이용한 3PCR 반응에 의해 만들어졌다.
- <328> 두개의 돌연변이-특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머는, 각 DNA 가닥에 대해 하나씩인, 각 돌연변이에 상응하게 합성되었다(도11 및 12 참고). 출발점으로서 돌연변이된 핵산(들)을 이용하여 두 프라이머는 5'-말단에서는 6~7개 핵산이, 3'-말단에서는 12~13개의 핵산이 연장되었다. 연장된 핵산은 서열에서 실제 부위의 Ves v 5 유전자와 동일하였다.
- <329> 두개의 일반적으로 적용가능한 프라이머 (도12에서 "모두 센스" 및 "모두 년센스"로 표시된)들이 더 합성되었고, 모든 돌연변이체에 이용되었다. 진정한 아미노 말단을 갖는 Ves v 5 돌연변이체들의 발현을 확실

히하기 위해, 단백질의 아미노 말단에 상응하는 하나의 프라이머가 Xho I 부위를 갖는 5'-말단에서 연장되었다. pPICZ αA 벡터로 Ves v 5 돌연변이체 유전자의 삽입시, Kex2 프로테아제 분열 부위는 Ves v 5 아미노 말단의 바로 상류에 다시 만들어졌다. 두번째 프라이머는 Ves v 5 유전자로부터 하류방향으로 약 300bp에 위치하고 있는 pPICZ αA 벡터 부위에 대한 서열에 상응한다. Ves v 5의 아미노 말단에 상응하는 프라이머 서열은 센스 가닥으로부터 유도되고 하류의 프라이머 서열은 안센스 가닥으로부터 유도되었다(도11 참고).

- <330> 두개의 독립적인 PCR 반응들이 PCR 인공산물의 빈도를 감소시키기 위해 단지 20회 온도 사이클만 수행된 것을 제외하고는 본질적으로 표준 방법(Saiki et al 1988)에 따라 시행되었다. 각 PCR 반응은 주형으로서 Ves v 5가 삽입된 pPICZ αA 및 하나의 돌연변이 특이적인 프라이머 및 하나의 일반적으로 적용가능한 프라이머를 의미있게 조합하여 이용하였다.
- <331> PCR 산물들은 "Concert, Rapid PCR Purification System" (Life Technologies)를 이용해 정제되었다. 세번째 PCR 반응은 주형으로서의 처음 두 PCR 반응의 PCR 산물과 두 일반적으로 적용가능한 프라이머를 이용해 행해졌다. 즉, 표준 PCR 20 사이클이 이용되었다. PCR 산물은 "Concert, Rapid PCR Purification System" (Life Technologies)을 이용해 정제되고, 제한효소(XhoI/XbaI)로 절단된 후, 동일한 효소로 제한된 pPICZ αA 벡터로 방향성있게 연결되었다. 도13은 모든 Ves v 5 돌연변이의 개관을 보여준다.
- <332> P.pastoris로의 pPICZ αA-Ves v 5 돌연변이체의 삽입
- <333> Ves v 5 돌연변이체 유전자를 삽입한 pPICZ αA 벡터를 Sac I 제한효소에 의해 선형화하고, *Pichia pastoris* 계놈상의 AOX1 좌위로 삽입하였다. 삽입은 Invitrogne의 권장사항에 따라 *Pichia pastoris* KM71 세포 상에서 상동적 제조함에 의해 수행하였다.
- <334> 뉴클레오티드 서열화
- <335> Ves v 5를 코드화하는 유전자의 뉴클레오티드 서열의 결정은 서브클로닝 전후 및 그 다음에 각각 생체의 돌연변이 유발을 행하였다.
- <336> 0.1g/l 암피실린이 보충된 LB 배지에서 밤새 성장하여 포화된 10ml의 박테리아성 배양균으로부터 나온 플라즈미드 DNA를 Qiagen-tip 20 칼럼 상에서 정제하고, 공급자의 권장에 따라 Sequenase 버전 2.0 DNA 서열화 키트(USB)를 사용하여 서열화 하였다.
- <337> 제조함 Ves v 5의 발현 및 정제
- <338> *Pichia pastoris* 균주 KM71의 제조함 효모 세포를, 효모 질소 염기, 비오틴, 글리세롤 및 히스티딘을 함유하는 pH 6.0의 100ml 인산염 완충액을 담고 있는 500ml 병에서 4-6의 A₆₀₀ nm가 될 때까지 30℃에서 225 rpm으로 진탕 배양하였다. 세포들을 원심분리로 수집하고, 글리세롤 대신 메탄올을 함유한 10ml의 유사 완충 배지 내에서 재현탁하였다. 매일 0.05ml의 메탄올을 첨가하며 7일 동안 30℃에서 계속하여 배양하였다.
- <339> 원심분리로 세포를 수집하고, 수집된 배양액을 한외여과로 농축하였다. pH 4.6의 50mM 아세트산암모늄 완충용액에 대해 투석한 후, 동일한 완충액에서 평형을 이루고 있는 FPLC(Pharmacia) SE-53 양이온 교환 칼럼에 상기 샘플을 적용하였다. 상기 칼럼을 0 ~ 1.0 M NaCl, 50 mM 아세트산암모늄 선형 구배로 용출하였다. 약 0.4 M NaCl에서 용출하는 제조함체 Ves v 5 피크를 수집하고, 0.02 N 아세트산에 대해 투석하였다. 약 10mg/ml로 농축한 후, 정제된 Ves v 5를 4℃에서 보관하였다.
- <340> 제조함 Ves v 5의 결정화
- <341> Ves v 5의 결정을 증기 확산 기법으로 25℃에서 성장시켰다. 결정화를 위해, 5mg/ml Ves v 5 5μl를 18% PEG 6000 5μl와 pH 6.0의 0.1M 시트르산나트륨과 혼합하고, 18% PEG 6000 1ml와 pH 6.0의 0.1M 시트르산나트륨에 대해 평형이 되도록 하였다.
- <342> X선 회절 데이터를 100K에서 천연 Ves v 5 결정, 및 중원자 유도체와 결합 후에 수집하고, Ves v 5의 3차원 구조를 해결하기 위해 사용하였다. 도 10(제조시 사본)을 참조하십시오.
- <343> 토끼 폴리클로날 항체를 사용한 면역전기영동
- <344> 제조함 Ves v 5 단 백질로서 두개의 Ves v 5 돌연변이체를 생성하고, 제조함 Ves v 5에 대하여 발생한 폴리클로날 토끼 항체에 대한 반응성을 시험하였다. 천연 조건하에 로켓(rocket) 면역전기영동으로 분석했을때, 토끼 항체는 제조함 Ves v 5뿐만 아니라 돌연변이체 둘 다를 침전시킬 수 있었고, 이것은 돌연변이체가 α-탄소 골격

의 3차 구조를 유지한다는 것을 나타낸다.

- <345> 특이적 혈청 IgE의 저해
- <346> 말벌 독 알레르기 개체로부터 유도된 혈청 IgE의 울혈을 사용한 유체-상 IgE-저해 검사법에서 Ves v 5 돌연변이체의 IgE-결합 특성을 재조합 Ves v 5와 비교하였다.
- <347> 저해 검사법(inhibition assay)은 상기한 바와 같이 Bet v 1 대신에 비오틴화된 재조합 Ves v 5를 사용하여 수행하였다.
- <348> Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체
- <349> 72 위치에서 리신(lysine)은 고수준의 용매-노출(70%)를 나타내고, Vespula 항원 5에 공통적인 분자 표면 패치(patch)에 위치한다. 상대적인 배향 및 고수준의 용매 노출은 리신 72이 α-탄소 골격의 3차 구조의 변형없이 알라닌(alanine) 잔기에 의해 치환될 수 있다는 것을 나타낸다. 부가적으로, 자연 발생한 어떤 이소알레르겐 서열의 어떤 것도 72 위치에서 알라닌을 갖지 않기 때문에, 리신의 알라닌으로의 치환은 비-자연발생적 Ves v 5 분자를 발생시킨다.
- <350> Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체의 IgE-결합 성질
- <351> 상기한 자작나무 알레르기 개체로부터 유도된 혈청 IgE의 울혈을 사용한 유체상의 IgE-저해 검사법에서 Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체의 IgE-결합 성질을 재조합 Ves v 5와 비교하였다.
- <352> 도 14는 비-비오틴화된 Ves v 5 및 Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체에 의해 비오틴화된 재조합 Ves v 5의 알레르기 개체의 울혈에서 유래한 혈청 IgE에 대한 결합 저해를 나타낸다.
- <353> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE에 대한 50% 결합 저해에 도달하기 위해 필요한 각각의 재조합 단백질의 양에 명백한 차이가 존재한다. 재조합 Ves v 5는 약 6ng에서 50% 저해에 도달하는 반면, Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체의 경우에 상응하는 농도는 40ng이다. 이것은 Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체 내에 도입된 하나의 점 돌연변이가 특이적 혈청 IgE에 대해 친화성을 약 6배 감소시킨다는 것을 나타낸다. Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체에 의해 도달되는 저해의 최대 수준은 재조합 Ves v 5에 비해 현저하게 낮아진다. 이것은 Lys72Ala 치환 후, 혈청 울혈 내에 존재하는 일부 특이적 IgE는 Ves v 5 Lys72Ala 돌연변이체를 인지할 수 없다는 것을 나타낸다.
- <354> Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체
- <355> 96 위치의 티로신은 고수준의 용매-노출(65%)을 나타내고, Vespula 항원 5에 공통적인 분자 표면 패치에 존재한다. 상대적인 배향 및 고수준의 용매 노출은 티로신 96이 3차원 구조의 변형없이 알라닌 잔기로 치환될 수 있다는 것을 나타낸다. 부가적으로, 자연 발생한 어떤 이소알레르겐 서열의 어떤 것도 96 위치에서 알라닌을 갖지 않기 때문에, 티로신의 알라닌으로의 치환은 비-자연 발생 Ves v 5 분자를 발생시킨다.
- <356> Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체의 IgE-결합 성질
- <357> 상기한 자작나무 알레르기 개체로부터 유도된 혈청 IgE의 울혈을 사용하여 유체상의 IgE-저해 검사법에서 Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체의 IgE-결합 성질을 재조합 Ves v 5와 비교하였다.
- <358> 도 14는 비-비오틴화된 Ves v 5 및 Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체에 의한 비오틴화된 재조합 Ves v 5의 알레르기 개체의 울혈에서 유래한 혈청 IgE에 대한 결합 저해를 나타낸다.
- <359> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE와의 결합에 대하여 50% 저해에 도달하기 위해 필요한 각각의 재조합 단백질의 양에 명백한 차이가 존재한다. 재조합 Ves v 5는 약 6ng에서 50% 저해에 도달하는 반면, Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체의 경우에 상응하는 농도는 40ng이다. 이것은 Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체 내에 도입된 하나의 점 돌연변이는 특이적 혈청 IgE에 대해 친화성을 약 6배 낮추는 것을 나타낸다.
- <360> Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체에 도입된 하나의 점 돌연변이가 특이적 혈청 IgE에 대한 친화성을 6배 낮춘다.
- <361> Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체에 의해 도달되는 저해의 최대 수준은 재조합 Ves v 5에 비해 현저하게 낮아진다. 이것은 Tyr96Ala 치환 후, 혈청 울혈 내에 존재하는 일부 특이적 IgE는 Ves v 5 Tyr96Ala 돌연변이체를 인지할 수 없다는 것을 나타낸다.
- <362> **실시예 3**
- <363> 치환을 위한 아미노산의 동정 및 선택

<364> 알레르겐 Bet v 1, Der p 2 및 Ves v 5를 치환하기에 적합한 표면-노출된 아미노산을 동정하고 선택하기 위해 용매 접근성 및 보존 정도의 매개변수를 사용하였다.

<365> 용매 접근성

<366> 버전 97.0 InsightII (MSI) 소프트웨어 및 반경 1.4Å의 프로브(Connolly surface)를 사용하여 용매 접근성을 계산하였다.

<367> 소프트웨어 PASS(Putative Active Sites with Spheres)를 사용하여 프로브를 충전함에 의해서 분석에서 내부 공동을 제외하였다. 다음에 표면상의 프로브를 수동으로 제거하였다.

<368> 보존

<369> Bet v 1:

<370> 3차원 구조는 수탁 번호 Z80104(1bv1.pdb)에 기초한 것이다.

<371> 보존된 잔기의 분석에 포함된 38개의 다른 Bet v 1 서열은 다음의 접근 번호로 이루어진다:

P15494=X15877=Z80106, Z80101, AJ002107, Z72429, AJ002108, Z80105, Z80100, Z80103, AJ001555, Z80102, AJ002110, Z72436, P43183=X77271, Z72430, AJ002106, P43178=X77267, P43179=X77268, P43177=X77266, Z72438, P43180=X77269, AJ001551, P43185=X77273, AJ001557, Z72434, AJ001556, Z72433=P43186, AJ001554, X81972, Z72431, P45431=X77200, P43184=X77272, P43176=X77265, S47250, S47251, Z72435, Z72439, Z72437, S47249.

<372>

<373> Der p 2:

<374> 3차원 구조는 접근 번호 P49278(1a9v.pdb)에 기초한 것이다.

<375> 보존된 잔기의 분석에 포함된 6개의 다른 Der p 2 서열은 다음의 치환체를 포함한다:

ALK-G: V40L, T47S, M111L, D114N.
 ALK-101: M76V.
 ALK-102: V40L, T47S.
 ALK-104: T47S, M111I, D114N.
 ALK-113: T47S.
 ALK-120: V40L, T47S, D114N.

<376>

<377> Ves v 5:

<378> 3차원 구조는 접근 번호 Q05110(pdb 좌표는 미공개)에 기초한 것이다.

<379> 보존된 잔기의 분석에 있어 또 다른 Ves v 5 서열은 하나의 아미노산 치환체, M202K 를 포함한다.

<380> 결과

<381> Bet v 1

<382> 고도로 용매 노출된 59개의 아미노산:

K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, D-125, R-145, D-109, T-77, E-127, Q-36, E-131, L-152, E-6, E-96, D-156, P-63, H-76, E-8, K-134, E-45, T-10, V-12, K-20, L-62, S-155, H-126, P-50, N-78, K-119, V-2, L-24, E-42, N-4, A-153, I-44, E-138, G-61, A-130, R-70, N-28, P-35, S-149, K-103, Y-150, H-154, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141, E-87, E-73.

<383>

<384> 고도로 용매 노출되고 보존된(>70%) 57개의 아미노산:
 K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, D-125, R-145, D-109, E-127, Q-36, E-131, L-152, E-6, E-96, D-156, P-63, H-76, E-8, K-134, E-45, T-10, V-12, K-20, S-155, H-126, P-50, N-78, K-119, V-2, L-24, E-42, N-4, A-153, I-44, E-138, G-61, A-130, R-70, N-28, P-35, S-149, K-103, Y-150, H-154, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141, E-87, E-73.

<385>
 <386> 실행된 23개의 돌연변이:

Y5V, T10P, D25E, N28T, K32Q, E42S, E45S, N47S, K55N, K65N, T77A, N78K, E96L, K97S, K103V, P108G, D109N, K123I, D125Y, K134E, R145E, D156H, +160N.

<387>
 <388> 표 1은 Bet v 1 아미노산의 용매 노출을 내림차순으로 나열한 것을 나타낸다. 1 열은 아미노-말단에서 시작하는 아미노산 번호를 나열한 것이고, 2 열은 한글자로 약자로 아미노산을 나열한 것이고, 3열은 표준화한 용매 노출 지수를 나타낸 것이고, 그리고 4 열은 그 위치에서 관련된 아미노산을 갖는 주지된 서열의 퍼센트를 나열한 것이다.

<389>

표 1

Bet v 1

NO	AA	Solv_exp	Cons %
	129K	1,000	90
	60E	0,986	97
	47N	0,979	100
	65K	0,978	100
	108P	0,929	100
	159N	0,869	100
	93D	0,866	100
	123K	0,855	100
	32K	0,855	100
	125D	0,821	74
	145R	0,801	90
	109D	0,778	82
	77T	0,775	56
	127E	0,760	100
	36Q	0,749	95
	131E	0,725	100
	152L	0,718	97
	6E	0,712	100
	96E	0,696	100
	156D	0,693	97
	63P	0,692	97
	76H	0,683	90
	8E	0,638	97
	134K	0,630	100
	45E	0,623	100
	10T	0,613	97
	12V	0,592	100
	20K	0,584	100
	62L	0,575	5
	155S	0,568	97
	126H	0,551	95
	50P	0,541	100
	78N	0,538	100
	119K	0,529	100
	2V	0,528	100
	24L	0,528	100
	42E	0,519	100
	4N	0,517	95
	153A	0,513	100
	44I	0,508	97
	138E	0,496	100
	61G	0,488	100

<390>

130A	0,479	97
70R	0,474	100
28N	0,469	90
35P	0,467	100
149S	0,455	92
103K	0,447	100
150Y	0,438	100
154H	0,436	100
43N	0,412	100
106A	0,411	95
115K	0,411	100
14P	0,410	97
5Y	0,410	100
137K	0,396	100
141E	0,387	95
87E	0,385	100
73E	0,384	100
16A	0,367	100
79F	0,362	100
3F	0,355	100
158Y	0,346	100
105V	0,336	100
101E	0,326	100
64F	0,325	100
86I	0,322	100
39S	0,314	100
124G	0,310	100
72D	0,308	97
142T	0,293	67
66Y	0,289	100
55K	0,288	100
7T	0,279	67
40S	0,274	95
25D	0,271	87
135A	0,267	92
68K	0,262	100
97K	0,247	100
46G	0,235	100
27D	0,232	97
1G	0,227	100
113I	0,225	77
51G	0,220	100
92G	0,218	100
80K	0,212	100
110G	0,211	100
107T	0,203	85
94T	0,202	92
41V	0,201	97
48G	0,198	100
91I	0,192	18
31P	0,188	100
75D	0,188	97
33V	0,183	100

49G	0,176	100
17R	0,172	100
99S	0,158	64
89G	0,154	100
53I	0,154	100
121H	0,153	100
9T	0,150	72
74V	0,148	97
132Q	0,146	72
57S	0,137	49
148E	0,135	100
82N	0,133	41
128V	0,125	64
117S	0,124	87
90P	0,117	67
116I	0,112	100
122T	0,107	100
139M	0,104	62
95L	0,104	97
54K	0,096	100
146A	0,095	100
59P	0,088	97
157A	0,088	100
133V	0,077	44
88G	0,068	100
140G	0,053	85
37A	0,042	95
81Y	0,041	100
23I	0,036	95
104I	0,036	92
15A	0,036	97
58F	0,029	100
29L	0,028	100
19F	0,027	100
100N	0,022	97
22F	0,021	97
71V	0,014	100
111G	0,014	100
13I	0,014	100
18L	0,014	97
114L	0,014	100
11S	0,007	100
151L	0,007	97
144L	0,007	90
52T	0,007	100
84S	0,007	97
118N	0,007	97
102I	0,007	100
21A	0,000	97
26G	0,000	97
30F	0,000	44
34A	0,000	100
38I	0,000	87

<392>

56I	0,000	100
67V	0,000	97
69D	0,000	62
83Y	0,000	95
85V	0,000	72
98I	0,000	95
112S	0,000	77
120Y	0,000	95
136S	0,000	67
143L	0,000	100
147V	0,000	100

<393>

<394> Der. p. 2

<395> 고도로 용매 노출된 55개의 아미노산:
 R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, D-114, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15.

<396>
 <397> 고도로 용매 노출되고 보존된(>70%) 54개의 아미노산:
 R-128, D-129, H-11, H-30, S-1, K-77, Y-75, R-31, K-82, K-6, K-96, K-48, K-55, K-89, Q-85, W-92, I-97, H-22, V-65, S-24, H-74, K-126, L-61, P-26, N-93, D-64, I-28, K-14, K-100, E-62, I-127, E-102, E-25, P-66, L-17, G-60, P-95, E-53, V-81, K-51, N-103, Q-2, N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15.

<398>
 <399> 실행된 6개의 돌연변이:

<400> **K6A, K15E, H30N, E62S, H74N, K82N**

<401> 표 2는 Der p 2 아미노산의 용매 노출을 내림차순으로 나열한 것을 나타낸다. 1열은 아미노-말단에서 시작하는 아미노산 번호를 나열한 것이고, 2열은 한글자의 약자로 아미노산을 나열한 것이고, 3열은 표준화한 용매 노출 지수를 나타낸 것이고, 그리고 4열은 그 위치에서 관련된 아미노산을 갖는 주지된 서열의 퍼센트를 나열한 것이다.

<402>

표 2

Der p 2

NO	AA	Solv_exp	Cons %
	128R	1,000	100
	129D	0,965	100
	11H	0,793	100
	30H	0,712	100
	1S	0,700	100
	77K	0,694	100
	75Y	0,681	100
	31R	0,677	100
	82K	0,658	100
	6K	0,645	100
	96K	0,643	100
	48K	0,642	100
	55K	0,641	100
	89K	0,627	100
	85Q	0,624	100
	92W	0,610	100
	97I	0,581	100
	22H	0,568	100
	65V	0,559	100
	24S	0,557	100
	74H	0,542	100
	126K	0,542	100
	61L	0,539	100
	26P	0,516	100
	93N	0,513	100
	64D	0,509	100
	28I	0,504	100
	14K	0,493	100
	100K	0,489	100
	62E	0,454	100
	127I	0,439	100
	102E	0,428	100
	25E	0,428	100
	66P	0,427	100
	114D	0,418	57
	17L	0,412	100
	60G	0,390	100
	95P	0,388	100
	53E	0,377	100
	81V	0,377	100
	51K	0,370	100
	103N	0,369	100
	2Q	0,366	100
	46N	0,360	100
	42E	0,357	100

<403>

91T	0,340	100
87D	0,334	100
10N	0,333	100
111M	0,325	71
8C	0,323	100
124H	0,315	100
68I	0,313	100
79P	0,307	100
109K	0,307	100
15K	0,302	100
49T	0,292	100
44N	0,291	100
113D	0,290	100
63V	0,286	100
105V	0,280	100
19P	0,270	100
84Q	0,264	100
76M	0,262	86
7D	0,251	100
116V	0,244	100
78C	0,238	100
36Q	0,235	100
45Q	0,233	100
40V	0,223	57
57S	0,212	100
38E	0,205	100
69D	0,203	100
9A	0,196	100
71N	0,190	100
98A	0,186	100
115G	0,180	100
13I	0,179	100
123T	0,179	100
34P	0,178	100
4D	0,157	100
20G	0,150	100
107T	0,143	100
12E	0,137	100
94V	0,137	100
121I	0,136	100
83G	0,128	100
70P	0,128	100
73C	0,120	100
3V	0,116	100
35F	0,111	100
59D	0,099	100
29I	0,098	100
23G	0,085	100
54I	0,075	100
5V	0,075	100
101S	0,074	100
72A	0,069	100
27C	0,060	100

32G	0,059	100
99P	0,058	100
86Y	0,056	100
16V	0,052	100
50A	0,040	100
90Y	0,039	100
18V	0,035	100
33K	0,033	100
52I	0,029	100
58I	0,029	100
104V	0,024	100
112G	0,023	100
21C	0,023	100
88I	0,023	100
117L	0,016	100
56A	0,011	100
41F	0,011	100
120A	0,006	100
119C	0,006	100
67G	0,005	100
122A	0,005	100
37L	0,000	100
39A	0,000	100
43A	0,000	100
47T	0,000	29
80L	0,000	100
106V	0,000	100
108V	0,000	100
110V	0,000	100
118A	0,000	100
125A	0,000	100

<405>

<406> Ves v 5

<407> 고도로 용매 노출된 89개의 아미노산:

K-16, K-185, K-11, K-44, K-210, R-63, K-13, F-6, K-149, K-128, E-184, K-112, K-202, F-157, E-3, K-29, N-203, N-34, K-78, K-151, L-15, L-158, Y-102, W-186, K-134, D-87, K-52, T-67, T-125, K-150, Y-40, Q-48, L-65, K-81, Q-101, Q-208, K-144, N-8, N-70, H-104, Q-45, K-137, K-159, E-205, N-82, A-111, D-131, K-24, V-36, N-7, M-138, T-209, V-84, K-172, V-19, D-56, P-73, G-33, T-106, N-170, L-28, T-43, Q-114, C-10, K-60, N-31, K-47, E-5, D-145, V-38, A-127, D-156, E-204, P-71, G-26, Y-129, D-141, F-201, R-68, N-200, D-49, S-153, K-35, S-39, Y-25, V-37, G-18, W-85, I-182.

<408>

<409> 고도로 용매 노출되고 보존된(>70%) 88개의 아미노산:

K-16, K-185, K-11, K-44, K-210, R-63, K-13, F-6, K-149, K-128, E-184, K-112, F-157, E-3, K-29, N-203, N-34, K-78, K-151, L-15, L-158, Y-102, W-186, K-134, D-87, K-52, T-67, T-125, K-150, Y-40, Q-48, L-65, K-81, Q-101, Q-208, K-144, N-8, N-70, H-104, Q-45, K-137, K-159, E-205, N-82, A-111, D-131, K-24, V-36, N-7, M-138, T-209, V-84, K-172, V-19, D-56, P-73, G-33, T-106, N-170, L-28, T-43, Q-114, C-10, K-60, N-31, K-47, E-5, D-145, V-38, A-127, D-156, E-204, P-71, G-26, Y-129, D-141, F-201, R-68, N-200, D-49, S-153, K-35, S-39, Y-25, V-37, G-18, W-85, I-182.

<410>

<411> 실행된 9개의 돌연변이:

<412> K29A, T67A, K78A, V84S, Y102A, K112S, K144A, K202M, N203G

<413> 표 3은 Ves v 5 아미노산의 용매 노출을 내림차순으로 나열한 것을 나타낸다. 1열은 아미노-말단에서 시작하는 아미노산 번호를 나열한 것이고, 2열은 한글자의 약자로 아미노산을 나열한 것이고, 3열은 표준화한 용매 노출

지수를 나타낸 것이고, 그리고 4열은 그 위치에서 관련된 아미노산을 갖는 주지된 서열의 퍼센트를 나열한 것이다.

<414> 표 3

Ves v 5

NO	AA	Solv_exp	
	16K	1,000	100
	185K	0,989	100
	11K	0,978	100
	44K	0,978	100
	210K	0,962	100
	63R	0,956	100
	13K	0,951	100
	6F	0,868	100
	149K	0,868	100
	128K	0,857	100
	184E	0,841	100
	112K	0,824	100

<415>

202K	0,824	50
157F	0,819	100
3E	0,802	100
29K	0,797	100
203N	0,797	100
34N	0,775	100
78K	0,775	100
151K	0,753	100
15L	0,714	100
158L	0,714	100
102Y	0,687	100
186W	0,665	100
134K	0,654	100
87D	0,621	100
52K	0,615	100
67T	0,610	100
125T	0,610	100
150K	0,604	100
40Y	0,593	100
48Q	0,593	100
65L	0,593	100
81K	0,588	100
101Q	0,577	100
208Q	0,566	100
144K	0,560	100
8N	0,555	100
70N	0,549	100
104H	0,549	100
45Q	0,538	100
137K	0,538	100
159K	0,533	100
205E	0,511	100
82N	0,500	100
111A	0,500	100
131D	0,495	100
24K	0,489	100
36V	0,489	100
7N	0,484	100
138M	0,473	100
209T	0,473	100
84V	0,462	100
172K	0,451	100
19V	0,445	100
56D	0,445	100
73P	0,440	100
33G	0,429	100
106T	0,429	100
170N	0,429	100
28L	0,423	100
43T	0,423	100
114Q	0,423	100
10C	0,412	100
60K	0,407	100

<416>

31 N	0,396	100
47K	0,396	100
5E	0,390	100
145D	0,390	100
38V	0,379	100
127A	0,379	100
156D	0,379	100
204E	0,374	100
71P	0,363	100
26G	0,352	100
129Y	0,352	100
141D	0,341	100
201F	0,341	100
68R	0,335	100
200N	0,308	100
49D	0,302	100
153S	0,302	100
35K	0,297	100
39S	0,291	100
25Y	0,280	100
37V	0,280	100
18G	0,275	100
85W	0,275	100
182I	0,275	100
46E	0,264	100
126A	0,253	100
88E	0,247	100
76P	0,236	100
79N	0,236	100
124S	0,236	100
30P	0,231	100
123G	0,231	100
162H	0,231	100
183Q	0,231	100
12I	0,225	100
197P	0,225	100
130D	0,220	100
148P	0,214	100
180K	0,214	100
23C	0,209	100
75P	0,209	100
113Y	0,209	100
108R	0,203	100
188K	0,203	100
51L	0,198	100
59Q	0,198	100
121L	0,198	100
122T	0,198	100
154G	0,192	100
53E	0,170	100
72G	0,170	100
41G	0,165	100
86N	0,165	100

<417>

147N	0,165	100
173E	0,165	100
27S	0,159	100
94Q	0,159	100
187H	0,159	100
142E	0,154	100
64G	0,148	100
17G	0,143	100
133V	0,137	100
42L	0,121	100
155N	0,121	100
55N	0,115	100
91Y	0,115	100
69G	0,110	100
103G	0,110	100
198S	0,110	100
109D	0,093	100
207Y	0,082	100
96W	0,077	100
161G	0,077	100
140E	0,071	100
152F	0,071	100
80M	0,066	100
117Q	0,066	100
4A	0,060	100
32C	0,055	100
90A	0,055	100
206L	0,055	100
22A	0,049	100
110V	0,044	100
146Y	0,044	100
14C	0,038	100
9Y	0,033	100
62A	0,033	100
132P	0,033	100
57F	0,027	100
99Q	0,027	100
100C	0,027	100
199G	0,027	100
77A	0,022	100
105D	0,022	100
119V	0,022	100
20H	0,016	100
83L	0,016	100
120A	0,016	100
139W	0,016	100
176C	0,016	100
178S	0,016	100
181Y	0,016	100
95V	0,011	100
115V	0,011	100
116G	0,011	100
165Q	0,011	100

169A	0,011	100
189H	0,011	100
66E	0,005	100
74Q	0,005	100
89L	0,005	100
92V	0,005	100
98N	0,005	100
118N	0,005	100
168W	0,005	100
21T	0,000	100
50I	0,000	100
54H	0,000	100
58R	0,000	100
61I	0,000	100
93A	0,000	100
97A	0,000	100
107C	0,000	100
135L	0,000	100
136V	0,000	100
143V	0,000	100
160T	0,000	100
163Y	0,000	100
164T	0,000	100
166M	0,000	100
167V	0,000	100
171T	0,000	100
174V	0,000	100
175G	0,000	100
177G	0,000	100
179I	0,000	100
190Y	0,000	100
191L	0,000	100
192V	0,000	100
193C	0,000	100
194N	0,000	100
195Y	0,000	100
196G	0,000	100

<419>

<420> 실시예 4

<421> 본 실시예는 본 발명에 따른 재조합 돌연변이체 Bet v 1 알레르겐, 즉, 적어도 4개의 1차 돌연변이로 이루어지는 감소된 IgE-결합 친화성이 있는 알레르겐의 제조 및 특성화를 설명한다.

<422> Bet v 1의 부위-특이적 돌연변이 유발을 위한 아미노산 잔기의 선택

<423> Bet v 1의 아미노산 잔기의 용매 접근성은 실시예 3의 표 1에 나타나 있다. 아미노산 보존율은, Bet V 1.2801 야생형 아미노산 서열이 입력 서열로 사용되는 Blast 조사 상에서 ClustalW 알고리즘을 사용하여 ExPaSy Molecular Biology Server(<http://www.expasy.ch/>)에서 수행된 서열 정렬에 기초한 것이다. 상기 정렬은 Fagales목(Bet v 1: *Betula verrucosa*; car b 1: *Carpinus betulus*; Cor a 1: *Corylus avellana*; Aln g 1: *alnus glutinosa*) 내의 종에서 유래된 67개의 알레르겐 서열(39개의 Bet b 1 서열, 11개의 Car b 1 서열, 6개의 Cor a 1 서열 및 13개의 Aln g 1 서열)을 포함한다. 실시예에서 나타난 돌연변이화된 재조합 Bet v 1 알레르겐에 대하여, 치환을 위한 표적 잔기는 95% 이상의 아미노산 동일성에 기초하였다.

<424> 실시예 1에 기재된 바와 같이, 관련된 중에서 유래된 꽃가루 알레르겐 사이에 고수준의 용매-노출 및 고수준의 보존이 있는 아미노산 잔기를 부위-특이적 돌연변이 유발을 위해 선택하였다. 저수준의 용매 노출(<20%)을 갖는 잔기는 3차 구조의 붕괴의 가능성 또는 항체 상호작용의 결핍 때문에 돌연변이 유발에 적합한 것으로 간주되지 않았다.

<425> 도입된 잔기는 발병관련(PR-10) 단백질로 불리는 식물 단백질 군의 아이소폼 내에 상응하는 위치에 모두 존재하였다. 분자 모델링은 *Fagales* 알레르겐 및 PR-10 단백질의 3차 구조가 동일할 만큼 유사하다는 것을 나타낸다. Bet v 1은 PR-10 단백질과 현저한 서열 동일성(20-40%)을 공유한다. 그러나, 상기 PR-10 단백질에 대한 알레르기성의 교차-반응성에 대한 보고는 없다. 따라서, 고도로 보존되고 용매 노출된 Bet v 1에서 유래한 아미노산과 PR-10 단백질 내의 상응하는 위치의 아미노산과의 교환은 변형되지 않은 α-탄소 골격의 3차 구조가 있지만 감소된 IgE-결합 친화성이 있는 돌연변이화된 Bet v 1 단백질을 생성하게 된다.

<426> 생체의 돌연변이 유발

<427> 주형으로서 Bet v 1이 삽입된 재조합 pMAL-c를 사용하여 PCR에 의해 생체의 돌연변이 유발을 실행하였다. 5 내지 9의 1차 돌연변이로 이루어지는 재조합 돌연변이체 알레르겐의 제조는 단계 1 및 단계 2의 두 PCR 단계를 포함한다. 우선, 도 17의 (I)에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 상류 또는 하류 인접 돌연변이나 Bet v 1의 N-말단/C-말단 중의 하나를 조정하는 센스 및 안티-센스 올리고뉴클레오티드 프라이머와 함께 각 돌연변이를 조정하는 센스 및 안티-센스 돌연변이-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 Bet v 1.2801 또는 Bet v 1.2801 유도체의 연속적인 DNA 서열에 각각의 단일 돌연변이(또는, DNA 서열 중에 서로 근접하게 위치해 있다면 여러 돌연변이)를 삽입하였다. 그 다음에, PCR 반응(I)에서 유래된 PCR 생성물을 정제, 혼합하고, 도 17의 (II)에 개략적으로 나타낸 바와 같이 Bet v 1의 N-말단 및 C-말단을 조정하는 올리고뉴클레오티드 프라이머와 함께 추가적인 PCR 반응(II)을 위한 주형으로 사용하였다. 상기 PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동법 및 PCR 겔 정제(Life Technologies)에 의해 정제하고, 에탄올 침전하고, 제한 효소 (SacI/EcoRI) 또는 (SacI/XbaI)로 절단하고, 그리고, 동일한 효소로 제한된 pMAL-c로 특정부위에 결합하였다.

<428> 도 18은 합성된 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 5 내지 9의 1차 돌연변이가 있는 Bet v 1 돌연변이체의 구축을 위한 개략적인 예시를 나타낸다. 돌연변이화된 아미노산은 바람직하기는 실시예 3에 기재된 바와 같이, 고도로 용매 노출되고 보존되는 성질을 갖는 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되었다. 상기 Bet v 1 돌연변이체는 다음과 같은 1차 돌연변이 및 괄호 내에 표현된 2차 돌연변이이다:

돌연변이체 Bet v 1 (2628): Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu.

돌연변이체 Bet v 1 (2637): Ala16Pro, (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys103Thr, Pro108Gly, (Leu152Lys, Ala153Gly, Ser155Pro).

돌연변이체 Bet v 1 (2733): (Tyr5Val, Lys134Glu), (Asn28Thr, Lys32Gln), Glu45Ser, Lys65Asn, (Asn78Lys, Lys103Val), Lys97Ser, Pro108Gly, Arg145Glu, (Asp156His, +160Asn)

돌연변이체 Bet v 1 (2744): (Tyr5Val, Lys134Glu), (Glu42Ser, Glu45Ser), (Asn78Lys, Lys103Val), Lys123Ile, (Asp156His, +160Asn).

돌연변이체 Bet v 1 (2753): (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, (Glu96Leu, Lys97Ser), (Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser), Arg145Glu.

<429>

<430> 뉴클레오티드 서열화

<431> Bet v 1 코드화 유전자의 뉴클레오티드 서열의 결정은 서브클로닝 전후 및 다음의 생체의 돌연변이 유발에서 각각 수행하였다.

<432> 0.1g/ℓ 암피실린이 보충된 LB 배지에서 밤새 성장하여 포화된 10ml의 박테리아성 배양균으로부터 플라스미드

DNA를 Qiagen-tip 20 칼럼 상에서 정제하고, Perkin Elmer사의 Ready reaction dye terminator cycle sequencing kit 및 Fluorescence Sequencer AB PRISM 377을 사용하여 공급자의 권장에 따라 서열화하였다.

- <433> 제조합 Bet v 1 및 돌연변이체의 발현 및 정제
- <434> 참조 15에 기재된 바와 같이, 제조합 Bet v 1 (Bet v 1.2801 및 돌연변이체)을 말토스-결합 단백질과 융합된 Escherichia coli DH 5a 내에서 과잉-발현시키고, 정제하였다. 요약하면, 제조합 E.coli 세포를 37°C에서 광학 밀도가 600nm에서 0.8이 되도록 성장시키고, 여기에 Bet v 1 융합 단백질의 발현을 IPTG에 의해 유도하였다. 유도 3시간 후, 원심분리에 의해 세포를 수확하고, 용해 완충액 내에 재현탁시키고, 초음파로 분쇄하였다. 초음파 파괴 및 부가적인 원심분리 후, 제조합 융합 단백질을 아밀로스 친화성 크로마토그래피로 단리시키고, 그리고 나서, Factor Xa (참조 15)로 배양하여 분할하였다. F Xa 분할 후, 제조합 Bet v 1을 겔여과에 의해 단리시키고, 미량의 말토스-결합 단백질을 제거하기 위해 또 다른 아밀로스 친화성 크로마토그래피를 하였다.
- <435> 정제된 제조합 Bet v 1을 환외여과에 의해 약 5mg/ml로 농축하고, 4°C에서 보관하였다. 정제된 제조합 Bet v 1 조합물의 최종 수율은 E.coli 세포 배양액 1 리터 당 2-5mg 사이 이었다.
- <436> 상기 정제된 제조합 Bet v 1 조합물은 은-염색 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동법 후에 17.5 kDa의 겔보기 분자량을 갖는 단일 띠로 보였다.
- <437> 본 발명자들은 종전에 제조합 Bet v 1 No. 2801은 면역화학적으로 자연 발생 Bet v 1과 구별할 수 없다는 것을 나타내었다(참조 15).
- <438> Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체
- <439> 도 19는 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637)의 분자 표면에서 도입된 점 돌연변이를 나타낸다. 돌연변이체 Bet v 1 (2628)에서, 절반은 미변형으로 남겨두고 Bet v 1의 절반에 5개의 1차 돌연변이를 도입하였다. 돌연변이체 Bet v 1 (2637)에서, 첫번째 절반을 변화시키지 않고, 다른 절반에 5개의 1차 돌연변이 및 3개의 2차 돌연변이를 도입하였다. 이런 방식으로, 돌연변이체 Bet v 1 (2628) 및 돌연변이체 Bet v 1 (2637) 내의 돌연변이는 Bet v 1 표면의 서로 다른 절반에 각각 영향을 미친다.
- <440> 제조합 Bet v 1 (2628) 돌연변이체 단백질의 결정화 및 구조 결정
- <441> 제조합 Bet v 1 (2628)의 결정을, 기본적으로 (Spangfort et al 1996b, 참조 21)에 기재된 바와 같이, 증기 확산 기법으로 25°C에서 성장시켰다. 5mg/ml의 농도에서 Bet v 1 (2628)을 동일한 부피의 2.2M 황산암모늄, 0.1M 시트르산나트륨 및 pH 6.3의 1%(v/v) 다이옥산과 혼합하고, 100배 부피의 2.2M 황산암모늄, 0.1M 시트르산나트륨 및 pH 6.3의 1%(v/v) 다이옥산에 대해 평형이 되도록 하였다. 평형 24시간 후, 시드(seed) 원으로서 제조합 야생형 Bet v 1의 결정을 사용하여, 참조 21에 기재된 씨딩(seeding) 기술을 적용시켜 결정 성장을 유도하였다.
- <442> 약 4개월 후, 결정을 수확하고, 참조 21에 기재된 바와 같이 Rigaku 회전 양극에서 발생한 X선을 사용하여 분석하고, 분자 치환을 사용하여 구조를 해결하였다.
- <443> Bet v 1 (2628) 돌연변이체의 구조
- <444> 회전 양극에서 발생한 X선에 의해 분석할 때, 2.0Å 해상도로 회절시키면서 3차원 Bet v 1 (2628) 단백질 결정을 성장시킴으로써, 돌연변이의 구조적 효과를 설명하였다. 전체 α-탄소 골격 3차 구조가 보존되는 것을 나타내면서, Bet v 1 (2628) 구조 전자 밀도 지도에 의해 Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser 및 Lys134Glu 치환이 입증되었다.
- <445> Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 구조적 분석
- <446> 정제된 Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 구조적 완전성을 원형이색성(circular dichroism, CD) 분광법에 의해 분석하였다. 도 20은 제조합 Bet v 1.2801(야생형) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 CD 스펙트럼을 나타내는 것으로, 동일한 농도에 근접하여 기록되었다. 2개의 제조합 단백질에서 유래된 CD 스펙트럼에서 피크의 진폭 및 위치에 있어서 겹침은 두개의 조합물이 α-탄소 골격 3차 구조가 도입된 아미노산 치환체에 의해 영향을 받지 않는 것을 강력히 시사하면서, 동일한 양의 2차 구조를 포함한다는 것을 나타낸다.
- <447> Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 IgE 결합 성질
- <448> 자작나무 알레르기 개체로부터 유도된 혈청 IgE의 울혈을 사용하여 유체상의 IgE-저해 방법에서 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 1:1 혼합물뿐만 아니라, Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체의 IgE

결합 성질을 재조합 야생형 Bet v 1.2801과 비교하였다.

- <449> 실시예 1에 기재된 바와 같이, 재조합 Bet v 1.2802을 1:5의 몰 비(Bet v 1 no.2801 : 비오틴)로 비오틴화하였다. 저해 검사법을 다음과 같이 실행하였다: 혈청 샘플(25 μ l)을 고체상의 항 IgE와 함께 배양하고, 세척하고, 재현탁하고, 그리고 추가로 비오틴화된 Bet v 1.2801 및 주어진 돌연변이체의 혼합물 또는 2개의 돌연변이체의 1:1 혼합물과 함께 배양하였다. 아크리디늄 에스테르 표지된 스트렙타비딘으로 배양 후에 측정된 RLU로부터 고체 상에 결합된 비오틴화된 Bet v 1.2801의 양을 추정하였다. 완충액을 사용하여 얻은 RLU와 저해제로서의 돌연변이체의 비율로서 저해 정도를 계산하였다.
- <450> 도 21은 비-비오틴화된 Bet v 1.2801에 의해서, 그리고 Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637) 및 Bet v 1 (2628)과 Bet v 1 (2637)의 1:1 혼합물에 의한 알레르기 환자 울혈에서 얻은 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1.2801의 결합 저해를 나타낸다.
- <451> 혈청 울혈에 존재하는 혈청 IgE의 결합에 대하여 50% 저해에 도달하기 위해 필요한 각각의 재조합 단백질의 양에 명백한 차이가 존재한다. 재조합 Bet v 1.2801은 약 5ng에서 50% 저해에 도달하는 반면, Bet v 1 (2628) 돌연변이체의 경우에 상응하는 농도는 15-20 ng이다. 이것은 Bet v 1 (2628) 돌연변이체 내에 도입된 단일 점 돌연변이는 특이적 혈청 IgE에 대해 약 3-4배 친화성을 낮추는 것을 나타낸다.
- <452> Bet v 1 (2628) 돌연변이체 단백질에 의해 도달되는 최대 수준의 저해는 재조합 Bet v 1.2801과 비교하여 명확하게 낮다. 이것은 혈청 울혈에 존재하는 특이적 IgE의 일부가 도입된 점 돌연변이때문에 Bet v 1 (2628) 돌연변이체 단백질을 인식할 수 없다는 것을 나타낸다.
- <453> Bet v 1 (2637) 돌연변이체에 도입된 점 돌연변이가 Bet v 1.2801과 비교하여 특이적 혈청 IgE에 대한 친화성을 80 내지 100배 낮추는 것을 나타내는 약 400-500 ng에서 Bet v 1 (2637)은 50% 저해에 도달한다. IgE-결합에 있어 큰 차이는 Bet v 1.2801에 대한 저해 곡선과 비교하여 Bet v 1 (2637) 돌연변이체 단백질로 얻은 저해 곡선의 기울기의 명백한 차이에 의해 더욱 뒷받침된다. 상기 상이한 경향은 IgE-결합의 감소가 Bet v 1.2801과 비교하여 돌연변이체의 명확하게 상이한 에피토프(epitope) 패턴때문이라는 증거를 제공한다.
- <454> 단일 변형 알레르겐으로 수행한 저해 검사법외에, Bet v 1 (2628) 또는 Bet v 1 (2637)이 있는 각각의 샘플과 한 Bet v 1의 몰농도를 갖는 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637)의 1:1 혼합물을 시험하였고, 이들이 rBet v 1.2801에 대한 IgE-결합을 저해하는데 완전한(100%) 능력을 갖는다는 것을 나타내었다. IgE-결합을 완전히 저해하는 능력은 Bet v 1.2801 상에 존재하는 모든 반응성 에피토프가 1:1 알레르겐 혼합물에 존재했다는 명백한 지수이다. Bet v 1.2801 및 알레르겐 혼합물에 대한 2개의 저해 곡선의 유사한 경향이 이를 추가적으로 뒷받침한다. IgE-결합의 50% 저해의 경우, Bet v 1.2801과 비교할 때, 혼합 알레르겐 샘플의 감소된 IgE-반응성은 알레르겐 혼합물의 4배 고농도가 필요하다고 나타낸다.
- <455> 돌연변이화된 재조합 Bet v 1 알레르겐을 사용한 T 세포 증식 검사법
- <456> 참조 15에 기재된 바와 같이 분석을 수행하였다. Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체 단백질 둘 다 재조합체 및 자연 발생체와 유사한 자극 지수를 갖는 자작나무 꽃가루 알레르기 개체로부터 유래된 T 세포주에서 증식을 유도할 수 있었다. 이것은 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체 단백질 둘 다 항체 생성에 필요한 세포 면역 반응을 각각 개시할 수 있다는 것을 나타낸다.
- <457> 인간 호염기성구를 사용한 히스타민 방출 검사법
- <458> 호염기성 백혈구로부터의 히스타민 방출을 다음과 같이 수행하였다. 헤파린 처리된 혈액(20ml)을 각각의 자작나무 꽃가루 알레르기 개체로부터 채혈하고, 실온에서 보관하고, 그리고 24시간 이내에 사용하였다. 25 μ l의 헤파린처리된 전체 혈액을 유리 섬유 코팅된 미세역가 웰(덴마크, 코펜하겐, Reference Laboratory)에 적용하고, 25 μ l의 알레르겐 또는 항-IgE와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고 나서, 플레이트를 행구고 간섭 물질을 제거하였다. 최종적으로, 미세섬유에 결합된 히스타민을 분광형광적으로(spectrophotofluometrically) 측정하였다.
- <459> Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체 단백질의 히스타민 방출 성질
- <460> 히스타민 방출 데이터를 도 22 및 도 23에 나타내었다. 2명의 자작나무 꽃가루 알레르기 개체로부터 유래된 인간 호염기성구에서 히스타민 방출을 유도하는 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637) 돌연변이체 단백질의 효능을 시험하였다. 양쪽 경우에서, 돌연변이화된 알레르겐이 히스타민 방출을 유도하는 방출 곡선은 Bet v 1.2801의 방출 곡선과 비교하여 명확하게 오른쪽으로 이동되어 있다. 상기 이동은 Bet v 1 (2628) 및 Bet v 1 (2637)의

효능이 3 내지 10배 감소된 것을 나타낸다.

<461> 돌연변이체 Bet v 1 (2744) 및 돌연변이체 Bet v 1 (2753)

<462> Bet v 1 (2744) 및 Bet v 1 (2753)을 혼합 알레르겐 백신으로서 사용하기 위해 동일하게 제조하였다. 상기 돌연변이화된 알레르겐에서 점 돌연변이를 도 24 및 도 25에 나타낸 바와 같이 모든 표면에 정렬되는 방식으로 분포시키고, 도 26에 나타낸 바와 같이, 두 분자에서 각각 상이한 표면 영역에 영향을 미치도록 다시 디자인하였다. 그러나, 상기 변형된 알레르겐은 단일 알레르겐 백신으로서도 역시 개별적으로 사용될 수 있다.

<463> Bet v 1 (2744) 돌연변이체 단백질의 구조적 분석

<464> 정제된 Bet v 1 (2744) 돌연변이체 단백질의 구조적 완전성을 원형이색성(CD) 분광법에 의해 분석하였다. 도 27은 재조합 Bet v 1.2801(야생형) 및 Bet v 1 (2744) 돌연변이체의 CD 스펙트럼을 나타내는 것으로, 동일한 농도에 근접하여 기록되었다. 2개의 재조합 단백질에서 유래된 CD 스펙트럼에서 피크의 진폭 및 위치에 있어서 겹침은 두개의 조합물이 α-탄소 골격 3차 구조가 도입된 아미노산 치환체에 의해 영향을 받지 않는 것을 강력히 시사하면서, 동일한 양의 2차 구조를 포함한다는 것을 나타낸다.

<465> Bet v 1 (2744)의 히스타민 방출 성질

<466> 5명의 다른 자작나무 꽃가루 알레르기 개체로부터 유래된 호염기성 백혈구로 실행한 5개의 실험으로부터 얻은 히스타민 방출 데이터를 도 28 및 도 29A-D에 나타내었다. 인간 호염기성구 내에 히스타민 방출을 유도하는 Bet v 1 (2744) 돌연변이체 단백질의 효능을 시험하였다. 돌연변이화된 알레르겐의 방출 곡선은 Bet v 1 (2744)의 히스타민 방출 효능이 3 내지 5배 감소되는 것을 나타내며, Bet v 1.2801의 방출 곡선과 비교하여 명확하게 오른쪽으로 이동되어 있다.

<467> 돌연변이체 Bet v 1 (2733)

<468> 9개의 1차 돌연변이를 갖는 돌연변이체 Bet v 1 (2733)을 제조하고, 재조합적으로 발현시켰다. Bet v 1 (2733) 내에서 점 돌연변이의 분포는 400Å을 넘는 몇몇 표면영역이 변형되지 않게 남겨 둔다. 도 30은 Bet v 1 (2733)의 분자 표면에서 도입된 점 돌연변이를 나타낸다.

<469> **실시예 5**

<470> 본 실시예는 *Dermatophagoides pteronyssinus*로부터 Der p 2를 코드화하는 유전자의 클로닝 및 감소된 IgE-결합 친화성을 갖는 돌연변이체의 제조에 대해 설명한다.

<471> *Dermatophagoides pteronyssinus* 총 RNA의 첫번째 가닥 cDNA 합성으로부터 유래되는 PCR 증폭 생성물을 Dr. Wendy-Anne Smith 및 Dr. Wayne Thomas (TVW Telethon Institute for Child Health Research, 100 Roberts Rd, Subiaco, Western Australia 6008)로부터 얻었다. 첫번째 가닥 cDNA 라이브러리의 증폭 중에, Der p 2 특이 프라이머를 사용하여 Der p 2를 선택적으로 증폭하였다. 그리고 나서, pUC19(New England BioLabs)의 Bam HI 부위로 PCR 단편을 클로닝시켰다. 벡터 특이적 센스 (5'-GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG-3') 및 안티-센스 (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-3') 프라이머를 사용하여, Der p 2의 DNA 서열화를 실행하였다.

<472> ALK-101, ALK-102, ALK-103, ALK-104, ALK-113, ALK-114 및 ALK-120으로 지정된 총 7개의 독자적인 Der p 2 아이소폼을 동정하였다. 데이터 베이스 접근 번호 1A9V인 Der p 2 NMR 구조와 높은 서열 동일성 때문에, 저-친화성 IgE-돌연변이체의 발생을 위한 출발점으로서 ALK-114로 지정된 클론을 선택하였다. ALK-114와 비교하여, 나머지 6개의 자연 발생 아이소폼은 다음의 치환체로 이루어진다:

- ALK-101: M76V.
- ALK-102: V40L, T47S.
- ALK-103: M111L, D114N.
- ALK-104: T47S, M111I, D114N.
- ALK-113: T47S.
- ALK-120: V40L, T47S, D114N.

<473> pGAPZ α-A로 Der p 2의 삽입

<475> 이어서, 효모 *Pichia pastoris* 내에서 Der p 2의 분비된 발현을 위해 유전자 코드화 Der p 2(ALK-114)를 코드화하는 유전자를 pGAPZ α-A 벡터로 삽입하였다. Der p 2 폴리펩티드의 아미노 및 카르복실 말단에 각각 해당하

는 센스 프라이머 OB27 (5'-GGAATTCCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTGTGCC-3') 및 안티-센스 프라이머 OB28 (5'-CGTTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3')를 사용하여 상기 유전자를 증폭하였다. 제한 부위 Xho I 및 Xba I을 각각 조정하기 위해 프라이머를 5'-말단 내에 신장시켰다. 상기 Xho I 제한 부위는 pGAPZ α-A의 KEX2 분할 부위(LYS-ARG)를 코드화하는 핵산 서열이 있는 프레임 내에 Der p 2의 첫번째 코돈을 융합한다. 단일 횡수의 PCR 증폭을 100μl 부피에서 실행하였다: 0.1mg의 주형 ALK-114 DNA, 1 x Expand 폴리머라제 완충액 (Boehringer Mannheim사), 0.2 mM의 각각의 4개의 dNTP, 0.3 μM의 각각의 센스 및 안티-센스 프라이머, 그리고 2.5 유닛의 Expand 폴리머라제 (Boehringer Mannheim사). 95°C에서 15초, 45°C에서 30초, 72°C에서 1분의 25 사이클을 수행하고 나서, 72°C에서 7분의 1 사이클을 수행하여 DNA를 증폭시켰다. 생성되는 475 염기쌍 ALK-114 PCR 단편은 QIAquick 스핀 정제 방법(Qiagen사)을 사용하여 정제시켰다. 그리고 나서, 정제된 DNA 단편을 Xho I 및 Xba I로 소화시키고, 겔 정제시키고, 그리고 유사하게 소화된 pGAPZ α-A 내로 절찰하였다. 절찰 반응을 E.coli 균주 DH5 α에 실행하여 플라스미드 pCBo06을 생성하였다.

<476> Der p 2의 뉴클레오티드 서열을 클로닝 전후 및 그 다음의 생체의 돌연변이 유발(하기 참조)에서 서열화에 의해 확인하였다.

<477> Der p 2 서열

<478> SEQ ID NO 1은 Der p 2 (ALK-114)의 핵산 서열에 상응한다:

```

1   gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaagtgttgggtaccagga
61  tgccatgggttcagaacctgatcattcatcgtggtaaaccattccaattggaagccggt
121 ttcgaagccaaccaaaccacaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcctcaatcgatggt
181 ttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattacatgaaatgccattg
241 gttaaaggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccgaaaattgcacaaaa
301 tctgaaaatgttgcgtcactgttaaagttatgggtgatgatgggtgttttggcctgtgct
361 attgctactcatgctaaaatccgcgattaa
    
```

<479>

<480> SEQ ID NO 2는 Der p 2 (ALK-114)의 추론된 아미노산에 상응한다:

```

1   dqvdvkdcanheikkvlvpqchgsepccihrgkpfqleavfeanqntktakieikasidg
61  levdvpgidpnachymkcpkplvkqqydkytwvnpkiapksenvvvtvkvmgddgvlaca
121 iathakird
    
```

<481>

<482> P. pastoris로의 pGAPZ α-A-Der p 2의 삽입

<483> 벡터, pCBo06을 Avr II 제한 효소를 사용하여 선형화하였고, Invitrogen 설명서에서 개시한 바와 같이, 수용체 *P. pastoris* 균주, X-33로 형질전환하였다. Zeocin의 밀리미터당 100 마이크로그램(μg/ml)에 저항력이 있는 재조합 세포를 수집하였고, 콜로니를 Zeocin 100μg/ml을 함유하는 새로운 YPD 플레이트에서 정제하였다.

<484> 재조합 Der p 2의 발현 및 정제

<485> Zeocin 100μg/ml를 함유하는 YPD 배지(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 글루코스)의 250ml을 Der p 2를 발현하는 재조합 효모 세포의 하룻밤 배양액으로 접종하였다. 배양액을 30°C에서 72시간 동안 성장하게 하여 최상의 Der p 2 발현을 얻었다. 세포를 원심분리로 모아서, 생성된 배양 상청액을 50% 황산암모늄으로 포화시켰다. 3000x g로 30분 동안 원심분리한 후, 상청액을 80% 황산암모늄으로 포화시켰다. 원심분리한 후, 펠렛(pellet)을 150 밀리몰 농도(mM)의 NH₄HCO₃로 재부유시켰고, Superdex 75 겔 여과 칼럼으로 분획하였고, 동일한 완충용액으로 평형화하였다. Der p 2는 그것의 예상되는 분자량에 상응하는 주요한 피크로서 용출되었다. Der p 2의 용출액을 SDS 페이지 전기영동, 이어서 은 착색화 그리고 Der p 2 특이 폴리클로날 항체를 사용하여 면역노블로팅 분석법으로 확인하였다.

<486> 부위-특이적 돌연변이유발을 위한 아미노산 잔기의 선택

<487> 돌연변이유발을 위한 아미노산 잔기의 선택은 고도로 용매에 노출되고 집 먼지 진드기(Der p 2/f 2 및 Eur m 2) 및 저장 진드기(Tyr p 2, Lep d 2, Gly d 2)로부터의 알레르겐 중에서 고도로 보존되는 잔기의 동정화에 기초하였다. 아미노산 잔기에 노출된 고도의 용매는 Der p 2 NMR 구조의 분자 표면을 분석하여 시각적으로 동정화된

다(#1.9, 1A9V.pdb). 12개의 아미노산 잔기를 돌연변이유발을 위하여 선택하였다: K6A, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N 및 R128Q.

<488> 부위-특이적 돌연변이유발

<489> 단일 일차 돌연변이 및 그것의 다중 조합을 갖는 재조합 돌연변이체의 구성은 하기에서 기재한 바와 같다.

<490> Der p 2 돌연변이체를 코드화하는 발현 플라스미드는 DNA 주형(template)으로서 pCBo06을 사용하여 제조하였다. PCR 반응은 특이화된 돌연변이에 병합하는된 센스 및 안티-센스 프라이머를 사용하여 수행하였다. 특이화된 돌연변이를 생성하기 위한 PCR 반응에서 사용된 프라이머 쌍들을 도 31에서 기재하였다. 돌연변이는 볼드체로 나타내고, 수반하는 클로닝 단계에서 사용되는 제한 부위는 도에서 밑줄로 나타내었다. 돌연변이체 K6A, K15E, H30N, H74N 및 K82N의 구성에서는, PCR 반응은 본질적으로 "pGAPZ α-A로의 Der p 2의 클로닝"부분에서 기재한 바와 같이 수행하였다. 정제된 PCR 단편을 지정 제한 효소 부위로 소화되게 하고(도 31 참조), 겔 정제화하고, 유사하게 소화된 pCBo06으로 결합하고, E.coli DH5 α로 형질전환하였다.

<491> 돌연변이 E62S는 실시예 1에서의 Bet v 1 돌연변이체의 생성에서 기재된 대체 가능한 PCR 돌연변이유발 방법을 사용하여 생성한다. 두 개의 돌연변이 특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 특이화된 돌연변이가 포함되도록 합성되었다(도 31에서 개시된, OB47 및 OB48). 이차 증폭 단계에서 사용된 두 개의 추가적인 프라이머는 "pGAPZ α-A로의 Der p 2의 삽입"부분에서 기재한 바와 같이 OB27 및 OB28이었다.

<492> 제조된 돌연변이체 알레르겐은 예를 들어, 원형이색성(CD) 분광학, 결정화, IgE 결합 성질의 측정, 히스타민-방출, T-세포 증식자극 능력 등의 실시예 4에서 기재한 바와 같은 방법을 사용하여 특성화하였다.

<493> **실시예 6**

<494> **특이적 알레르기 백신화를 위하여 향상된 안정성을 가진 돌연변이화된 재조합 진드기 알레르겐(Der p 2)**

<495> 이 실시예에서는, 집 먼지 진드기예의 본 발명의 원리의 적용은 하나의 알레르겐, Der p 2로 예증한다. 다른 집 먼지 진드기 알레르겐의 조작은 동등한 절차로 수행될 것이다.

<496> 돌연변이화된 재조합 Der p 2 분자의 고안

<497> SEQ ID NO. 3은 야생형 아이소폼인, Der p 2-ALKOG 클론의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

<498> SEQ ID NO. 3: Der p 2-ALK-G의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열.

GAT CAA GTC GAT GTC AAA GAT TGT GCC AAT CAT GAA ATC AAA AAA	45
D Q V D V K D C A N H E I K K	15
GTT TTG GTA CCA GGA TGC CAT GGT TCA GAA CCA TGT ATC ATT CAT	90
V L V P G C H G S E P C I I H	30
CGT GGT AAA CCA TTC CAA TTG GAA GCT TTA TTC GAA GCC AAT CAA	135
R G K P F Q L E A L F E A N Q	45
AAC TCA AAA ACA GCT AAA ATT GAA ATC AAA GCT TCA ATC GAT GGT	180
N S K T A K I E I K A S I D G	60
TTA GAA GTT GAT GTT CCC GGT ATC GAT CCA AAT GCA TGC CAT TAT	225
L E V D V P G I D P N A C H Y	75
ATG AAA TGT CCA TTG GTT AAA GGA CAA CAA TAT GAT ATT AAA TAT	270
M K C P L V K G Q Q Y D I K Y	90
ACA TGG AAT GTT CCA AAA ATT GCA CCA AAA TCT GAA AAT GTT GTC	315
T W N V P K I A P K S E N V V	105
GTC ACT GTT AAA GTT TTG GGT GAT AAT GGT GTT TTG GCC TGT GCT	360
V T V K V L G D N G V L A C A	120
ATT GCT ACT CAT GCT AAA ATC CGC GAT	387
I A T H A K I R D	129

<499>

<500> 도 32는 입력 서열로서 SEQ ID NO. 3에서 나타내는 Der p 2-ALK-G 아미노산 서열을 사용하여 BLAST 조사에서 ClustalW 알고리즘을 사용하는 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>)에서 수행된 서열 정렬을 나타낸다. 상기 정렬은 집 먼지 진드기종 즉, Der p 2, Der f 2 및 Eur m 2로부터의 서열을 포함한다. 도 32에서, Der p 2-ALK-G 단백질 서열의 같은 위치의 아미노산과 동일한 아미노산 잔기는 회색 바탕에 검은 글

자를 사용하여 강조하였다. 비-동일한 아미노산은 흰색 바탕에 검은색으로 인쇄하였다.

<501>

표면 구조의 이미지

<502>

집 먼지 진드기균 2 알레르겐을 표현하는 아미노산 서열은 85% 이상의 유사성을 가지고, 어느 정도의 분자 표면은 보존된다(회색표시 지역, 도 33를 참고).

<503>

도 33은 공개된 PDB:PDB 파일에 함유된 10개 중 구조 번호 1, 1A9V NMR 구조에 Der p 2-ALK-G 단백질 서열을 포개놓는 경우에, 4개의 다른 각도에서 본 표면 윤곽을 나타낸다.

<504>

25-30 Å의 범위의 거리 안에서 전체 표면에 걸쳐 공간적으로 분포된, 보존되고 고도로 용매에 노출된 아미노산은 돌연변이를 위하여 선택된다. 하기의 부분에서는 다음의 정보가 주어진다: 돌연변이에 적절한 것으로 고려되는 아미노산의 목록(A), 고안된 돌연변이체의 목록(B) 및 고안된 돌연변이체에 해당하는 DNA 서열(C). 도 34는 예로서 돌연변이체 1의 표면 윤곽을 보여준다. 회색은 보존된 아미노산 잔기를 표시한다. 검은색은 돌연변이용으로 선택된 아미노산 잔기를 표시한다.

<505>

A. 돌연변이용으로 선택된 아미노산 목록

<506>

K15, S24, H30, R31, K48, E62, H74, K77, K82, K100, R128

<507>

B. 고안된 돌연변이체 목록

돌연변이체 1:

K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N

돌연변이체 2:

K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, R128Q

돌연변이체 3:

K15E, S24N, H30G, K48A, K77N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 4:

K15E, S24N, H30G, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 5:

K15E, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 6:

S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 7:

K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N

돌연변이체 8:

K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, R128Q

돌연변이체 9:

K15E, S24N, R31S, K48A, H74N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 10:

K15E, S24N, R31S, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 11:

K15E, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

돌연변이체 12:

S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

<508>

<509>

C. 돌연변이체의 뉴클레오티드 서열

돌연변이체 1:

K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
 ggatgccatggTAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtagatcgatccaaatgcatgccattatatg
 AACgtccattggTTAACggacaacaatatgatattaataatacatggaatgttcca
 aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatccgcgat

돌연변이체 2:

K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
 ggatgccatggTAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtagatcgatccaaatgcatgccattatatg
 AACgtccattggTTAACggacaacaatatgatattaataataatacatggaatgttcca
 aaaattgcaccaaactctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 3:

K15E, S24N, H30G, K48A, K77N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
 ggatgccatggTAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatggtttagaagttgatgttcccggtagatcgatccaaatgcatgccattatatg
 AACgtccattggTTAACggacaacaatatgatattaataataatacatggaatgttcca
 aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

<510>

돌연변이체 4:

K15E, S24N, H30G, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaaaaacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACGgacaacaatatgatattaatatatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 5:

K15E, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
ggatgccatggttcagaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACGgacaacaatatgatattaatatatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 6:

S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACGgacaacaatatgatattaatatatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 7:

K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtagca
ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaataatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatccgcgat

돌연변이체 8:

K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtagca
ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaataatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaaactctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 9:

K15E, S24N, R31S, K48A, H74N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtagca
ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaataatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatggttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 10:

K15E, S24N, R31S, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGttttggtacca
ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggttAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 11:

K15E, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGttttggtacca
ggatgccatggttcagaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggttAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

돌연변이체 12:

S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtacca
ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattggttAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

<513>

<514> 실시예 7

<515> 특이적 알레르기 백신화를 위하여 향상된 안전성을 가진 돌연변이화된 재조합 진드기 알레르겐 (Der p 1)

<516> 이 실시예에서는, 집 먼지 진드기 알레르겐에 대한 본 발명의 원리의 적용은 하나의 알레르겐, Der p 1으로 예 증한다. 다른 집 먼지 진드기 알레르겐의 조작은 동등한 절차로 수행될 것이다.

<517> 돌연변이화된 재조합 Der p 1 분자의 고안

<518> SEQ ID NO. 4은 야생형 아이소폼인, Der p 2-ALKOG 클론의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

<519> SEQ ID NO. 4: Der p 1-ALK의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열.

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT	45
T N A C S I N G N A P A E I D	15
TTG CGA CAA ATG CGA ACT GTC ACT CCC ATT CGT ATG CAA GGA GGC	90
L R Q M R T V T P I R M Q G G	30
TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT GCC GCA ACT GAA TCA	135
C G S C W A F S G V A A T E S	45
GCT TAT TTG GCT TAC CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTI GCT GAA CAA	180
A Y L A Y R N Q S L D L A E Q	60
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC	225
E L V D C A S Q H G C H G D T	75
ATT CCA CGT GGT APT GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA	270
I P R G I E Y I Q H N G V V Q	90
GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CGA GAA CAA TCA TGC CGA CGA	315
E S Y Y R Y V A R E Q S C R R	105
CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC	360
P N A Q R F G I S N Y C Q I Y	120
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC	405
P P N V N K I R E A L A Q T H	135
AGC GCT APT GCC GTC APT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC	450
S A I A V I I G I K D L D A F	150
CGT CAT TAT GAT GGC CGA ACA ATC ATT CAA CGC GAT AAT GGT TAC	495
R H Y D G R T I I Q R D N G Y	165
CAA CCA AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA	540
Q P N Y H A V N I V G Y S N A	180
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT	585
Q G V D Y W I V R N S W D T N	195
TGG GGT GAT AAT GGT TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG	630
W G D N G Y G Y F A A N I D L	210
ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC ATT CTC	666
M M I E E Y P Y V V I L	222

<520>

<521> 도 35는 입력 서열로서 SEQ ID NO. 4에서 나타내는 Der p 1-ALK 아미노산 서열을 사용하고 BLAST 조사에서의 ClustalW 알고리즘을 사용하는 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>)에서 수행된 서열 정렬을 나타낸다. 상기 정렬은 집 먼지 진드기종 즉, Der p 1, Der f 1 및 Eur m 1로부터의 서열을 포함한다. 도 35에서, Der p 1-ALK 단백질 서열에서 같은 위치에서 아미노산과 동일한 아미노산 잔기는 회색 바탕에 검은 글자를 사용하여 강조하였다. 비-동일한 아미노산은 흰색 바탕에 검은색으로 인쇄하였다.

<522> 표면 구조의 이미지

<523> 집 먼지 진드기군 1 알레르겐을 표현하는 아미노산 서열은 어느 정도의 유사성을 가지고, 어느 정도의 분자 표면은 보존된다(회색표시 지역, 도 36를 참조). 도 36은 Der p 1 분자 구조 모형에 Der p 1-ALK 단백질 서열을 포개놓는 경우에, 4개의 다른 각도에서 보여지는 표면 윤곽을 나타낸다.

<524> 25-30Å의 범위의 거리 안에서 전체 표면에 걸쳐 공간적으로 분포된, 보존되고 고도로 용매에 노출된 아미노산은 돌연변이를 위하여 선택된다. 하기의 부분에서는 다음의 정보가 주어진다: 돌연변이에 적절한 것으로 고려되는 아미노산의 목록(A), 고안된 돌연변이체의 목록(B) 및 고안된 돌연변이체에 해당하는 DNA 서열(C). 도 37은 예로서 돌연변이체 번호 11의 표면 윤곽을 보여준다. 회색은 보존된 아미노산 잔기를 표시한다. 검은색은 돌연변이용으로 선택된 아미노산 잔기를 표시한다.

<525> A. 돌연변이용으로 선택된 아미노산 목록

E13, P24, R20, Y50, S67, R78, R99, Q109, R128, R156,
R161, P167, W192

<526>

<527>

B. 고안된 돌연변이체 목록

돌연변이체 1:

P24T, Y50V, R78E, R99Q, R156Q, R161E, P167T

돌연변이체 2:

P24T, Y50V, R78Q, R99E, R156E, R161Q, P167T

돌연변이체 3:

R20E, Y50V, R78Q, R99Q, R156E, R161E, P167T

돌연변이체 4:

R20Q, Y50V, R78E, R99E, R156Q, R161Q, P167T

돌연변이체 5:

P24T, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161Q, P167T

돌연변이체 6:

R20E, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161E, P167T

돌연변이체 7:

R20Q, Y50V, S67N, R99Q, R156E, R161E, P167T

돌연변이체 8:

E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E, P167T

돌연변이체 9:

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q, P167T

돌연변이체 10:

E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E, P167T, W192F

돌연변이체 11:

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q, P167T, W192F

<528>

<529>

C. 돌연변이체의 뉴클레오티드 서열

돌연변이체 1:

P24T, Y50V, R78E, R99Q, R156Q, R161E, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA GAA GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666
    
```

돌연변이체 2:

P24T, Y50V, R78Q, R99E, R156E, R161Q, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CAG GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666
    
```

<530>

돌연변이체 3:

R20E, Y50V, R78Q, R99Q, R156E, R161E, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG GAA 60
ACT GTC ACT CCC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CAG GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

돌연변이체 4:

R20Q, Y50V, R78E, R99E, R156Q, R161Q, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CAG 60
ACT GTC ACT CCC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA GAA GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

<531>

돌연변이체 5:

P24T, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161Q, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT AAC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CGT GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

돌연변이체 6:

R20E, Y50V, S67N, R99E, R156Q, R161E, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG GAA 60
ACT GTC ACT CCC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT AAC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CGT GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

<532>

돌연변이체 7:

R20Q, Y50V, S67N, R99Q, R156E, R161E, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CAG 60
ACT GTC ACT CCC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT AAC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CGT GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA CAA CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

돌연변이체 8:

E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E, P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA GAA GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT GAA GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

<533>

돌연변이체 9:

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q,
P167T

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CAG GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CAG GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

돌연변이체 10:

E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, R156Q, R161E,
P167T, W192F

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA GAA GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT GAA GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TTT GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

<534>

돌연변이체 11:

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q,
P167T, W192F

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA CAG GGT ATT 240
GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA GAA GAA 300
CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360
CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CAG GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT APT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TTT GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC
    
```

<535>

<536>

실시예 8

<537>

특이적 알레르기 백신화를 위하여 향상된 안전성을 가진 돌연변이화된 재조합 풀(grass) 알레르겐 (Phl p 5)

<538>

본 실시예에서, 풀 꽃가루 알레르겐에 대한 본 발명의 개념의 적용은 하나의 알레르겐, Phl p 5에 의해 예증된다. 다른 풀 꽃가루 알레르겐의 조작은 동등한 절차로 수행될 것이다.

<539>

돌연변이화된 재조합 Phl p 5 분자의 고안

<540>

SEQ ID NO. 5은 야생형 아이소폼인, Phl p 5.0103 클론의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

<541> SEQ ID NO. 5: Ph1 p 5.0103의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열.

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccggtacacccccgcc      60
A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A      20
acccccgccgccccggccggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
T P A A P A G A E P A G K A T T E E Q K      40
ctgatcagagaagatcaacgccggcttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtcccc      180
L I E K I N A G F K A A L A A A A G V P      60
ccagcggacaagtacaggacgttctgctgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc      240
P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F      80
gcggaggccctctcggggcgagcccaagggcgccggaatccagctccaaggccgcgctc      300
A E G L S G E P K G A A E S S S K A A L      100
acctccaagctcgacgcccgcctacaagctgcctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
T S K L D A A Y K L A Y K T A E G A T P      120
gaggccaagtagcagcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcatcatcgccggc      420
E A K Y D A Y V A T V S E A L R I I A G      140
accctcgaggtccacgccgtcaagcccgcgccgagggaggtcaaggtcatccccgccggc      480
T L E V H A V K P A A E E V K V I P A G      160
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcccgttcaaggtcgctgccaccgcccgaac      540
E L Q V I E K V D A A F K V A A T A A N      180
gccgcccccgccaacgacaagttcacccgtcttcgagggccgccttcaacgacgccatcaag      600
A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K      200
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcccgtc      660
A S T G G A Y E S Y K F I P A L E A A V      220
aagcaggcctacgccgccaccgtcgccaccgcccggaggtcaagtacactgtctttgag      720
K Q A Y A A T V A T A P E V K Y T V F E      240
accgcactgaaaaaggccatcacccgccatgtccgaagcacagaagggtgccaagcccgcc      780
T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A      260
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcccgttggcgggccaccggcgccgccaccgcc      840
A A A T A T A T A A V G A A T G A A T A      280
gctactggtggctacaaagtc      861

```

<542> A T G G Y K V

<543> 도 38는 입력 서열로서 SEQ ID NO. 5에서 나타내는 Ph1 p 5.0103 아미노산 서열을 사용하여 BLAST 조사의 ClustalW 알고리즘을 사용하는 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>)에서 수행된 서열 정렬을 나타낸다. 상기 정렬은 울혈증 즉, Ph1 p 5, Poa p 5, Lol p 5, Hol l 5, Pha a 5, Hor v 9 및 Hor v 9로부터의 서열을 포함한다. 도 38에서, Ph1 p 5.0103 단백질 서열에서 같은 위치에서 아미노산과 동일한 아미노산 잔기는 회색 바탕에 검은 글자를 사용하여 강조하였다. 비-동일한 아미노산은 흰색 바탕에 검은색으로 인쇄하였다.

<544> 표면 구조의 이미지

<545> 풀 꽃가루균 5 알레르겐을 표현하는 아미노산 서열은 어느 정도의 유사성을 가지고, 어느 정도의 분자 표면은 보존된다(회색표시 지역, 도 39를 참조). 도 39는 Ph1 p 5 분자 구조 모형에 Ph1 p 5.0103 단백질 서열을 포개 놓는 경우에, 4개의 다른 각도에서 본 표면 윤곽을 나타낸다. 구조 모형은 두 개의 반쪽, 도 39A에서 나타내는 모형 A(아미노산 34-142), 및 도 39B에서 나타내는 모형 B(아미노산 149-259)에서 분자를 포함한다.

<546> 25-30Å의 범위의 거리 안에서 전체 표면에 걸쳐 공간적으로 분포된, 보존되고 고도로 용매에 노출된 아미노산은 돌연변이를 위하여 선택된다. 하기의 부분에서는 다음의 정보가 주어진다: 돌연변이에 적절한 것으로 고려되는 아미노산의 목록(A), 고안된 돌연변이체의 목록(B) 및 고안된 돌연변이체에 해당하는 DNA 서열(C). 도 40A 및 B는 예로서, 각각 돌연변이체 번호 1 모형 A 및 모형 B의 표면 윤곽을 보여준다. 회색은 보존된 아미노산 잔기를 표시한다. 검은색은 돌연변이용으로 선택된 아미노산 잔기를 표시한다.

<547> A. 돌연변이용으로 선택된 아미노산 목록

I45, R66, E133, R136, I137, D186, F188, K211, P214, Q222,
<548> P232, L243, Q254

<549> B. 고안된 돌연변이체 목록

돌연변이체 1:

I45K, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 2:

R66N, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 3:

I45K, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 4:

I45K, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 5:

I45K, E133S, D186H, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 6:

I45K, E133S, Q222K, P232G, L243E, Q254K

돌연변이체 7:

I45K, E133S, F188I, P214G, L243E, Q254K

돌연변이체 8:

I45K, E133S, F188I, K211N, L243E, Q254K

돌연변이체 9:

R66N, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

<550>

돌연변이체 10:

R66N, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

돌연변이체 11:

I45K, E133S, D186H, P214G, L243E, Q254K

돌연변이체 12:

I45K, E133S, D186H, K211N, L243E, Q254K

돌연변이체 13:

I45K, E133S, P214G, P232G, L243E, Q254K

돌연변이체 14:

I45K, E133S, K211N, P232G, L243E, Q254K

<551>

<552>

C. 돌연변이체의 뉴클레오티드 서열

돌연변이체 1:

I45K, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcggttacggccccgccaccccagctgccccggccgcccggctacacccccgcc      60
acccccgcccggccccggcggagcggagccagcaggttaaggcgcgacccgaggagcagaag      120
ctgatcgagaagAAAacgcccggcttcaaggcggccttgcccgctgccgcccggcgtcccg      180
ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcggcctccaacaaggccttc      240
gcggaggccctctcgggagcggcgaagggcggcggcgaatccagctccaaggccgctc      300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgcctacaagacagccgagggcggcgcgcct      360
gagccaagtagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccacggcgtcaagccggcggcggaggtcaaggtcatccccgcccggc      480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgccccttcaaggtcgtgccaccgcccgaac      540
gccgccccggccaacgacaagATTaccgtcttcgagggcggccttcaacgacgccatcaag      600
gcgagcagggcggcctacgagaggtacaagttcatccccgcctggaggccgcccgtc      660
aagAAAgcctacgcccaccgtcgccaccgcccggaggtcaagtacactgtctttgag      720
accgcaCAAAAAaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagcccgcc      780
gccgctgccaccgccaaccgcaaccgcccgttgccgcccaccgcccggcaccgcc      840
gctactggtggctacaaagt      861

```

<553>

돌연변이체 2:

R66N, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccggccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgaagaagAAAacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtccc      180
ccagcggacaagtacAACaggttcgtcgcaaccttcggcggcctccaacaaggccttc      240
gcccggggcctctcggggcagcccaaggcggcggccgaatccagctccaaggcggcgtc      300
acctccaagctcgacggcctacaagctcgcctacaagacagccgaggggcgacgcct      360
gagccaaagtaacgacgcctacgtcgcacccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccaacggcctcaagccccggcggcggagggtcaagggtcatccccggcggc      480
gagctcgagggtcatcgagaagggtcgacggcggccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacgcatcaag      600
gcgagcacggggcggcctcagagagctacaagttcatccccggcctggaggccggcgtc      660
aagAAAgcctaacggccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaacactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagccccgc      780
ccgctgccaccgcccaccgcaaccgcccggccttggcggcggcaccggcggcccaccgccc      840
gctactggtgggtacaaagtc      861
    
```

돌연변이체 3:

I45K, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccggccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgaagaagAAAacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtccc      180
ccagcggacaagtacaggagcttcgtcgcaaccttcggcggcggcctccaacaaggccttc      240
gcccggggcctctcggggcagcccaaggcggcggcggcgaatccagctccaaggcggcgtc      300
acctccaagctcgacggcctacaagctcgcctacaagacagccgaggggcgacgcct      360
gagccaaagtaacgacgcctacgtcgcacccgtaagcggaggcgtcAGCcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccaacggcctcaagccccggcggcggagggtcaagggtcatccccggcggc      480
gagctgagggtcatcgagaagggtcgaacggccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacgcatcaag      600
gcgagcacggggcggcctcagagagctacaagttcatccccggcctggaggccggcgtc      660
aagAAAgcctaacggccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaacactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagccccgc      780
ccgctgcccaccgcccaccgcaaccgcccggccttggcggcggcaccggcggcccaccgccc      840
gctactggtgggtacaaagtc      861
    
```

돌연변이체 4:

I45K, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccggccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgaagaagAAAacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtccc      180
ccagcggacaagtacaggagcgttcgtcgcaaccttcggcggcggcctccaacaaggccttc      240
gcccggggcctctcggggcagcccaaggcggcggcggcgaatccagctccaaggcggcgtc      300
acctccaagctcgacggcctacaagctcgcctacaagacagccgaggggcgacgcct      360
gagccaaagtaacgacgcctacgtcgcacccgtaagcggaggcgtccggcAAAatcgccggc      420
acctcgagggtccaacggcctcaagccccggcggcggagggtcaagggtcatccccggcggc      480
gagctgagggtcatcgagaagggtcgacggcggccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacgcatcaag      600
gcgagcacggggcggcctcagagagctacaagttcatccccggcctggaggccggcgtc      660
aagAAAgcctaacggccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaacactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagccccgc      780
ccgctgcccaccgcccaccgcaaccgcccggccttggcggcggcaccggcggcccaccgccc      840
gctactggtgggtacaaagtc      861
    
```

돌연변이체 5:

I45K, E133S, D186H, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcggtacacccccgcc      60
accccccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgcgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgcagaagAAAaacgcggcttcaaggcggccttggccgctgcccggcgctcccg      180
ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc      240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggcccgctc      300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgcccaagaagcggggcgcgacgacct      360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccacgcccgtcaagccccggccgaggggtcaagggtcatccccggccggc      480
gagctgcagggtcatcgagaagggtcgacgccccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacATAagttcaacgctcttcgaggccgcttcaacgacgcccataag      600
gcgagcaaggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgcctggaggcccgccgtc      660
aagAAAgcctacgcccacccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagcccggc      780
gcccgtgccaccgcccaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccaccgccc      840
gctactggtggctacaaagtcc      861

```

돌연변이체 6:

I45K, E133S, Q222K, P232G, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcggtacacccccgcc      60
accccccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgcgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgcagaagAAAaacgcggcttcaaggcggccttggccgctgcccggcgctcccg      180
ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc      240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggcccgctc      300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgcccaagaagcggggcgcgacct      360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccacgcccgtcaagccccggccgaggggtcaagggtcatccccggccggc      480
gagctgcagggtcatcgagaagggtcgacgccccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacgacaagttcaacgctcttcgaggccgcttcaacgacgcccataag      600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgcctggaggcccgccgtc      660
aagAAAgcctacgcccacccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagcccggc      780
gcccgtgccaccgcccaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccaccgccc      840
gctactggtggctacaaagtcc      861

```

돌연변이체 7:

I45K, E133S, F188I, P214G, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcggtacacccccgcc      60
accccccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgcgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgcagaagAAAaacgcggcttcaaggcggccttggccgctgcccggcgctcccg      180
ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc      240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggcccgctc      300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgcccaagaagcggggcgcgacct      360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccacgcccgtcaagccccggccgaggggtcaagggtcatccccggccggc      480
gagctgcagggtcatcgagaagggtcgacgccccttcaagggtcgctgccaccgcccgaac      540
gcccggccccgccaacgacaagATAccgctcttcgaggccgcttcaacgacgcccataag      600
gcgagcaaggggcgccctacgagagctacaagttcatGGCgcccctggaggcccgccgtc      660
aagcaggcctacgcccacccgtcgccaccgcccggagggtcaagtaactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagcccggc      780
gcccgtgccaccgcccaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccaccgccc      840
gctactggtggctacaaagtcc      861

```

돌연변이체 8:

I45K, E133S, F188I, K211N, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccgccgccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcagagaagAAAacgccccgttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtcccg      180
ccagcggacaagtaacagcagcttcgtcgcaaccttcggcggcggcctccaacaaggccttc      240
gaggagggcctctcgggagagcccaaggcgccgcaatccagctccaaggcggcgctc      300
acctccaagctcgcagcggcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
gaggccaagtaacgacgctacgtcgccaacgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccacggcgtcaagcccggcggcggaggtcaagggtcatccccggcggc      480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgcagcggccttcaaggctcgctgccaccggcggcaac      540
gccccccccgcaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacggccatcaag      600
gagcgcagggggcgccgctacgagagctacACTtcatccccggcctggaggcggcggc      660
aagcaggcctacgcccacgctcgccaacggcggcggaggtcaagtaactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaaggcctacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagccccgcc      780
gcccgtgccaccgccaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      840
gctactggtgggtacaaaagtcc      861

```

돌연변이체 9:

R66N, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccgccgccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcagagaagatcaacgccccgttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtcccg      180
ccagcggacaagtaacAACacgttcgtcgcaaccttcggcggcggcctccaacaaggccttc      240
gaggagggcctctcgggagagcccaaggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      300
acctccaagctcgcagcggcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
gaggccaagtaacgacgctacgtcgccaacgtaagcggagggcgtcAGCcatcatcgccggc      420
acctcgagggtccaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgcagcggccttcaaggctcgctgccaccggcggcaac      540
gccccccccgcaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacggccatcaag      600
gagcgcagggggcgccgctacgagagctacaagttcatccccggcctggaggcggcggc      660
aagAAAgcctacgcccacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      720
accgcaGAAAAaaaggcctacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagccccgcc      780
gcccgtgccaccgccaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      840
gctactggtgggtacaaaagtcc      861

```

돌연변이체 10:

R66N, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggcggcggtacacccccgcc      60
acccccgccgccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcagagaagatcaacgccccgttcaaggcggccttggccgctgcccggcggtcccg      180
ccagcggacaagtaacAACacgttcgtcgcaaccttcggcggcggcctccaacaaggccttc      240
gaggagggcctctcgggagagcccaaggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      300
acctccaagctcgcagcggcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
gaggccaagtaacgacgctacgtcgccaacgtaagcggagggcgtccgcAAAatcgccggc      420
acctcgagggtccaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgcagcggccttcaaggctcgctgccaccggcggcaac      540
gccccccccgcaacgacaagATTaccgtcttcgaggcggccttcaacgacggccatcaag      600
gagcgcagggggcgccgctacgagagctacaagttcatccccggcctggaggcggcggc      660
aagAAAgcctacgcccacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      720
accgcaGAAAAaaaggcctacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagccccgcc      780
gcccgtgccaccgccaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc      840
gctactggtgggtacaaaagtcc      861

```

<556>

돌연변이체 11:

I45K, E133S, D186H, P214G, L243E, Q254K:

```

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccggcgtacacccccgcc 60
acccccgccccggccggagcgagccagcaggttaaggcgcgacccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgccgccccgctccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgctcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttc 240
gcggagggcctctcgggcgagcccaaggcggccgccaatccagctccaaggccgctc 300
acctccaagctcgacgccccctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgagcgcct 360
gaggccaagtaacgacgccccctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
accctcgaggtccaacgccccgtaagccccggccgagggaggtcaaggctatccccgcccc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgccccctcaaggctcgctgccaccgcccccaac 540
gccgccccgccaacCATaagttcacctgcttccgagggccgcttcaacgacgcatcaag 600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatcGGCgccttgaggccgccccgctc 660
aagcagggcctacgccccaccgctcgccaccgccccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaaagccccgc 780
gccgctgccaccgccaaccgcaaccgccccgcttggcggccaccgccccgccccaccgccc 840
gctactggtggctacaaagtcc 861

```

돌연변이체 12:

I45K, E133S, D186H, K211N, L243E, Q254K:

```

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccggcgtacacccccgcc 60
acccccgccccggccggagcgagccagcaggttaaggcgcgacccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgccgccccgctccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgctcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttc 240
gcggagggcctctcgggcgagcccaaggcggccgccaatccagctccaaggccgctc 300
acctccaagctcgacgccccctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgagcgcct 360
gaggccaagtaacgacgccccctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
accctcgaggtccaacgccccgtaagccccggccgagggaggtcaaggctatccccgcccc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgccccctcaaggctcgctgccaccgcccccaac 540
gccgccccgccaacCATaagttcacctgcttccgagggccgcttcaacgacgcatcaag 600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaacttcatccccgccccggagggccgccccgctc 660
aagcagggcctacgccccaccgctcgccaccgccccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaaagccccgc 780
gccgctgccaccgccaaccgcaaccgccccgcttggcggccaccgccccgccccaccgccc 840
gctactggtggctacaaagtcc 861

```

돌연변이체 13:

I45K, E133S, P214G, P232G, L243E, Q254K:

```

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccggcgtacacccccgcc 60
acccccgccccggccggagcgagccagcaggttaaggcgcgacccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgccccgcttcaaggcggccttggccgctgccgccccgctccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgctcgcaaccttcggcgcggcctccaacaaggccttc 240
gcggagggcctctcgggcgagcccaaggcggccgccaatccagctccaaggccgctc 300
acctccaagctcgacgccccctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgagcgcct 360
gaggccaagtaacgacgccccctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
accctcgaggtccaacgccccgtaagccccggccgagggaggtcaaggctatccccgcccc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgccccctcaaggctcgctgccaccgcccccaac 540
gccgccccgccaacgacaagttcacctgcttccgagggccgcttcaacgacgcatcaag 600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatcGGCgccttgaggccgccccgctc 660
aagcagggcctacgccccaccgctcgccaccgccccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAAaggctgccaaagccccgc 780
gccgctgccaccgccaaccgcaaccgccccgcttggcggccaccgccccgccccaccgccc 840

```

돌연변이체 14:

I45K, E133S, K211N, P232G, L243E, Q254K:

```

gccgatctcgggttacggccccgccaccccgctgccccggccgcccgtacacccccgcc      60
acccccgccgccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgagaagAAAacgcccgttcaaggcggccttggccgctgccgcccggcgtcccg      180
ccagcggacaagtacaggacgttcgctcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc      240
gctggaggcctctcggggcgagcccaagggcgccgccaatccagctccaaggcggcgctc      300
acctccaagctcgacgcccgtacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgctc      360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc      420
accctcgagggtccacgcccgtcaagcccggcggcggagggtcaaggtcatccccgcccgc      480
gagctgcagggtcatcgagaaggtcgacgcccgttcaaggtcgctgccaccgcccgaac      540
gccgccccgcccaacgacaagttcacccgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag      600
gcgagcagggcgccctacgagagctacAACTtcatccccgcccgtggaggccgcccgtc      660
aagcaggcctacgcccaccgtcgccaccgcgGCCgagggtcaagtacactgtctttgag      720
accgcaGAAaaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaaagcccgc      780
gccgctgccaccgcccaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccgcccggcaccgccc      840
gctactggtggctacaaagt      861
    
```

<558>

<559> 실시예 9

<560> 재조합 및 돌연변이체 Bet v 1의 T-세포 반응성

<561> 목적:

<562> 증식 및 시토킨 생산의 관점에서 돌연변이화된 알레르겐에 반응하는 생체의 T-세포를 조사하기 위함이다.

<563> 방법:

<564> 알레르기 개체로부터의 PBL(말초 혈액 임파구)을 다음의 조사에 사용하였다.

<565> 8개의 bet v 1 특이적 T-세포주는 이전에 발행된 프로토콜에서 기재한 바와 같이, T-세포가 제시되는 bet v 1 아이소폼의 다양성을 입증하기 위하여 자연적으로 정제된 bet v 1을 가지고 PBL로부터 구축되었다.

<566> 10개의 PBL 및 8개의 T-세포주를 자작나무 추출액(Bet v), 자연적으로 정제된 bet v 1(nBet v 1), 재조합 Bet v 1(rBet v 1 또는 wt; 27) 및 rBet v 1의 네 개의 다른 돌연변이화된 형태(다른 곳에서 기재된)를 가지고 자극하였다: 2595, 2628, 2637, 2744, 2773. 2637 돌연변이체는 나중에 부분적으로 풀당되지 않은 채 발견되었고, 논의되지는 않을 것이다.

<567> 요약 : 둥근-바닥의 96 웰 플레이트에 PBL를 웰당 2×10^5 씩 첨가하였다. 다른 자작나무 샘플을 세 가지의 다른 농도로 4번 첨가하고 6일 동안 성장하게 하였다. 6일째에 자작나무의 최고의 농도를 가진 각각의 웰에서 용량 ($100 \mu\text{l}$)의 세포 절반을 시토킨 생산을 위해 채취하였다. 방사선 표지화된 티미딘을 웰에 첨가하였다. 다음날 (7일)에 세포를 여과하여 채취하였다. 삼광 유체를 여과기에 첨가하고, 방사능을 삼광계측기로 측정하였다.

<568> 마찬가지로, 둥근-바닥의 96 웰 플레이트의 96 웰에 T-세포를 웰당 3×10^4 씩 첨가하고, 조사된(irradiated) 동물 생체로부터 유래된 PBL(1×10^5 세포/웰) 및 다른 자작나무 샘플의 3가지 다른 농도로 자극하였다. 1일 후에 최고 농도의 자작나무를 가진 각 웰로부터 세포를 시토킨 생산을 위해 채취하였다. 방사선 표지화된 티미딘을 웰에 첨가하였다. 2일째에 세포를 여과하여 채취하고 PBL을 위해 기재한 바와 같이 계측하였다.

<569> 4벌의 첨가물로부터 상청액을 모으고, 시토킨을 Becton Dickinson의 CBA(시토킨 비즈 평가) 키트를 사용하여 측정하였다.

<570> 결과

<571> 10 개의 PBL 배양액은 자작나무에 특이적 자극을 나타낸다. 다른 자작나무 샘플에 대한 PBL의 일반적인 증식은 변화가 관찰될 수 있었을 지라도 유사하다. 3 PBL에서는, nBet v 1은 rBet v 1 및 돌연변이체보다 더 좋은 증식을 자극한다. 돌연변이체 자작나무 샘플은 rBet v 1과 거의 동일하게 PBL를 자극한다(도 41). 도 41은 상기의 Bet v 1 제조물에 대한 자극지수를 나타낸다. 자극지수(SI)는 배지 비교대조군의 증식(cpm: 분당 계수)로 나누어진 자극된 샘플(최고 농도) 증식(cpm)으로 계산된다. PPD는 무코박테리움 튜버큘로시스(mucobacterium

tuberculosis)로부터의 정제된 단백질 유도체를 나타내고, 양성 비교대조군으로 제공된다.

<572> 시토킨 생산은 IFN-감마에 의해 지배되고, PBL 증식과 비례적으로 증가된다. Th1/Th2 변화의 어떠한 징후는 확실하지 않다(도 42-44). 도 42는 Th0 프로파일을 가진 개체를 나타내고, 도 43은 Th1 프로파일 그리고 도 44는 Th2 프로파일을 가진 개체를 나타낸다. 시토킨 생산은 pg/ml에서 측정하여 막대(bar)로서 나타내고, IL-5/IFN-감마 사이의 비율은 아래쪽 점선(Y축의 오른쪽)이다. 증식은 cpm으로 측정된 실선으로 Y축의 오른쪽에서 보여진다. 배지 및 MBP(말토스 결합 단백질)은 배경 비교대조군으로서 포함되었다.

<573> 8개의 T-세포주는 nBet v 1에서 구축되었고, 하나를 제외한 모두는 모든 자작나무 샘플에 대하여 동등하게 잘 증식되었다. 4 개의 T-세포주는 IL-5 및 IFN-감마 비율(Th2>5, 5>Th0>0.2, 0.2>Th1)에 기초한 Th0 유사 시토킨을 분비하였다. 세 개의 T-세포주는 Th1 시토킨을 분비하고 하나의 T-세포주는 Th2 시토킨을 분비하였다. IL-5/IFN-감마 비율은 다른 자작나무 샘플에 영향을 받지 않는다.

<574> 결론:

<575> nBet v 1에 대한 특이적 자극을 나타내는 모든 PBL 배양액 및 7/8의 T-세포주는 또한 rBet v 1 및 돌연변이체에 대하여 반응한다. 이들 데이터는 T-세포 자극의 경우에 Bet v 1 또는 이들 4개의 돌연변이체의 단일 아이소폼은 천연 알레르겐 제조물에서 발견된 개별적인 아이소폼의 혼합물로 대체될 수 있다. 그리하여, 재조합 알레르겐 또는 이들 4개의 돌연변이체에 기초한 백신은 존재하는 Bet v 1 특이적 T-세포 개체군을 어드레싱할 것이다.

<576> 실시예 10

<577> **재조합 및 돌연변이체 Bet v 1 단백질을 이용한 면역화 후 Bet v 1 특이적 IgG 항체 및 블로킹 항체의 유도**

<578> 이 실시예에서, "블로킹 항체"는 사람 IgE 항체와 다르고, 항원에 결합할 수 있고 그 항원에 대하여 사람 IgE 항체가 결합하는 것을 방해하는 항체로 정의한다.

<579> Bet v 1 특이적 IgG 항체 및 블로킹 항체를 도입하기 위하여 재조합 Bet v1 2227 야생형 단백질(rBet v 1) 및 Bet v 1 2595, 2628, 2744 및 2773 돌연변이체 단백질을 마우스의 면역화 실험으로 시험하였다.

<580> BALB/cA 마우스(각 군당 8마리)는 재조합 Bet v1 2227 야생형 단백질 또는 네 개의 돌연변이체 단백질로 복강내 주사로 면역화하였다. 마우스는 14일 동안 1회 투여량으로 4번 면역화되었다. 다른 단백질은 1.25mg/ml의 Alhydrogel(알루미늄 히드록사이드 겔, 1.3% pH 8.0-8.4, Superfos Biosector)에 접합되었다. 마우스는 1μg 단백질/1회 투여량 또는 10μg 단백질/1회 투여량 중 하나로 면역화하였다. 혈액 샘플은 0, 14, 35, 21, 49 및 63일째에 안와 채혈(orbital bleed)하는 것으로 얻었다.

<581> 특이적 IgG 항체 수준은 rBet v 1가 코팅된 미세역가플레이트 및 탐지 항체로서 비오틴화된 토끼 항 마우스 IgG 항체(Jackson)를 사용하는 직접 ELISA로 분석하였다. 재조합 Bet v1 2227 야생형 단백질 또는 네 개의 돌연변이체 단백질로의 면역화는 강한 r Bet v 1 특이적 IgG 반응을 유도한다. 이러한 발견은 네 개의 돌연변이화된 단백질은 Bet v 1 2227 야생형 단백질에 대하여 고도로 교차 반응적인 항체를 유도할 수 있다는 것을 예증한다.

<582> 블로킹 항체의 유도를 평가하기 위하여, 자작나무 꽃가루 알레르기 개체로부터의 혈청 샘플을 모노클로날 마우스 항-인간 IgE 항체로 코팅된 상자성 비드(bead)와 배양하였다. 배양 후, 비드를 세척하였고, 완충용액 또는 비면역화된 마우스(비교대조군)의 마우스 혈청 샘플 또는 상기와 같이 면역화된 마우스의 마우스 혈청의 샘플의 희석 샘플(1:100) 중에 현탁시켰다. 그리고 나서, 비오틴화된 r Bet v 1을 비드와 마우스 혈청 항체의 혼합물에 첨가하였다. 배양 후, 비드를 세척하였고, 결합된 비오틴화된 rBet v 1을 아크리디늄 표지화된 스트렙타비딘을 사용하여 검출하였다. 비면역화된 마우스의 혈청과의 비드의 배양은 비드에 대한 r Bet v 1의 결합에 변화를 가져오지 않았다. 대조적으로, 재조합 Bet v1 2227 야생형 단백질 또는 네 개의 돌연변이체 단백질로 면역화된 마우스의 혈청과 비드를 배양한 경우, 비드에 대한 r Bet v 1의 결합이 현저하게 감소하였고, 이것은 혈청 샘플에서 Bet v 1 특이적 블로킹 항체의 존재를 예증한다. 그러므로, 제63일에서 모든 고투여량(10μg/1회 투여량) 면역화 군으로부터의 하나 이상의 혈청 샘플은 비드에 대한 r Bet v1의 결합을 80%를 넘게 감소시킬 수 있었다. 이러한 발견은 4개의 돌연변이화된 단백질은 Bet v 1 특이적 블로킹 항체로서 작용할 수 있는 항체를 유도할 수 있다는 것을 입증한다.

<583>

참고 문헌

1. WO 97/30150 (Pangenetics B.V., Molecules for the induction of immunological tolerance)
2. WO 92/02621 (Biomay Biotechnik Produktions- und Handelsgesellschaft mbH, Allergens of Alder pollen and applications thereof)
3. WO 90/11293 (Immunologic Pharmaceutical Corporation, The University of North Carolina at Chapel Hill, Allergenic proteins from ragweed and uses thereof)
4. Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, Okudaira H, Okumura Y: "Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy". *Nat Biotechnol* 15, 754-758 (1997).
5. Smith AM, Chapman MD: "Localization of antigenic sites on Der p 2 using oligonucleotide-directed mutagenesis targeted to predicted surface residues". *Clin Exp Allergy* 27, 593-599 (1997).
6. Aki T, Ono K, Hidaka Y, Shimonishi Y, Jyo T, Wada T, Yamashita M, Shigeta S, Murooka Y, Oka S: "Structure of IgE epitopes on a new 39-kD allergen molecule from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*". *Int Arch Allergy Immunol* 103, 357-364 (1994).
7. Förster E, Dudler T, Gmachl M, Aberer W, Urbanek R, Suter M: "Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with Hymenoptera allergy". *J Allergy Clin Immunol* 95, 1229-1235 (1995).

<584>

8. Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannan GA: "Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity". *Eur J Biochem* 245, 334-339 (1997).
9. Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G, Helm RM, West CM, Bannan GA: "Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2". *Arch Biochem Biophys* 342, 244-253 (1997).
10. Ferreira F, Rohlfs A, Hoffmann-Sommergruber K, Schenk S, Ebner C, Briza P, Jilek A, Kraft D, Breitenbach M, Scheiner O: "Modulation of IgE-binding properties of tree pollen allergens by site-directed mutagenesis". *Adv Exp Med Biol* 409, 127-135 (1996).
11. Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, Grimm R, Jah-Schmid B, Breiteneder H, Kraft D, Breitenbach M, Rheinberger H-J, Scheiner O, "Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: Potential use of hypeallergenic variants for immunotherapy", *FASEB Journal for Experimental Biology* Vol. 12, No. 2, February 1998, 231-242 (1998).
12. Wiedemañ P, Giehl K, Almo SC, Fedorov AA, Girvin M, Steinberger P, Rüdiger M, Ortner M, Sippl M, Dolecek C, Kraft D, Jockusch B, Valenta R: "Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody". *J Biol Chem* 271, 29915-29921 (1996).
13. Alvarez AM, Fukuhara E, Nakase M, Adachi T, Aoki N, Nakamura R, Matsuda T: "Four rice seed cDNA clones belonging to the alpha-amylase/trypsin inhibitor gene

family encode potential rice allergens". *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 1304-1308 (1995).

14. Colombo P, Kennedy D, Ramsdale T, Costa MA, Djro G, Izzo V, Salvadori S, Guerrini R, Cocchiara R, Mirisola MG, Wood S, Geraci D, *Journal of Immunology* Vol. 160, No. 6, 15 March 1998, 2780-2875.

15. Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, Aasmul-Olsen S, Larsen MR, Mørtz E, Roepstorff P, Larsen JN: "Characterization of Purified Recombinant Bet v 1 with Authentic N-terminus, Cloned in Fusion with Maltose-Binding Protein". *Prot Exp Purification* 8, 365-373 (1996a).

16. Ipsen H, Wihl J-Å, Petersen BN, Løwenstein H: "Specificity mapping of patients IgE response towards the tree pollen major allergens Aln g I, Bet v I and Cor a I." *Clin. Exp. Allergy* 22, 391-9, (1992)

17. Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Løwenstein H, and Spangfort MD: "X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy". *Nature structural biology* 3, 1040-1045 (1996).

18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ: "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).

19. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680 (1994).

20. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239, 487-491 (1988).
21. Spangfort MD, Larsen JN, Gajhede M: "Crystallization and Preliminary X-ray Investigation at 2.0 Å Resolution of *Bet v 1*, a Birch Pollen Protein Causing IgE-Mediated Allergy". *PROTEINS, Struc Func Genet* 26, 358-360 (1996b).
22. Monsalve RI, Lu G, and King TP: "Recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*) by expression in bacteria or yeast" (1999) Submitted.
23. Fang KSF, Vitale M, Fehlner P and King TP: "cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 895 (1988).
24. Lu G, Villalba M, Coscia MR, Hoffman DR and King TP: "Sequence Analysis and Antigenic Cross-reactivity of a Venom Allergen, Antigen 5, from Hornets, Wasps, and Yellow Jackets". *Journal of Immunology* 150, 2823-2830 (1993).
25. Punnonen J: "Molecular Breeding of Allergy Vaccines and Antiallergic Cytokines". *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:173-182.
26. P.A. Würtzen, M. Wissenbach, H. Ipsen, A. Bufe, J. Arved, and R. J. J. van Neerven. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104: 115-23.
27. Sparholt SH, Larsen JN, Ipsen H, Schou C, van Neerven RJ. *Clin Exp Allergy* 1997 Aug;27(8):932-41.

<587>

도면의 간단한 설명

- <32> 도 1은 *Bet v 1* 돌연변이체 1에 사용된 돌연변이체 특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 보여준다. 밑줄은 돌연변이된 뉴클레오티드이다.
- <33> 도 2는 두개의 일반적으로 응용가능한 프라이머("모두-센스, 및 "모두 년센스"라고 명명된)이며, 이들은 합성되었고 모든 돌연변이체에 사용되었다.
- <34> 도 3은 자연 발생적인 알레르겐 *Bet v 1* 뿐만 아니라 다수의 *Bet v 1* 돌연변이들의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다.
- <35> 도 4는 비-비오틴화된 *Bet v 1* 및 *Bet v 1 Glu45Ser* 돌연변이체에 의한, 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 *Bet v 1*의 결합 저해를 보여준다.

- <36> 도 5는 비-비오틴화된 Bet v 1 및 Bet v 1 Asn28Thr+Lys32Gln 돌연변이체에 의한, 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합 저해를 보여준다.
- <37> 도 6은 비-비오틴화된 Bet v 1 및 Bet v 1 Pro108Gly 돌연변이체에 의한 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합 저해를 보여준다.
- <38> 도 7은 비-비오틴화된 Bet v 1 및 Bet v 1 Glu60Ser 돌연변이체에 의한 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합 저해를 보여준다.
- <39> 도 8은 거의 같은 농도에서 기록된 재조합 및 삼중-패치 돌연변이체의 CD 스펙트럼을 보여준다.
- <40> 도 9는 비-비오틴화된 Bet v 1 및 Bet v 1 삼중-패치 돌연변이체에 의한 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Bet v 1의 결합 저해를 보여준다.
- <41> 도 10a 내지 도 10d는 개별적으로 정렬된 항원 5의 용매 접근성 및 *Vespula* 항원 5의 정렬을 보여준다(왼쪽 패널). 도 10의 오른쪽 패널은 *Vespula* 항원 5:s 간에 보존된 영역을 가진 항원 5의 분자 표면을 보여준다.
- <42> 도 11은 센스 가닥으로부터 유래한 Ves v 5의 아미노 말단에 상응하는 프라이머 서열을 보여준다. 하류 프라이머의 서열은 넌센스 가닥으로부터 유래하였다.
- <43> 도 12는 두개의 일반적으로 응용가능한 프라이머("모두 센스" 및 "모두 넌센스"라고 명명된)를 나타내며, 이는 합성되었고 모든 돌연변이체에 대하여 사용된다.
- <44> 도 13은 자연발생적인 알레르겐 Ves v 5 뿐만 아니라 2개의 Ves v 5 돌연변이들의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다.
- <45> 도 14는 비-비오틴화된 Ves v 5 및 Ves V 5 Lys72Ala 돌연변이체에 의한, 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화된 재조합 Ves v 5의 결합 저해를 보여준다.
- <46> 도 15는 IgE 교차결합에 의한 알레르겐 및 마스터 세포 사이의 반응에 대한 이론적 모델을 보여준다.
- <47> 도 16은 자연발생적인 알레르겐 Der p2의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다.
- <48> 도 17은 돌연변이를 생성하기 위하여 사용된 프라이머를 도식적으로 보여준다. (I)은 센스 및 안티센스 프라이머를 나타내며, (II)는 지정된 위치에 돌연변이를 가지는 최종적 재조합 단백질을 나타낸다.
- <49> 도 18은 Bet v 5 돌연변이체의 구조 및 사용된 프라이머의 목록의 예시를 보여준다. 돌연변이체들은 5 내지 9개의 아미노산을 포함한다.
- <50> 도 19는 Bet v 1(2628) 및 Bet v 1(2637)에 있는 도입된 점 돌연변이들을 나타낸다. Bet v 1(2628) 돌연변이체에서는, 5개의 1차 돌연변이가 Bet v 1의 절반에 도입되고, 나머지 절반은 변형되지 않았다. Bet v 1(2637)에서는, 5개의 1차 및 3개의 2차 돌연변이가 나머지 절반에 도입되고, 처음 절반은 변화되지 않았다.
- <51> 도 20은 재조합 Bet v 1.2801(야생형) 및 Bet v 1(2637) 돌연변이체의 원형 이색성(CD) 스펙트럼을 나타내며, 이들은 거의 같은 농도에서 기록되었다.
- <52> 도 21은 비-비오틴화된 Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1(2637), 및 Bet v 1(2628)과 Bet v 1(2637)의 1:1 혼합에 의한, 알레르기 개체의 울혈로부터의 혈청 IgE에 대한 비오틴화 재조합 Bet v 1.2801(야생형)의 결합 저해를 나타낸다.
- <53> 도 22는 Bet v 1.2801(야생형), Bet v 1(2628), 및 Bet v 1(2637)의 인간 호염기구 세포(human basophil cell)에서의 히스타민 방출을 나타낸다.
- <54> 도 23은 Bet v 1.2801(야생형), Bet v 1(2628), 및 Bet v 1(2637)의 인간 호염기구 세포에서의 히스타민 방출을 나타낸다.
- <55> 도 24는 Bet v 1(2744)의 표면에 있는 점 돌연변이를 나타낸다.
- <56> 도 25는 Bet v 1(2753)의 표면에 있는 점 돌연변이를 나타낸다.
- <57> 도 26은 Bet v 1(2744) 및 Bet v 1(2753)의 표면에 있는 점 돌연변이를 나타낸다.
- <58> 도 27은 Bet v 1.2801(야생형) 및 Bet v 1(2744)의 원형 이색성(CD) 스펙트럼을 나타내며, 이들은 거의 같은

농도에서 기록되었다.

- <59> 도 28은 Bet v 1.2801(야생형) 및 돌연변이체 Bet v 1(2744)의 인간 호염기구 세포에서의 히스타민 방출을 나타낸다.
- <60> 도 29A 내지 도 29D는 Bet v 1.2801(야생형) 및 돌연변이체 Bet v 1(2744)의 인간 호염기구 세포에서의 히스타민 방출을 나타낸다.
- <61> 도 30은 Bet v 1(2733)의 표면에 있는 점 돌연변이를 나타낸다.
- <62> 도 31은 Der p 2의 특정부위적 돌연변이화에 사용된 프라이머를 나타낸다.
- <63> 도 32a 내지 도 32c는 다른 그룹 2의 집 먼지 진드기 알레르겐들과 Der p 2의 서열 정렬을 보여준다.
- <64> 도 33은 4개의 다른 각도에서 본 Der p 2의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <65> 도 34는 4개의 다른 각도에서 본 Der p 2 돌연변이체의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <66> 도 35Aa 내지 도 35Ac, 및 35Ba 내지 도 35Bc는 Der p 1과 다른 그룹 1의 집 먼지 진드기 알레르겐의 서열 정렬을 보여준다.
- <67> 도 36은 4개의 다른 각도에서 본 Der p 1의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <68> 도 37은 4개의 다른 각도에서 본 Der p 1 돌연변이체의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <69> 도 38Aa 내지 도 38Ac, 및 도 38Ba 내지 도 38Bc, 및 도 38Ca 내지 도 38Cc, 및 도 38Da 내지 도 38Dd는 다른 그룹 5의 풀(grass) 알레르겐들과 Ph1 p 5의 서열 정렬을 나타낸다.
- <70> 도 39A 및 39B는 각각 4개의 다른 각도에서 본 Ph1 p 5의 모델 A 및 모델 B의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <71> 도 40A 및 40B는 각각 4개의 다른 각도에서 본 Ph1 p 5 돌연변이의 모델 A 및 B의 표면 윤곽을 나타낸다.
- <72> 도 41은 여러가지 Bet v 1 제조를 위한 자극 지수(SI)로 표현된 말초혈 임파구의 증식을 나타낸다.
- <73> 도 42 내지 44는 여러가지 Bet v 1 제조로 자극된 T 세포의 사이토카인 프로필을 나타낸다. 도 42는 Th0 프로필을, 도 43은 Th1 프로필을, 도 44는 Th2 프로필을 가진 개체를 보여준다.

도면

도면1

돌연변이체 1에 사용된 돌연변이체-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머.

밑줄은 돌연변이된 뉴클레오티드이다.

Bet v 1 센스	5' - AATTATGAGACTGAGACC <u>CCTCTGTTATCC</u> CAGCAGCTCG -3'
Bet v 1 년-센스	3' - TTAATACTCTGACTCTGGT <u>GGAGACA</u> ATAGGGTCGTCGAGC -5'
센스 프라이머	5' - TGAGACC <u>CCTCTGTTATCC</u> CAG -3'
년-센스 프라이머	3' - A <u>TACTCTGACTCTGGGG</u> GAGACA -5'

도면2

Bet v 1 (No. 2801)의 부위지정 돌연변이 유발을 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머들.

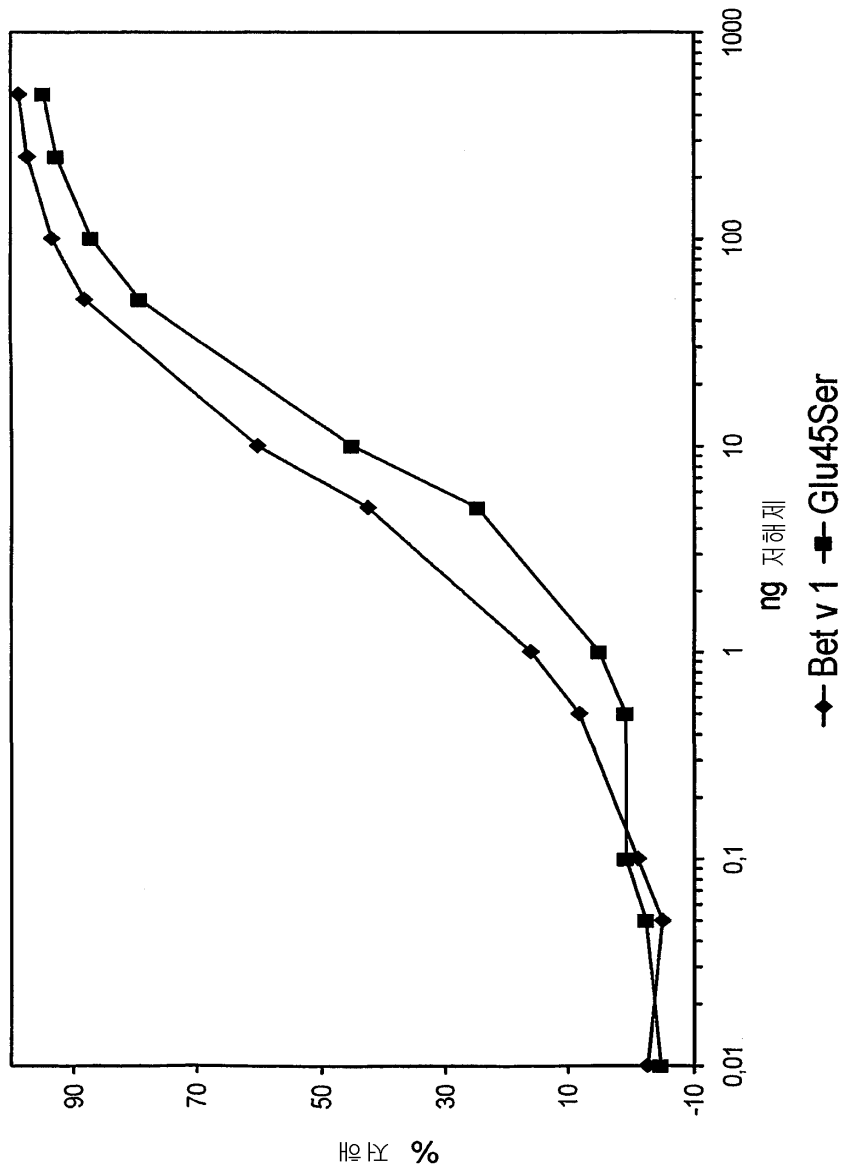
모두	센스	1: 183Bv, 15-머	5'-GTTGCCAACGATCAG
1	센스	2: 184Bv, 23-머	5'-TGAGACCCCTCTGTTATCCCAG
1	역-센스	3: 185Bv, 23-머	5'-ACAGAGGGGTCTCAGTCTCATA
2	센스	4: 186Bv, 31-머	5'-GATACCCTCTTTCCACAGGTTGCACCCCAAG
2	역-센스	5: 187Bv, 31-머	5'-ACCTGTGGAAGAGGGTATCGCCATCAAGGA
3	센스	6: 188Bv, 23-머	5'-AACATTCAGGAAATGGAGGGCC
3	역-센스	7: 189Bv, 23-머	5'-TTTCCTGAAATGTTTTCAACT
4	센스	8: 190Bv, 23-머	5'-TTAAGAACATCAGCTTTCCCGAA
4	역-센스	9: 191Bv, 23-머	5'-AGCTGATGTTCTTAATGGTTCCA
5	센스	10: 192Bv, 23-머	5'-GGACCATGCAAACCTTCAAATACA
5	역-센스	11: 193Bv, 23-머	5'-AGTTTGCATGGTCCACCTCATCA
6	센스	12: 194Bv, 23-머	5'-TTTCCTCAGGCCTCCCTTTCAA
6	역-센스	13: 195Bv, 23-머	5'-AGGCCTGAGGGAAGCTGATCTT
7	센스	14: 196Bv, 24-머	5'-TGAAGGATCTGGAGGGCCTGGAAC
7	역-센스	15: 197Bv, 24-머	5'-CCCTCCAGATCCTTCAATGTTTTC
8	센스	16: 198Bv, 24-머	5'-GGCAACTGGTGTGGAGGATCCAT
8	역-센스	17: 199Bv, 24-머	5'-CCATCACCAGTTGCCACTATCTTT
모두	역-센스	18: 200Bv, 15-머	5'-CATGCCATCCGTAAG

도면3

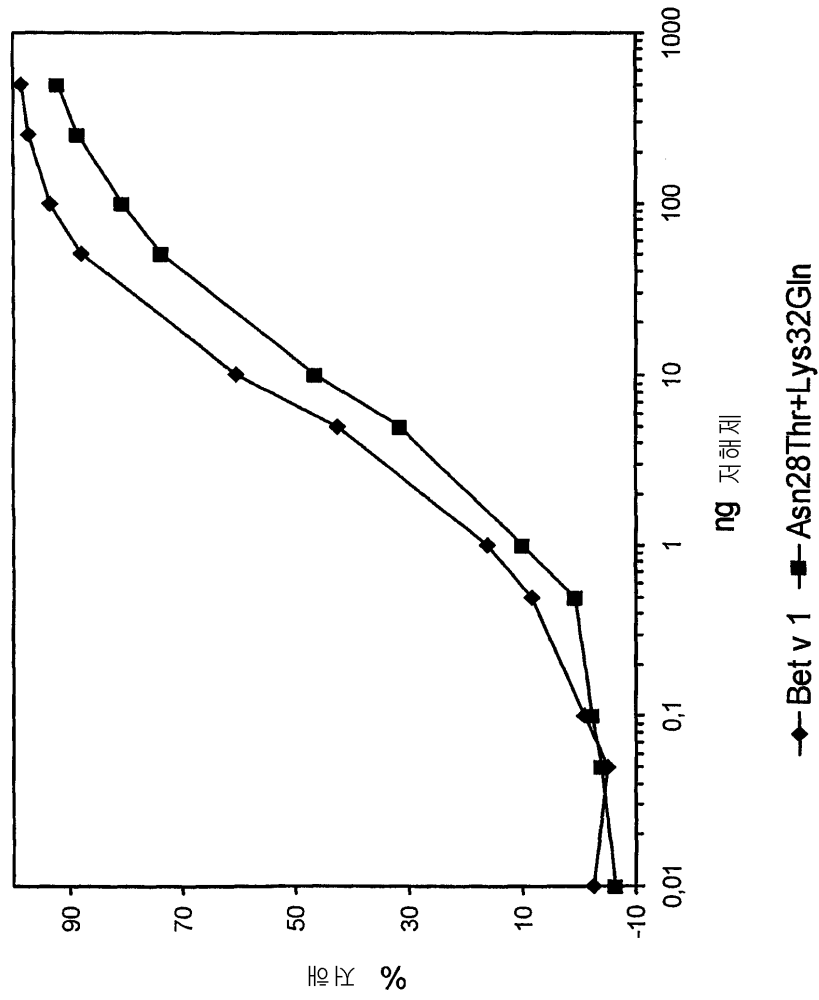
모든 Bet v 1 돌연변이의 개요

1 (A-C)		
GGTGTGTTTAATTATGAGACTGAGACC <u>ACCTCTGTTATCCAGCAGCTCGACTGTTCAAG</u>		60
G V F N Y E T E T T-P S V I P A A R L F K		20
9 (A-G) 2 (A-C) 2 (A-C)		
GCCTTTATCCTTGATGGCGATA <u>ACCTCTTCCAAAGGTTGCACCCCAAGCCATTAGCAGT</u>		120
A F I L D-G G D N-T L F P K-Q V A P Q A I S S		40
3 (GA-TC) 7 (AA-TC) 4 (G-C) 6 (GA-TC)		
GTTGAAAACATT <u>GAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTCCCGAA</u>		180
V E N I E-S G N-S G G P G T I K K-N I S F P E-S		60
5 (CA-TG)		
GGCCTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACACAACTTCAA		240
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K		80
TACAATTACAGCGTATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAGATCTCCAAC		300
Y N Y S V I E G G P I G D T L E K I S N		100
10 (GAG-CAC) 8 (CCC-TGG)		
<u>GAGATAAAGATAGTGGCAACCCCTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAGTAC</u>		360
E I K I V A T P-G D G G S I L K I S N K Y		120
CACACCAAGGTGACCATGAGGTGAAGGCAGAGCAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATGGGC		420
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G		140
GAGACACTTTTGAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAATAA		480
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N stop		159

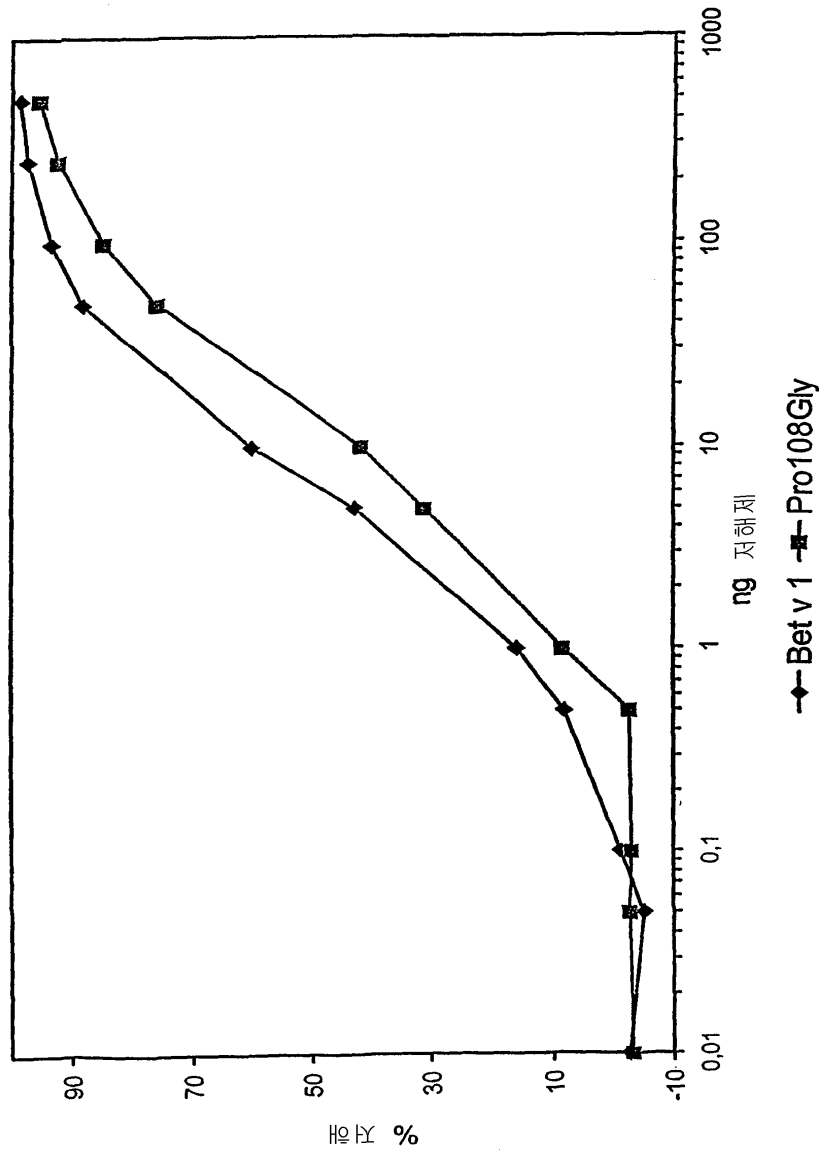
도면4



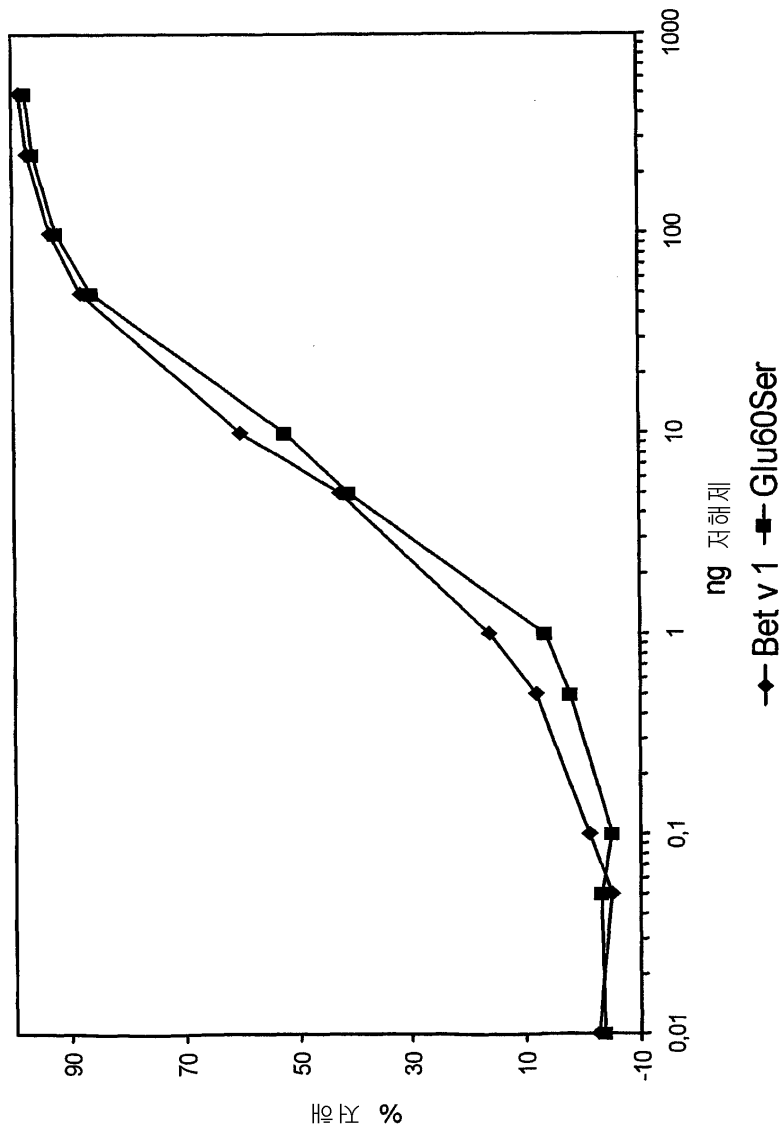
도면5



도면6

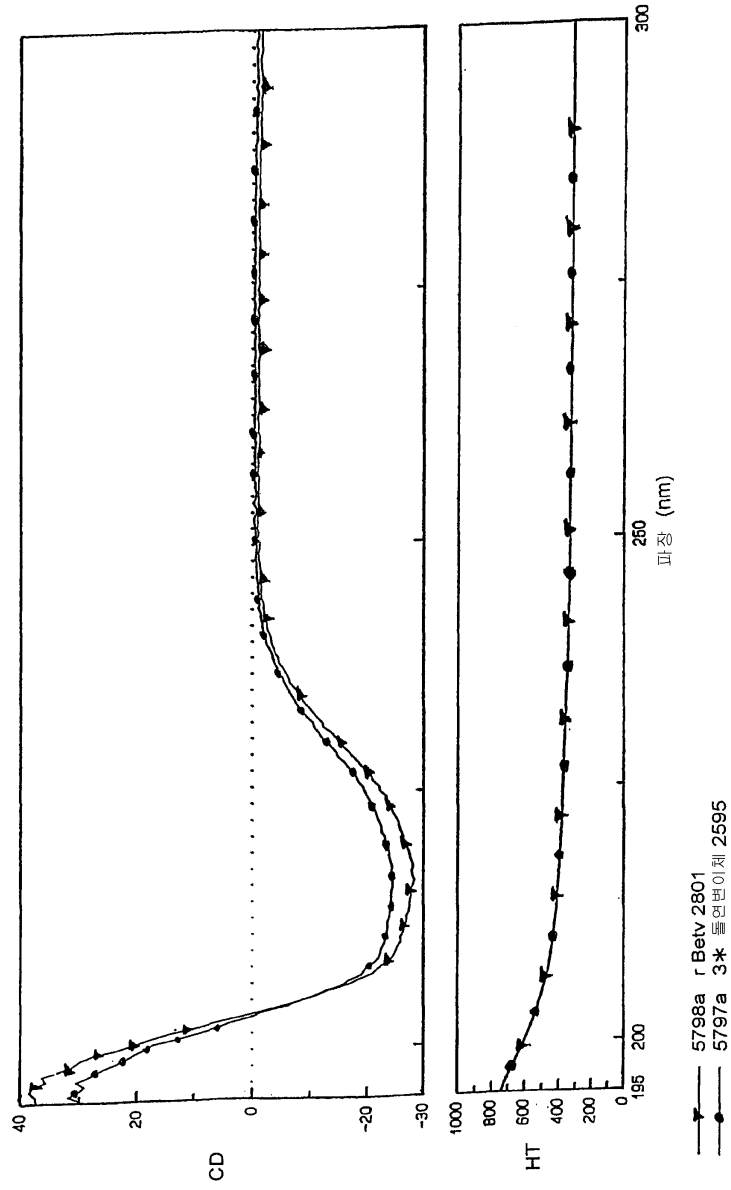


도면7

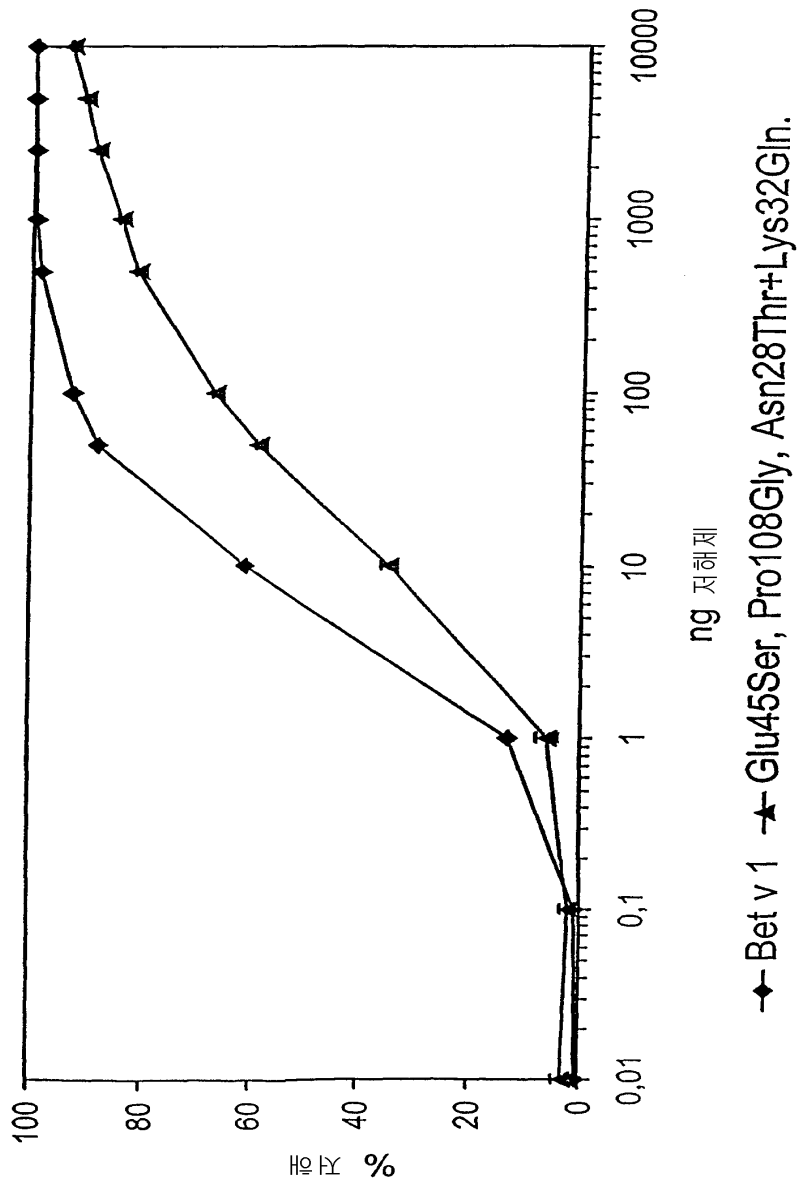


도면8

10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.02% Na_3N_3

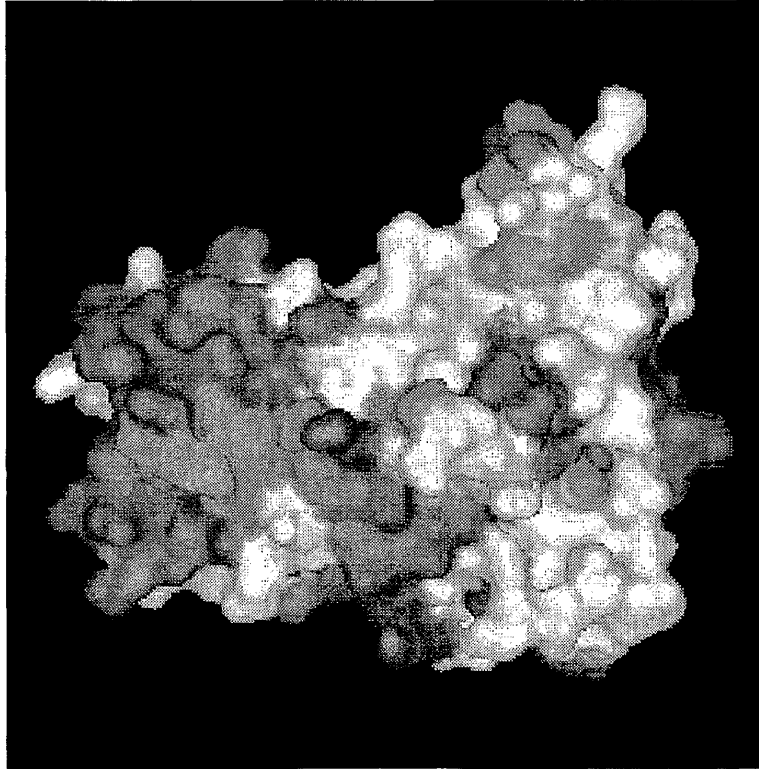


도면9

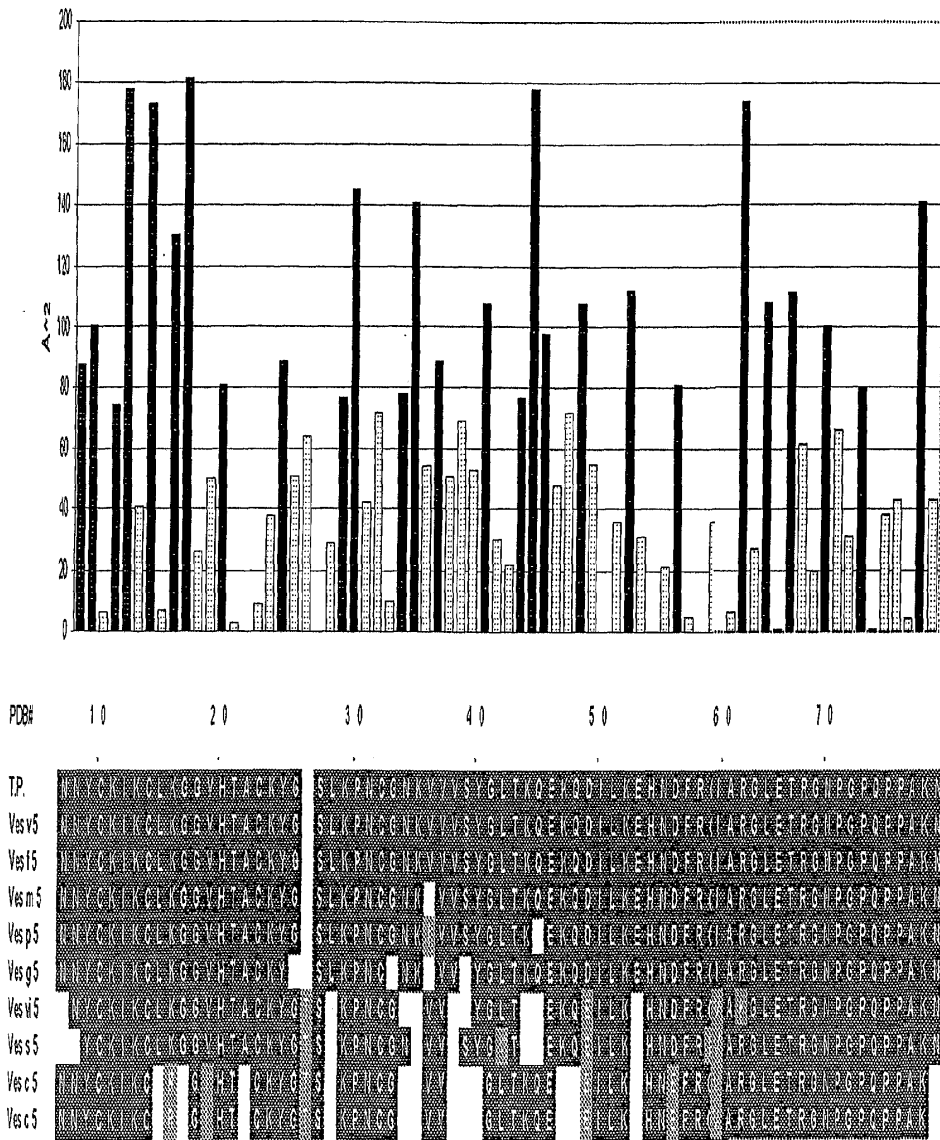


도면10a

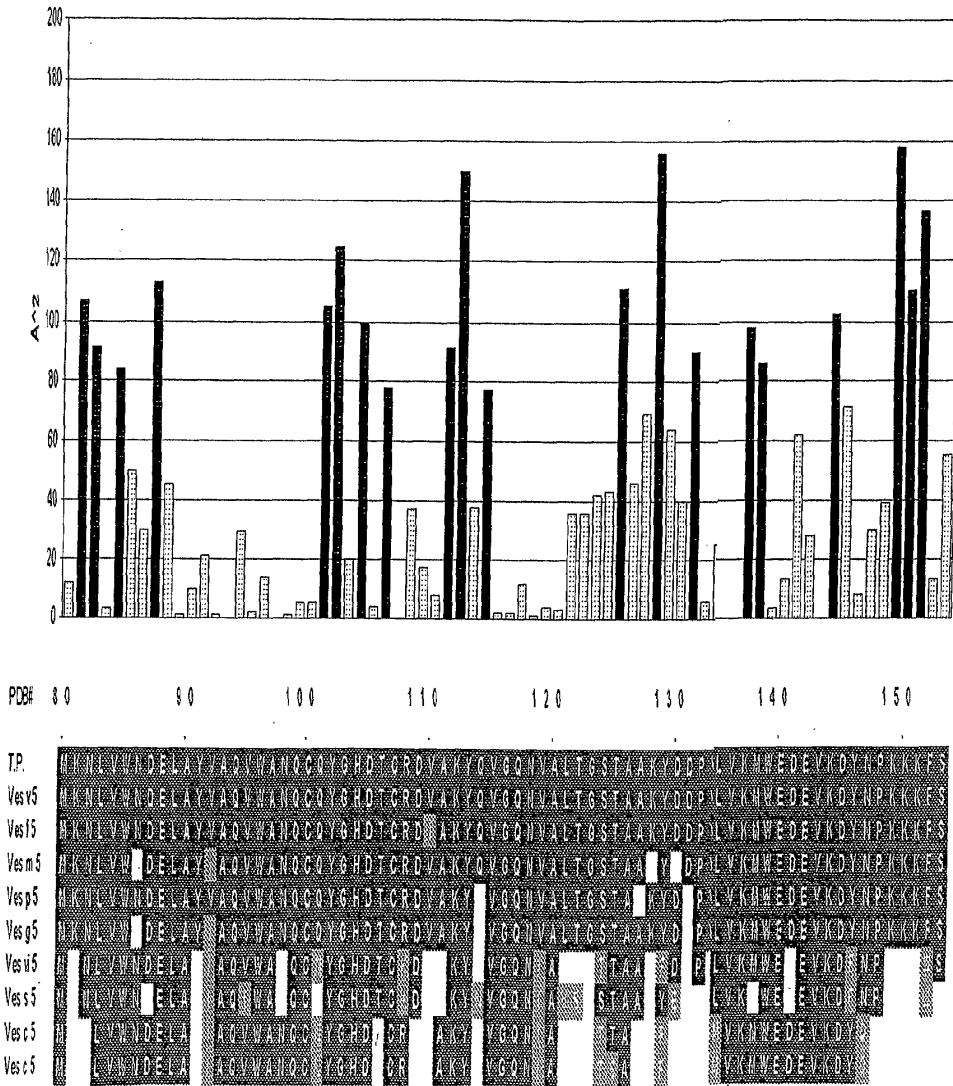
Vespula 항원 5 간에
보존된 잔기들



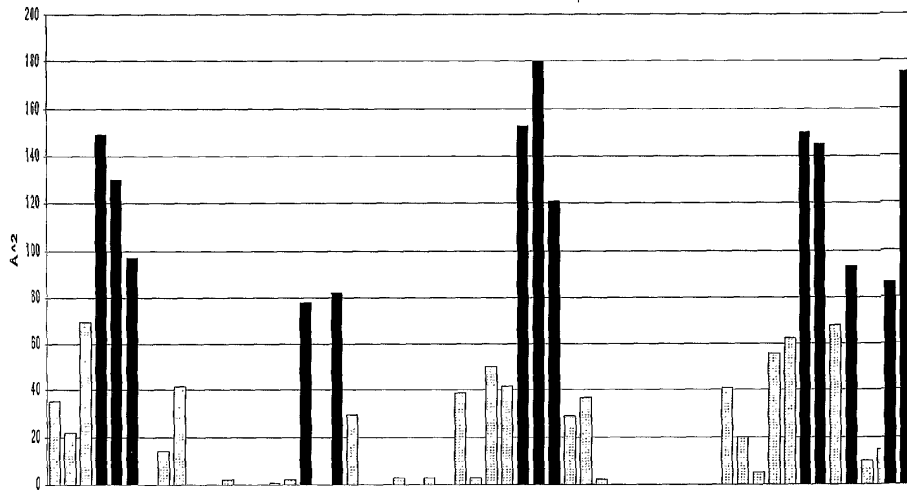
도면10b



도면10c



도면10d



PDB#	160	170	180	190	200	120
T.P	GNDFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves v 5	GNDFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves f 5	GNDFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves m 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves p 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves g 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves vi 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves s 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves c 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK
Ves c 5	NFLKRTGHY	QNVWANTKE	GGGSIKYIQE	KWHKHLYLVC	NYGPSGNF	KNEELTK

도면11

Ves v 5 돌연변이체에 사용되는 돌연변이체-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머.
 밑줄은 돌연변이된 뉴클레오티드를 나타낸다.

Ves v 5 돌연변이체 1 (K72A)

Ves v 5 센스	5'- ACCACAGCCTCCAGCGAAGAATATGAAAAATTTGGTATGGA	-3'
Ves v 5 년-센스	3'- TGGTGTCCGAGGTCGCTTCTTATACTTTTAAACCATACCT	-5'
센스 프라이머	5'- CCAGCGGCTAATATGAAAAAT	-3'
년-센스 프라이머	3'- GTCGGAGGTCGCCGATTATAC	-5'

Ves v 5 돌연변이체 2 (Y96A)

Ves v 5 센스	5'- GGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACTTGCAGGGATG	-3'
Ves v 5 년-센스	3'- CCGATTAGTTACAGTTATACCAGTGCTATGAACGTCCCTAC	-5'
센스 프라이머	5'- TGTCAAGCTGGTCACGATACT	-3'
년-센스 프라이머	3'- TTAGTTACAGTTCGACCAGTG	-5'

도면12

Ves v 5의 부위지정 돌연변이 유발을 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머.

모두 센스 1: XhoI 개시 , 38- 머 :

EcoRI
 5'-CCGCTCGAGAAAAGAAACAATTATTGTAAAATAAAATG
 L E K R N N Y C K I K
 Ke::2 절단 부위 Ves v 5의 아미노 말단

1	센스	1: K72As	21- 머	5'-CCAGCGGCTAATATGAAAAAT
1	년-센스	2: K72Aa	21- 머	5'-CATATTAGCCGCTGGAGGCTG

2	센스	3: Y96As	21-머	5'-TGTCAAGCTGGTCACGATACT
2	년-센스	4: Y96Aa	21-머	5'-GTGACCAGCTTGACATTGATT

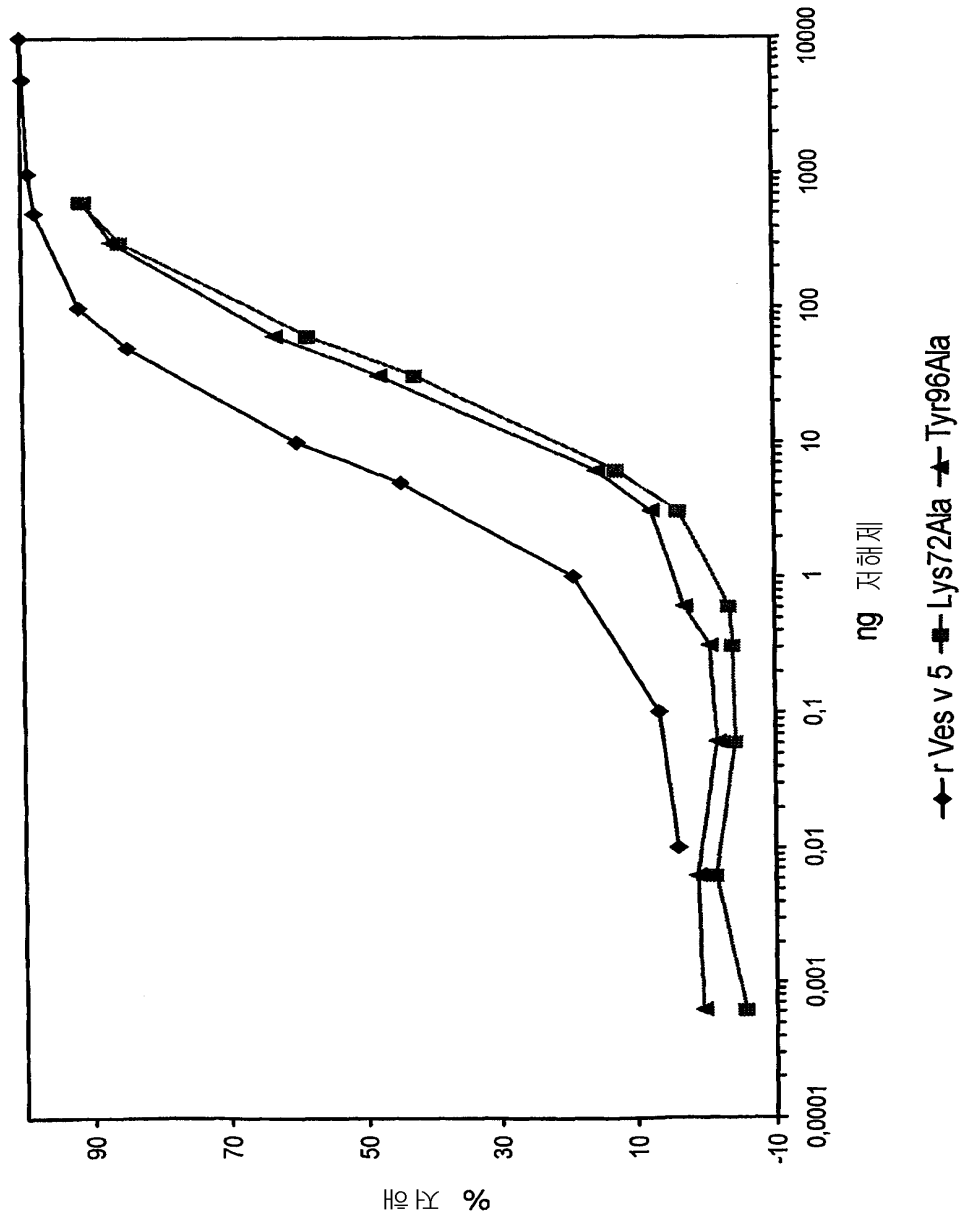
모두	년-센스	7: CT-pPICZαA,	21-머	5'-ATTCATCAGCTGCGAGATAGG
----	------	----------------	------	--------------------------

도면13

Ves v 5 돌연변이의 개요

1	AACAATTATTGTAAAAATAAAATGTTTCAAAGGAGGTGCCATACTGCCTGCAAATATGGA	60
1	N N Y C K I K C L K G G V H T A C K Y G	20
61	AGTCTTAAACCGAATTGCGGTAATAAGGTAGTGGTATCCTATGGTCTAACGAAACAAGAG	120
21	S L K P N C G N K V V V S Y G L T K Q E	40
121	AAACAAGACATCTTAAAGGAGCACAATGACTTTAGACAAAAAATGCACGAGGATTGGAG	180
41	K Q D I L K E H N D F R Q K I A R G L E	60
	1 [K72A] (AAG-GCT)	
181	ACTAGAGGTAATCCTGGACCACAGCCTCCAGCGAAGAATATGAAAAATTTGGTATGGAAC	240
61	T R G N P G P Q P P A K N M K N L V W N	80
	2 [Y96A] (TA-GC)	
241	GACGAGTTAGCTTATGTCGCCCAAGTGTGGGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACT	300
81	D E L A Y V A Q V W A N Q C Q Y G H D T	100
301	TGCAGGGATGTAGCAAATATCAGGTTGGACAAAACGTAGCCTTAACAGGTAGCACGGCT	360
101	C R D V A K Y Q V G Q N V A L T G S T A	120
361	GCTAAATACGATGATCCAGTTAACTAGTTAAAATGTGGGAAGATGAAGTGAAGATTAT	420
121	A K Y D D P V K L V K M W E D E V K D Y	140
421	AATCCTAAGAAAAAGTTTTCGGGAACGACTTTCTGAAAACCGGCCATTACACTCAAATG	480
141	N P K K K F S G N D F L K T G H Y T Q M	160
481	GTTTGGGCTAACACCAAGGAAGTTGGTTGTGGAAGTATAAAATACATTCAAGAGAAATGG	540
161	V W A N T K E V G C G S I K Y I Q E K W	180
541	CACAAACATTACCTTGTATGTAATTATGGACCCAGCGGAACTTTAAGAATGAGGAACTT	600
181	H K H Y L V C N Y G P S G N F K N E E L	200
601	TATCAAACAAAGTAA	612
201	Y Q T K stop	204

도면14



우세한 IgE 에피토프에 대한 정 돌연변이의 효과
3가지 에피토프에 대한 가상의 모델



교차 결합됨

도 15a

교차 결합되지 않음

도 15b

도면16

DNA 서열

Der p 2 (수탁번호 P49278 SWISSPROT로 표시된 DNA 서열)

ORIGIN

```

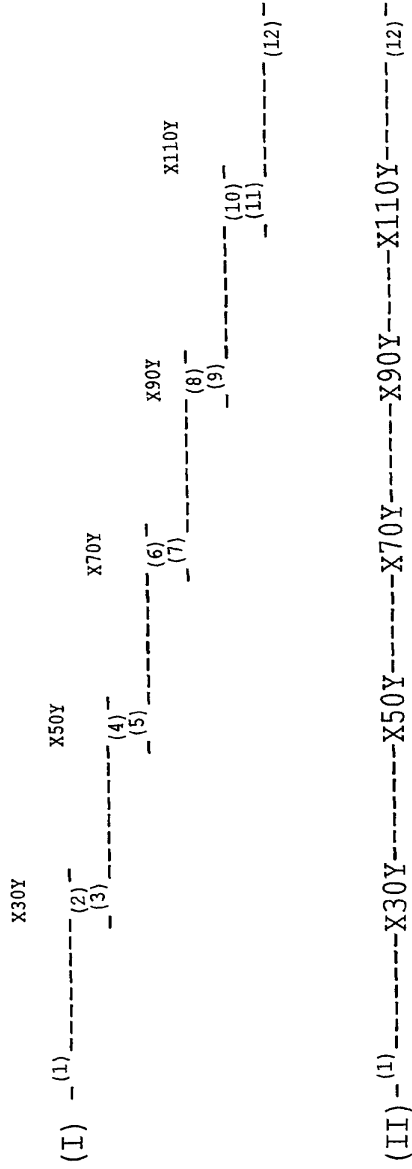
1   cacaaattct tcttcttc ttactactga tcattaatct gaaaacaaaa ccaaacaac
61  cattcaaaat gatgtacaaa atttgtgtc ttcatgtt ggtcgcagcc gttgctcgtg
121 atcaagtcga tgcacaagat tggccaatc atgaaatcaa aaaagtttg gtaccaggat
181 gccatggttc agaaccatgt atcattcatc tggtaaac accaattg gaagccgtt
241 tcgaagccaa caaaaacaca aaaacggcta aaattgaaat caaagcctca atcgatggt
301 tagaagttga tgtcccggt atcgatcaa atgatgcca ttacatgaaa tcccattgg
361 taaaggaca acaatatgat attaaatata catggaatgt tccgaaaatt gcacaaaat
421 ctgaaaatgt tgcgtcact gtaaaagta tgggtgatga tgggttttg gcctgtgcta
481 ttgctactca tgctaaaac cgcgattaaa tcaaacaaaa ttattgatt ttgtaacac
541 aatgattga tttcttcc aaaaaaaaaa taaataaaat tttggaatt c
    
```

아미노산 서열

Der p 2 (수탁번호 P49278 SWISSPROT : 신호 펩티드 1-17을 포함한다)

```

1   mmykilclsl lvaavardqv dvkdcanei kkvlvpgchg sepcihrkg pfqlavfea
61  nqntktakie ikasidglev dvpgidpnac hymkcplvkg qqydikytwn vpkiapksen
121 vvtvkvmgd dgvlacaiat hakird
    
```



선은 DNA 서열을 나타낸다.

선 위의 괄호 속의 숫자는 센스 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 나타낸다 : (1), (3), (5), (7), (9), (11).

선 아래의 괄호 속 숫자는 안티-센스 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 나타낸다 : (2), (4), (6), (8), (10), (12).

X (위치) Y 표시는 돌연변이를 나타낸다.

(1)는 단백질 N-말단을 조정하는 센스 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 나타낸다.

(12)는 단백질 C-말단을 조정하는 안티-센스 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 나타낸다.

Bet v 1 (2637)

(A16P, N28T, K32Q, K103T, P108G, L152K, A153G, S155P)

DNA 주형 : N28T, K32Q, P108G 돌연변이를 갖는 Bet v 1 (2571).

331pMalc
368Bva
367BVs
370Bva
369BVs
372Bva

331pMalc : CAGACTAAATTCGACGTCGGTACCC
 368Bva : CAGTCGcggtGCTGGGATAACAGA
 367BVs : CCAGCACccgCGACTGTTCAAGGCC
 370Bva : CACTTAIggTfATCTGCTGGAGAT
 369BVs : GAGATAcccATfAGTGGCAACTggT
 372Bva:TTACTGAATTCATTACTTCTAGGCATCcggtGgccttttCAGGTA

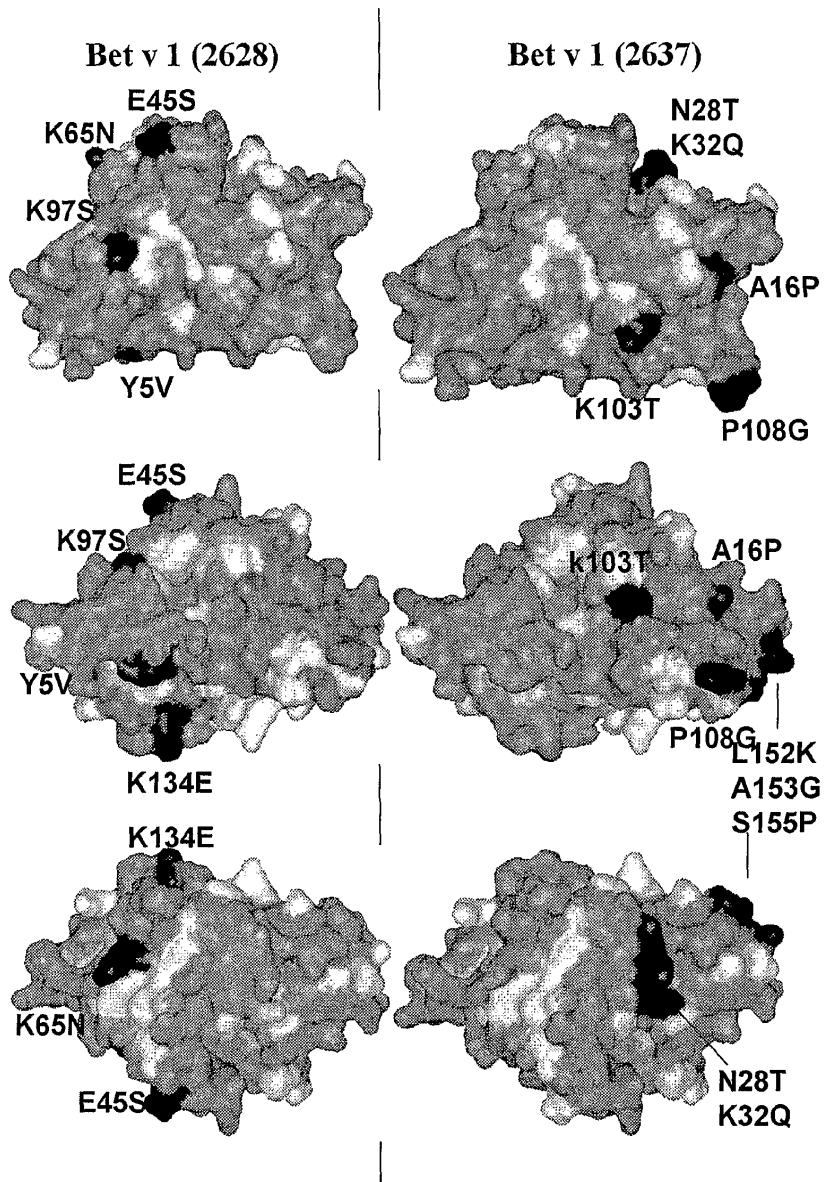
Bet v 1 (2628) (Y5V, E45s, K65N, K97s, K134E)

DNA 주형 : Y5V 돌연변이를 가지는 Bet v 1 (2589).

331pMalc(s)
189BV (a)
188BV (s)
362BV (a)
361BV (s)
364BV (a)
363BV (s)
368BV (a)
365BV (s)
332pMalc (a)

331pMal c : CAGACTAAATTCGAGCTCGGTACCC
 189BV : TTTCCTGAAATGTTTTCAACACT
 188BV : AACATTCAGGAAATGGAGGGCC
 362Bva : CACGTAGTTGAAAGGGAGCCCTTC
 361BVs : TTTCAACTACGTGAAGGACAGAGT
 364Bva : GGAGATGCTCTCCAATGTCGCC
 363BVs : GGAGAGCATCTCCAACGAGATAA
 366Bva : ACTTGCTTCAACCTGCTCTGCCCT
 365BVs : CAGGTTGAAGCAAGTAAGAAATG
 332pMal c : GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCAT

도면19



Bet v 1의 분자 표면

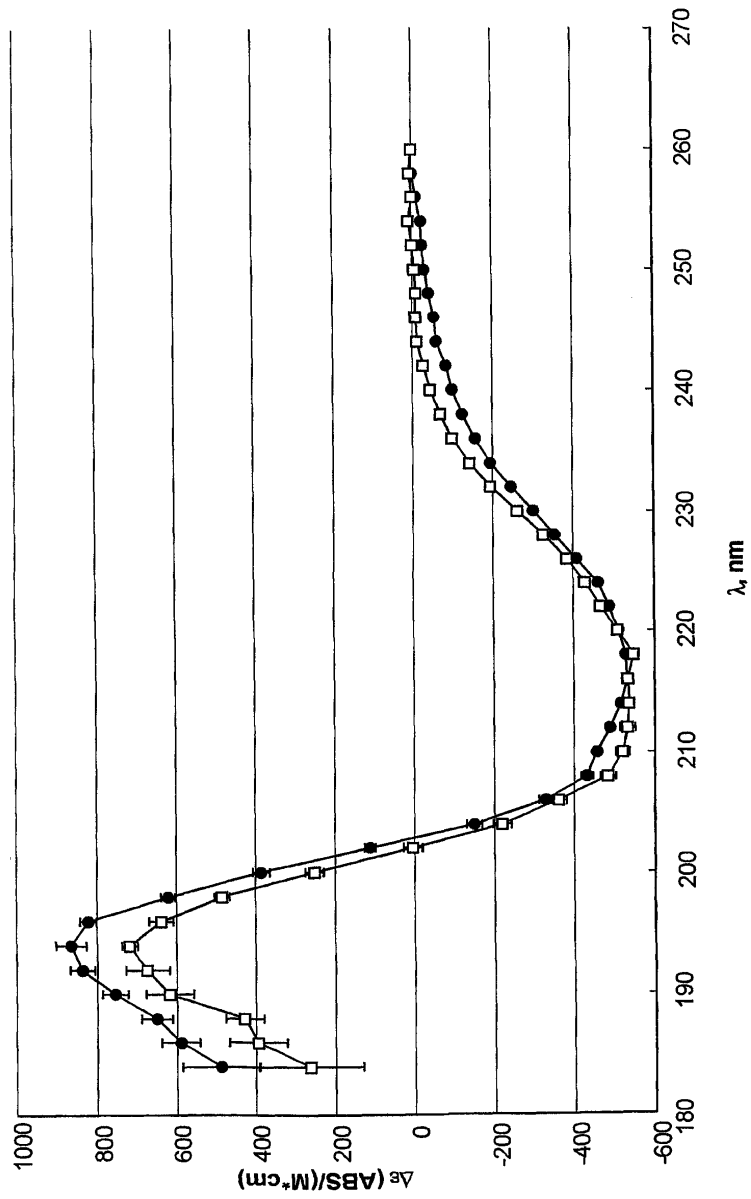
왼쪽 : Bet v 1 (2628), 오른쪽 : Bet v 1 (2637)

회색 : 꿀겨 + Fagales 간에 95-100% 보존된 아미노산 잔기들

검은색 : 도입된 점 돌연변이들

도면20

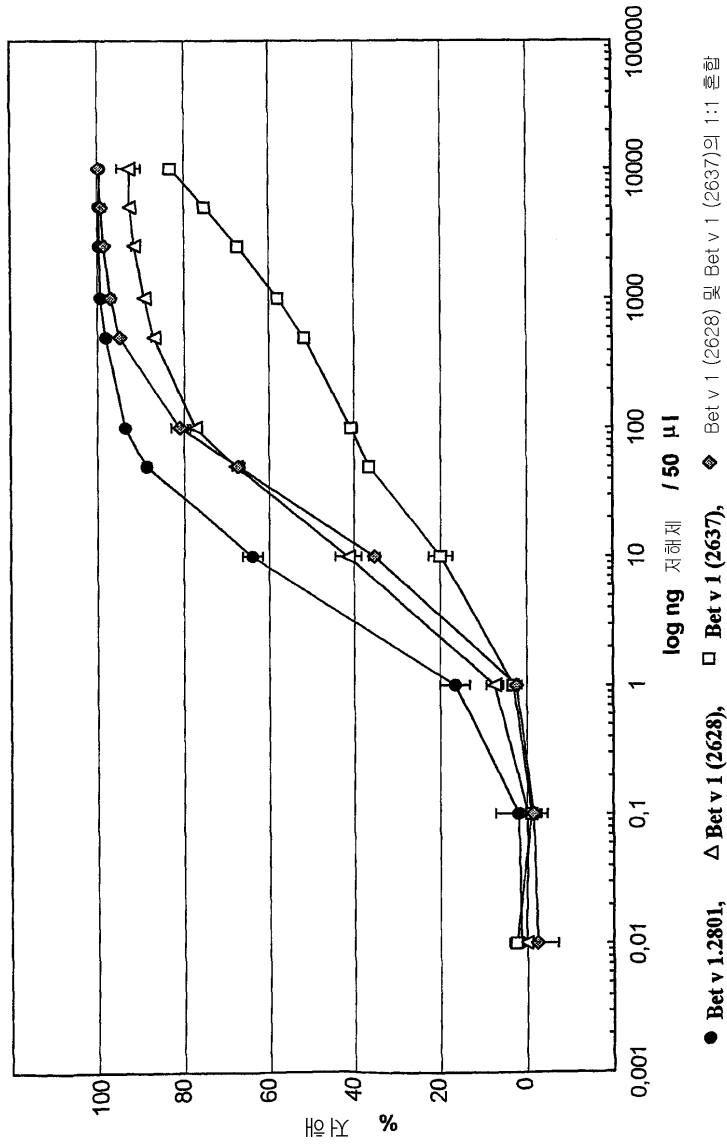
Bet v 1.2801, 및 돌연변이체 Bet v 1 (2637)의 CD-스펙트럼



Bet v 1 (2637)의 CD-스펙트럼: □, 전연 폴딩된 Bet v 1.2801의 CD-스펙트럼: ● 둘 다 20 °C 에서 측정됨.

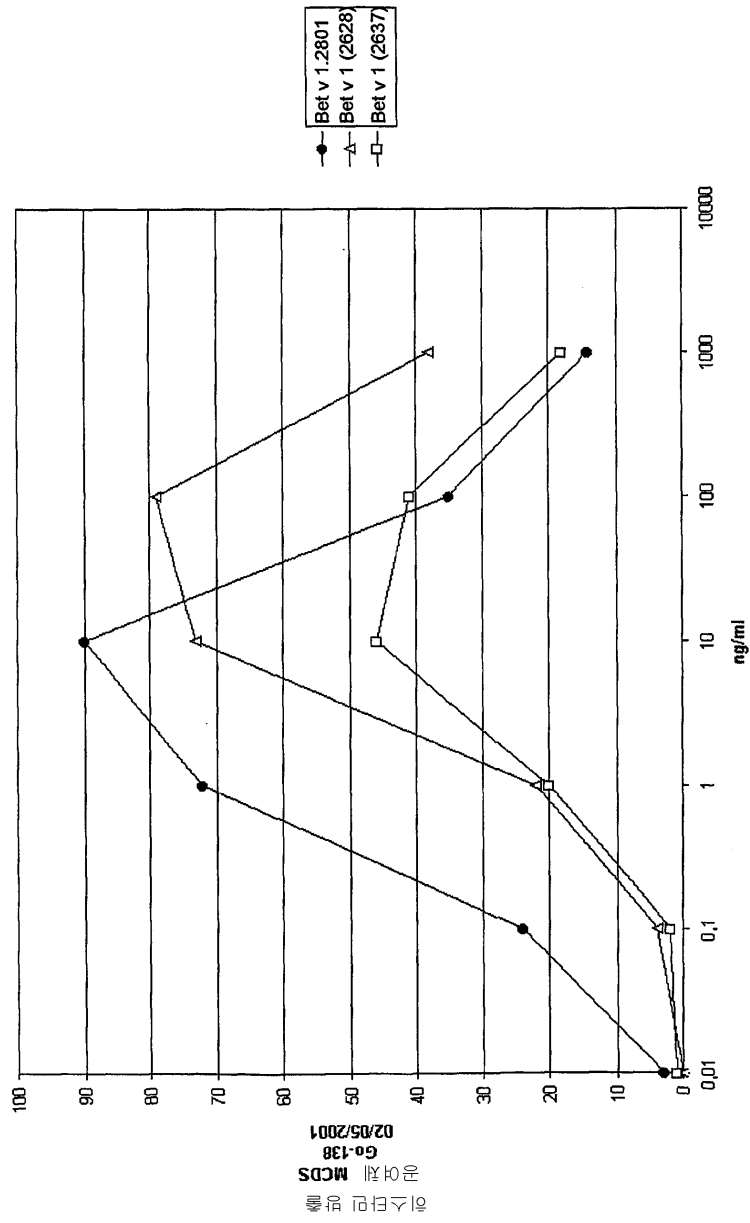
도면21

Bet v 1.2801 및 돌연변이된 Bet v 1 알레르겐에 의한, Bet v 1.2801 에
대한 인간혈청 IgE-결합의 저해



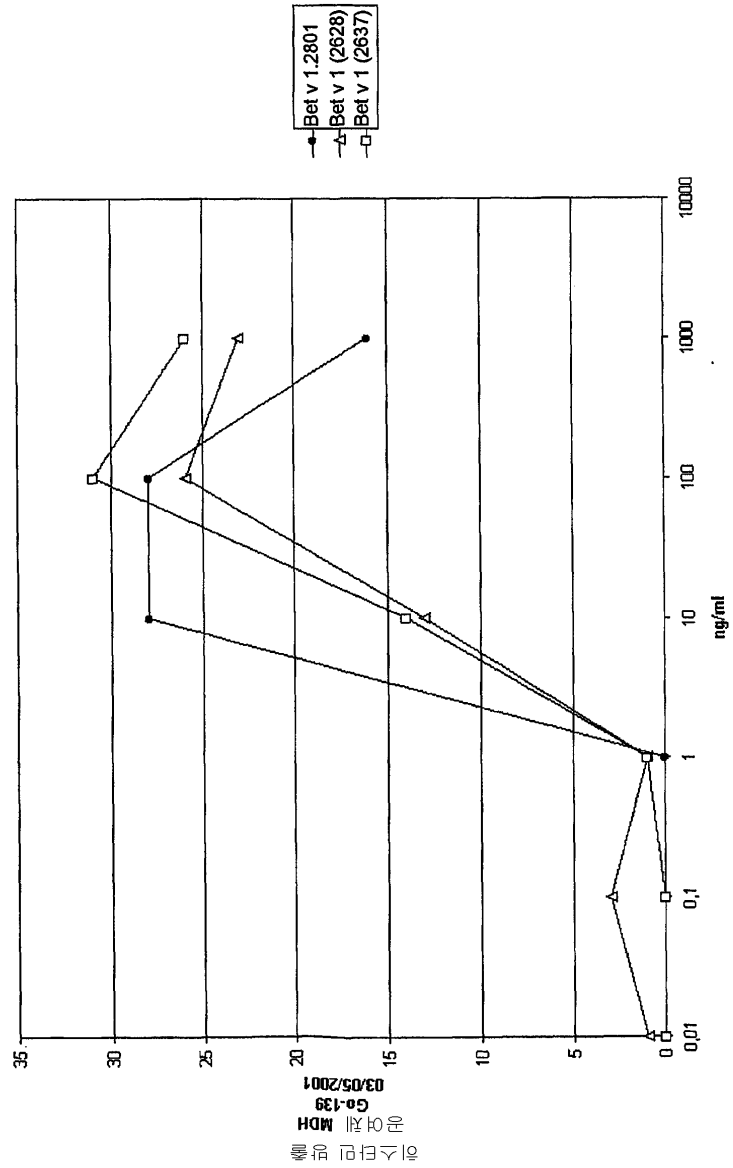
도면22

히스타민 방출: 공여체 MCDS, Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1 (2637)

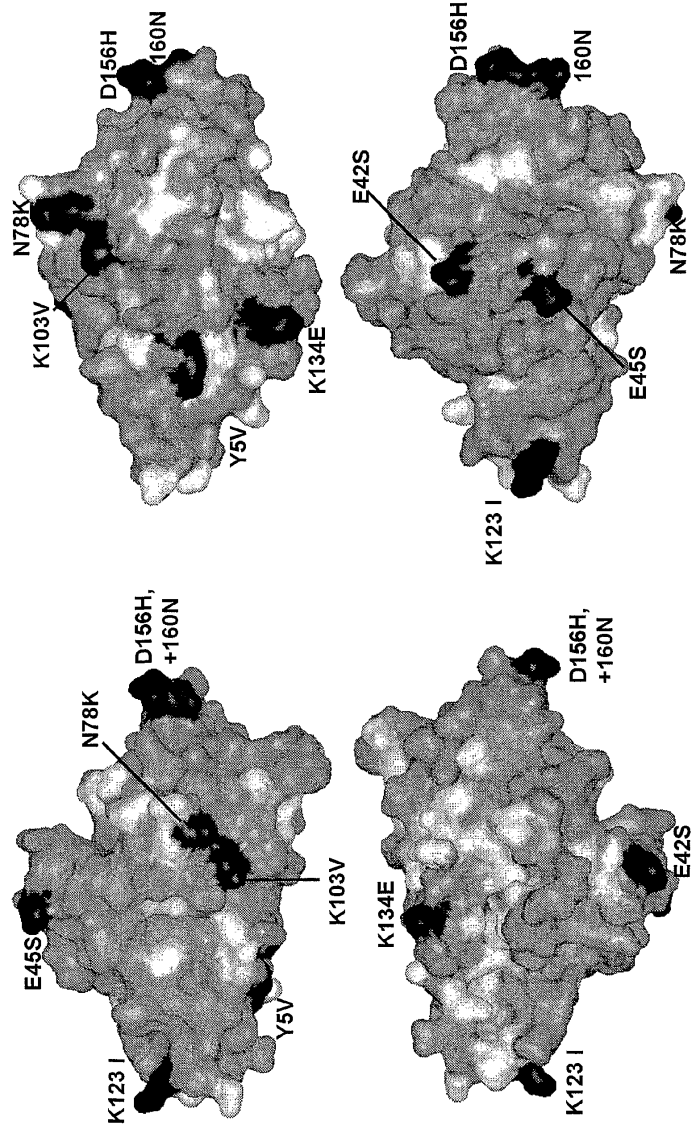


도면23

히스타민 방출, 공여체 MDH, Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1 (2637)



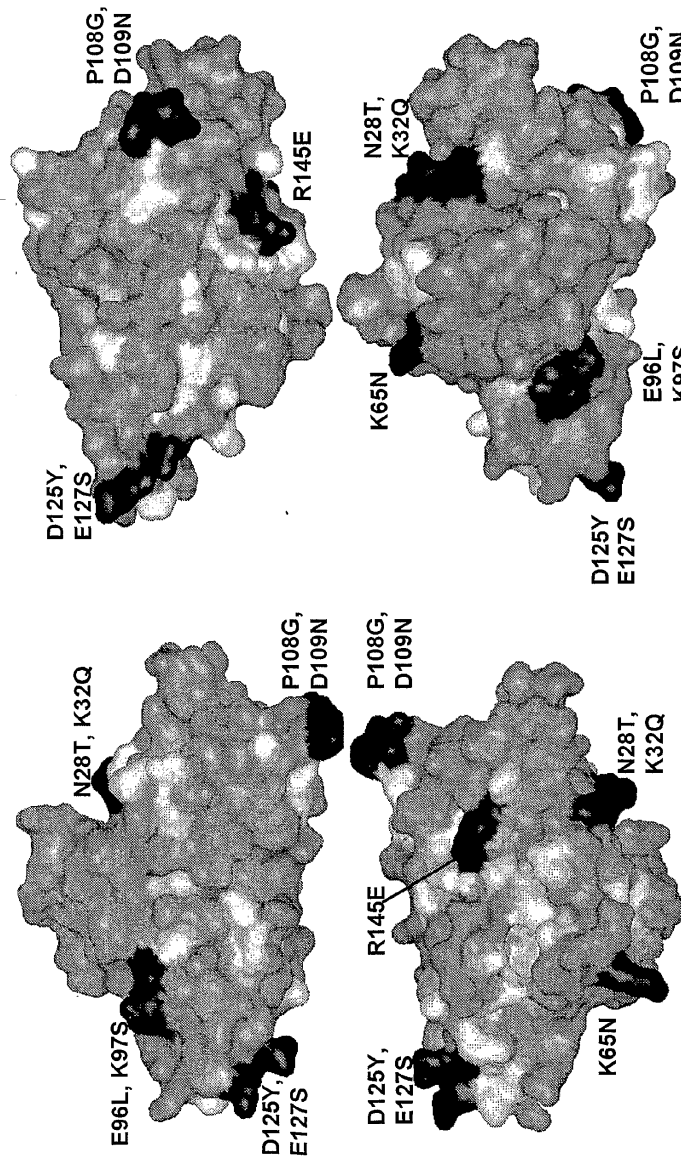
Bet v 1 (2744)의 분자표면에 있는 점 돌연변이들



회색 : 골격 + Fagales 간에 95-100% 보존된 아미노산 잔기들 검은 색 : 점 돌연변이

도면25

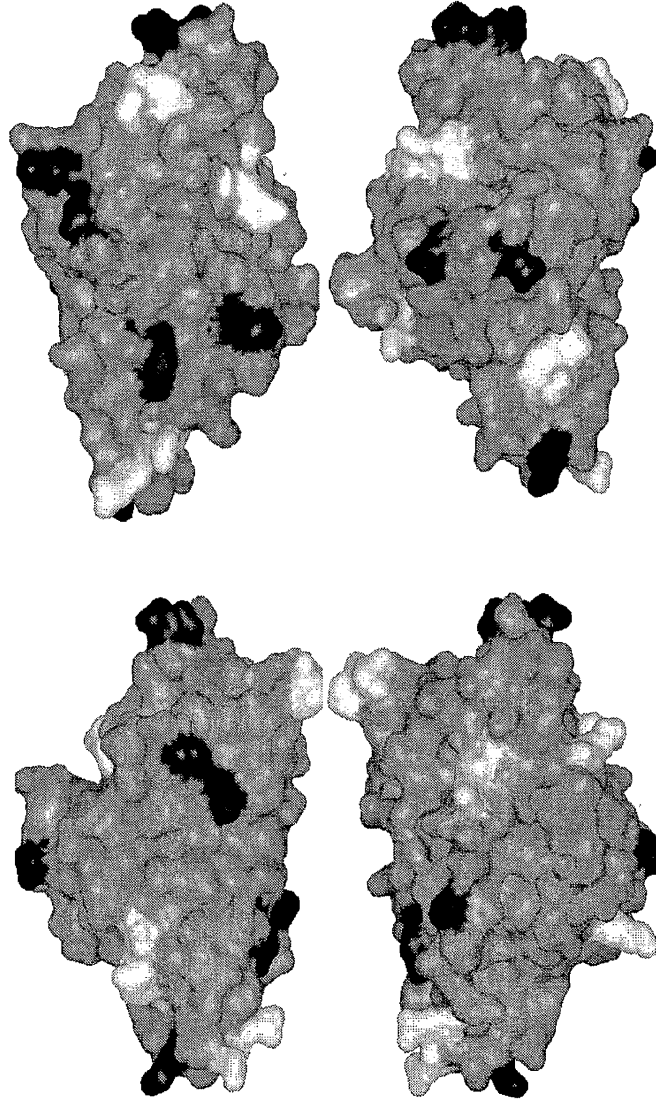
Bet v 1 (2753)의 분자표면에 있는 점 돌연변이들



회색 : 골격 + Fagales 간에 95-100% 보존된 아미노산 잔기들 검은 색 : 점 돌연변이

도면26

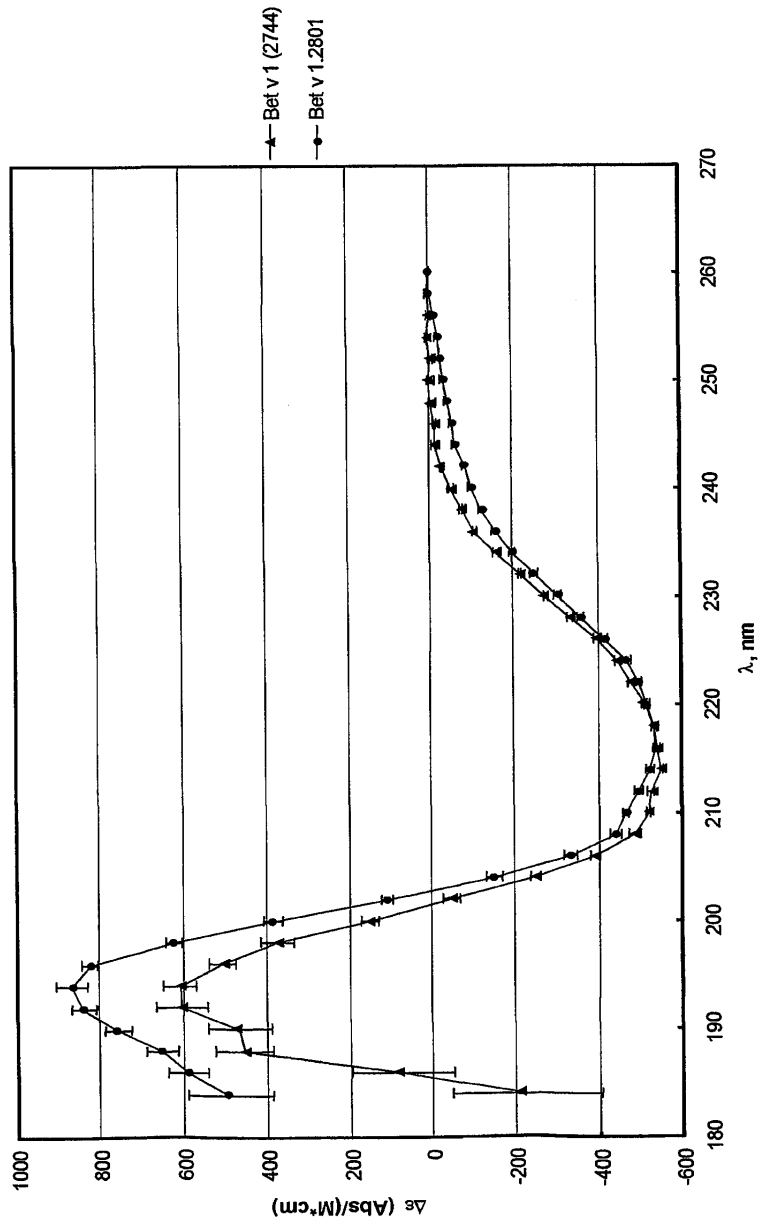
Bet v 1 (2744)[흰색] 및 Bet v 1 (2753)[검은색]의 분자표면에 있는 점 돌연변이들의 분포



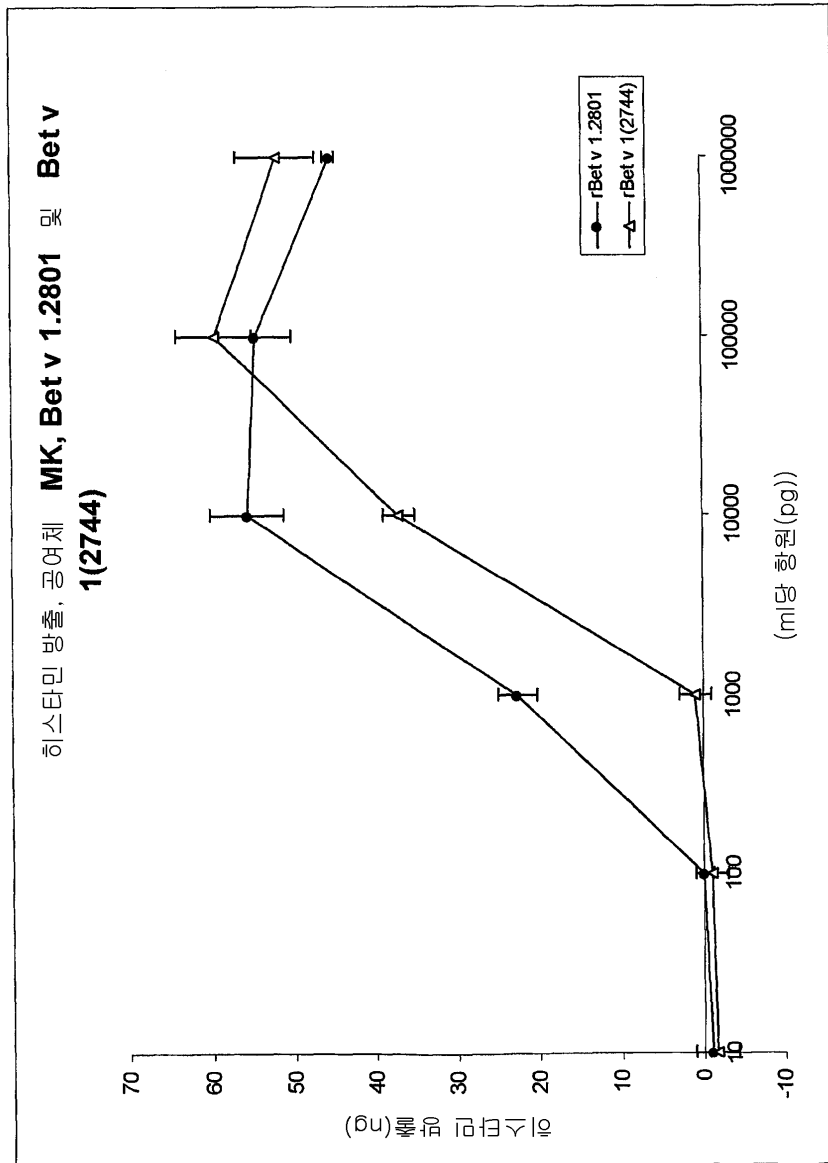
회색 : 골격 + Fagales 간에 95-100% 보존된 아미노산 잔기들 검은색 : 점 돌연변이
 검은색 : 돌연변이들 (Y5V, K134E), (E42S, E45S), (N78K, K103V), K123 I, (D156H, +160N)
 흰색 : 돌연변이들 (N28T, K32Q), K65N, (E96L, K97S), (P108G, D109N), (D125Y, E127S), R145E

도면27

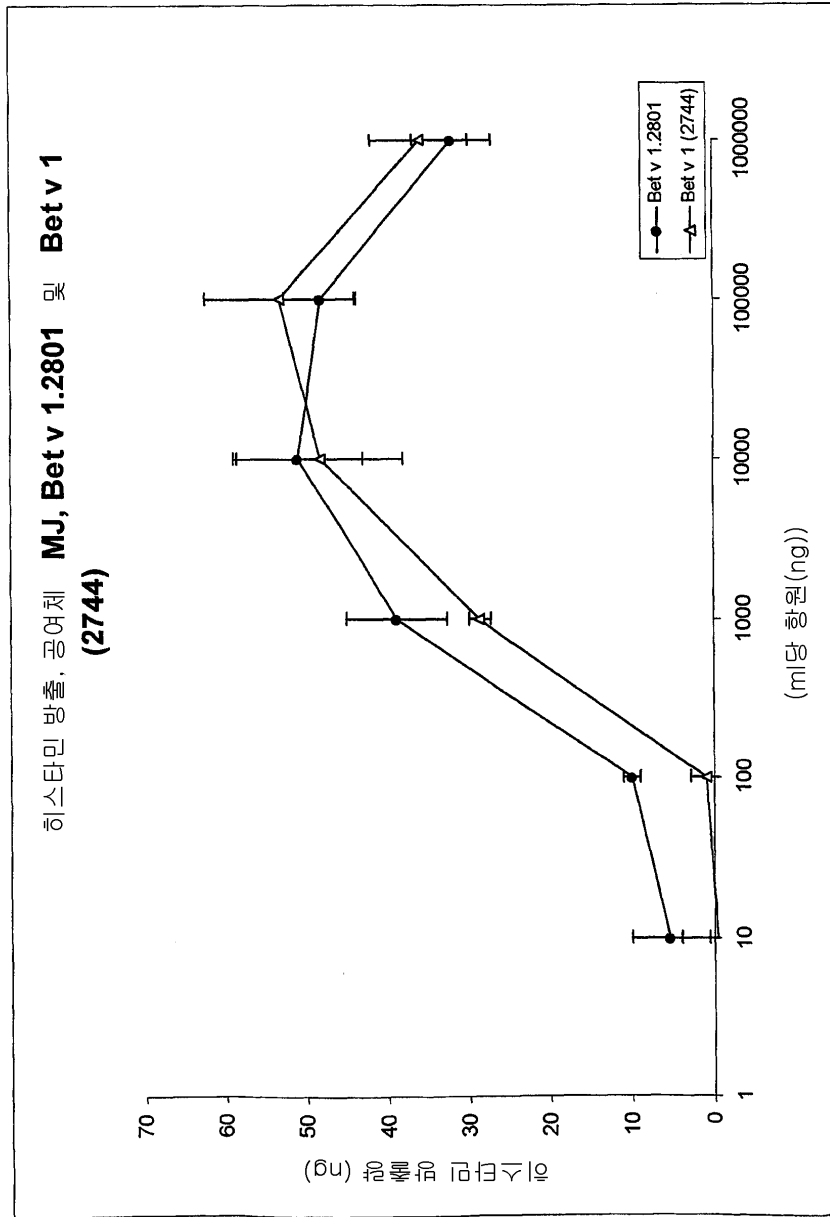
pH7.13, 20°C 에서 Bet v 1,2801 및 돌연변이체 Bet v 1(2744)의 원형 이색성 스펙트럼



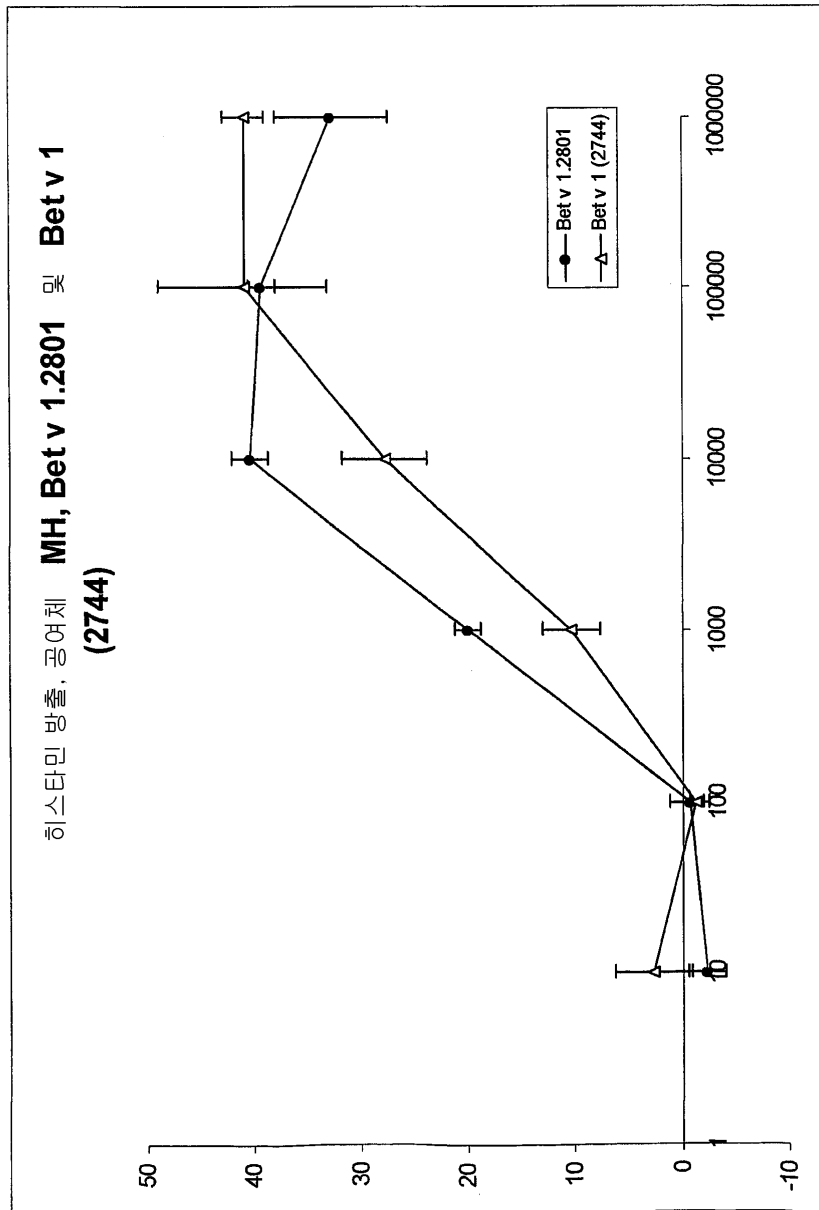
도면28



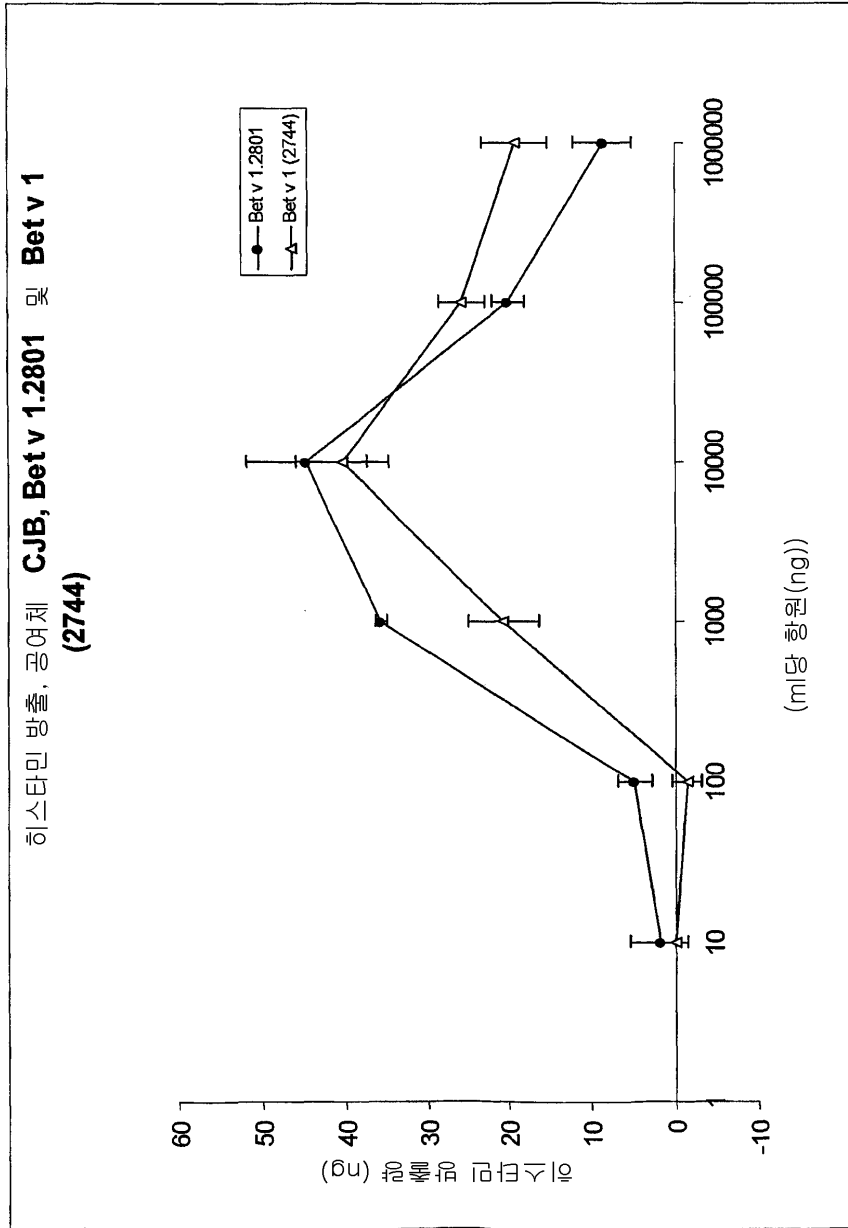
도면29A



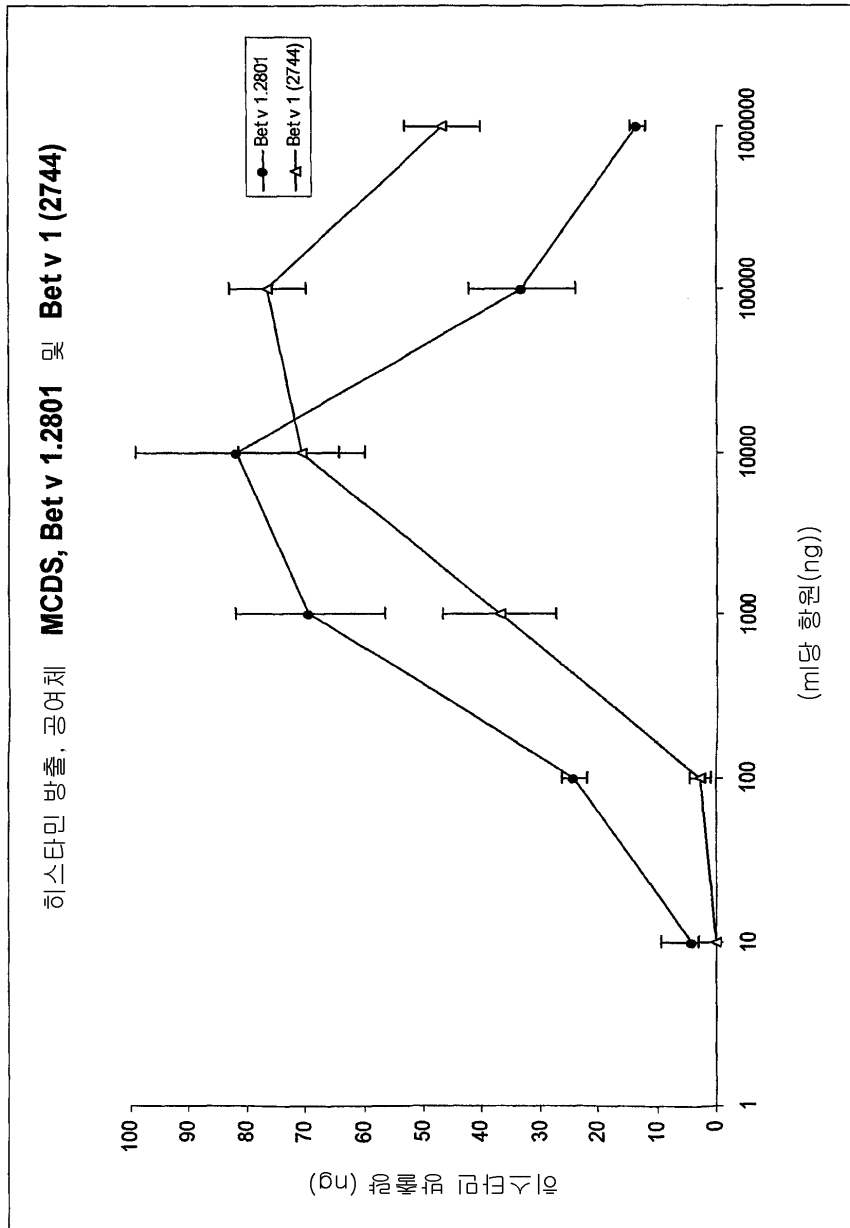
도면29B



도면29C

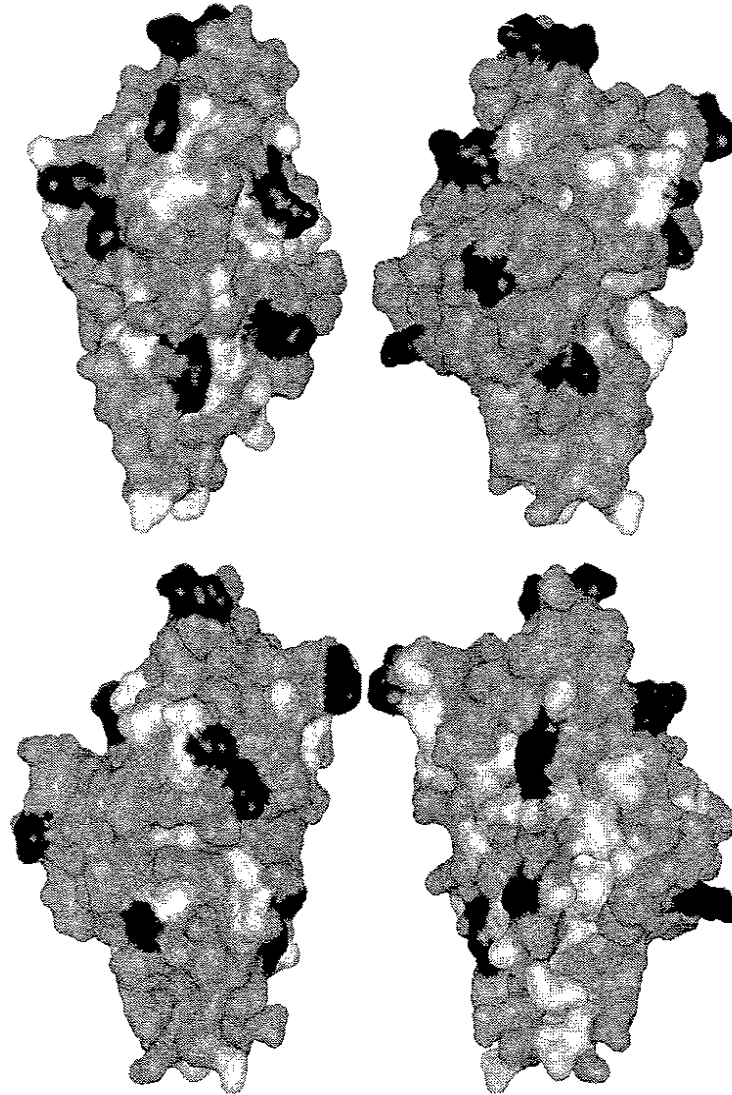


도면29D



도면30

Bet v 1 (2733) 분자표면에 있는 점 돌연변이들



회색: 광각 + Fagales 사이에 95-100% 보존된 아미노산 잔기들
 검은색: 점 돌연변이들:Y5V, N28T, K32Q, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K134E, R145E, D156H, +160N

도면31

Der p 2의 부위 지정 돌연변이유발을 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머

K6A	센스	OB43	42-머	5'- ^{Xho I} CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCGCCGATTGTGCC-3'
	안티센스	OB28	39-머	5'- ^{Xba I} CGTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
K15E	센스	OB44	67-머	5'- ^{Xho I} CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTGTGCC AACCATGAAATCAAAGAAGTTTTGG-3'
	안티센스	OB28	39-머	5'- ^{Xba I} CGTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
H30N	센스	OB46	54-머	5'- ^{Kpn I} CGGGGTACCAGGATGTCATGGTTCAGAACCATGTATCATTAA CCGTGGTAAACC-3'
	안티센스	OB28	39-머	5'- ^{Xba I} CGTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
E62S	센스	OB47	33-머	5'-GCCTCAATCGATGGTTTATCAGTTGATGTTCCC-3'
	안티센스	OB48	33-머	5'-GGGAACATCAACTGATAAACCATCGATTGAGGC-3'
H74N	센스	OB49	32-머	5'- ^{Sph I} CATGGCATGCAATTACATGAAATGCCCATTTGG-3'
	안티센스	OB28	39-머	5'- ^{Xba I} CGTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
K82N	센스	OB50	50-머	5'- ^{Sph I} CTACGCATGCCATTACATGAAATGCCCATTTGGTTAATGGACAA CAATATG-3'
	안티센스	OB28	39-머	5'- ^{Xba I} CGTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'

도면32a

Der p2

					1	10	20	30
1)DERP2ALKG Derp2								
2)DERP2CQNA Derp2								
3)DERP2ISO101 Derp2								
4)DERP2ISO102 Derp2								
5)DERP2ISO104 Derp2								
6)DERP2ISO113 Derp2								
7)DERP2ISO120 Derp2								
8)IAGV Derp2	PDB							
9)DEF2 DERFA Derf2	Q00885	MISKILCL	SIL	VIA	VVA	QV	VK	DC
10)S61241 Derf2	S61241		SIL	VIA	VVA	QV	VK	DC
11)IAHK Derf2	PDB							
12)A61501 Derf2	A61501							
13)O86430 Eurm 2.0101	O86430	MIYKILCL	SIL	VIA	VVA	QV	VK	DC
14)O917ZZ Eurm 2.0102	O917ZZ			VIA	VVA	QV	VK	DC

도면32b

Der p2 (계속)

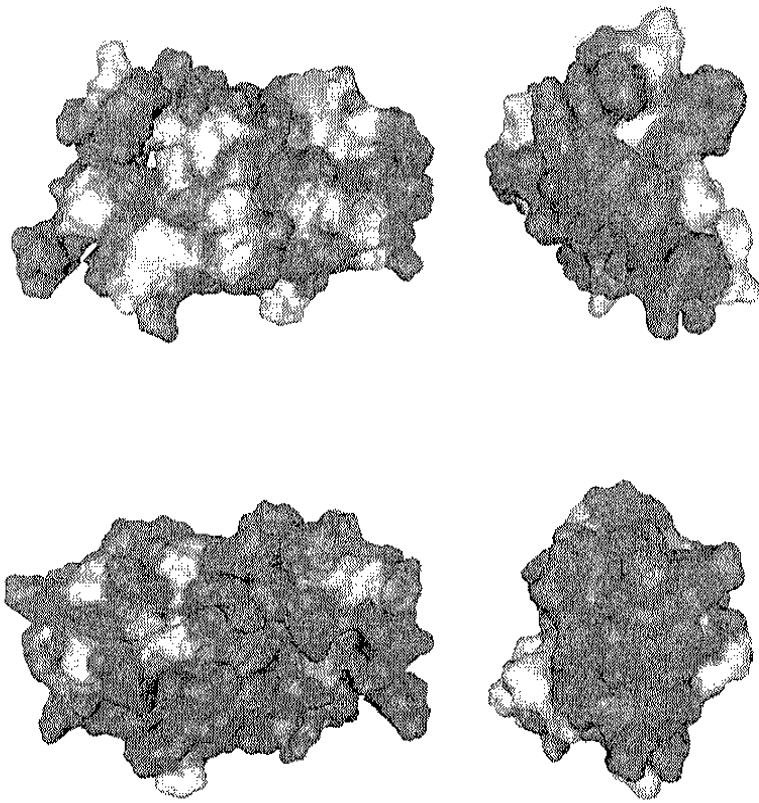
	40	50	60	70	80
1)DERP2AKG Derp2	R G K P F O L E A L F E A N O N S K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
2)DERP2CQNA Derp2	R G K P F O L E A V F E A N O N T K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
3)DERP2S0101 Derp2	R G K P F O L E A V F E A N O N T I N T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
4)DERP2S0102 Derp2	R G K P F O L E A L F E A N O N S K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
5)DERP2S0104 Derp2	R G K P F O L E A V F E A N O R S K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
6)DERP2S0113 Derp2	R G K P F O L E A V F E A N O N S K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
7)DERP2S0120 Derp2	R G K P F O L E A L F E A N O N S K T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
8)ASV Derp2	R G K P F O L E A V F E A N O N T I M T A K I E I K A S I D G L E V D V P G I D P N A C H Y M K C P L				
9)DEF2 DERFA Derf2	R G K P F T L E A L F D A N O N T I K T A K I E I K A S L D G L E I D V P G I D T I N A C H F M K C P L				
10)B1241 Derf2	R G K P F T L E A L F D A N O N T I K T A K I E I K A S L D G L E I D V P G I D T I N A C H F M K C P L				
11)AHK Derf2	R G K P F T L E A L F D A N O N T I K T A K I E I K A S L D G L E I D V P G I D T I N A C H F V K C P L				
12)A61501 Derf2	R G K P F T L E A L F D A N O N T I K T A K I E I K A S L D G L E I D V P G I D T I N A C H F M K C P L				
13)O96430 Eurm2.0101 O96430	R G T I A F O L E A V F D A N O N S N A A I T E I K A T I D G V E I D V P G I D N N L C H F M K C P L				
14)O97122 Eurm2.0102 O97122	R G T I A F O L E A V F D A N O N S N A A I T E I K A T I D G V E I D V P G I D N N L C H F M K C P L				

도면32c

Der p2(계속)

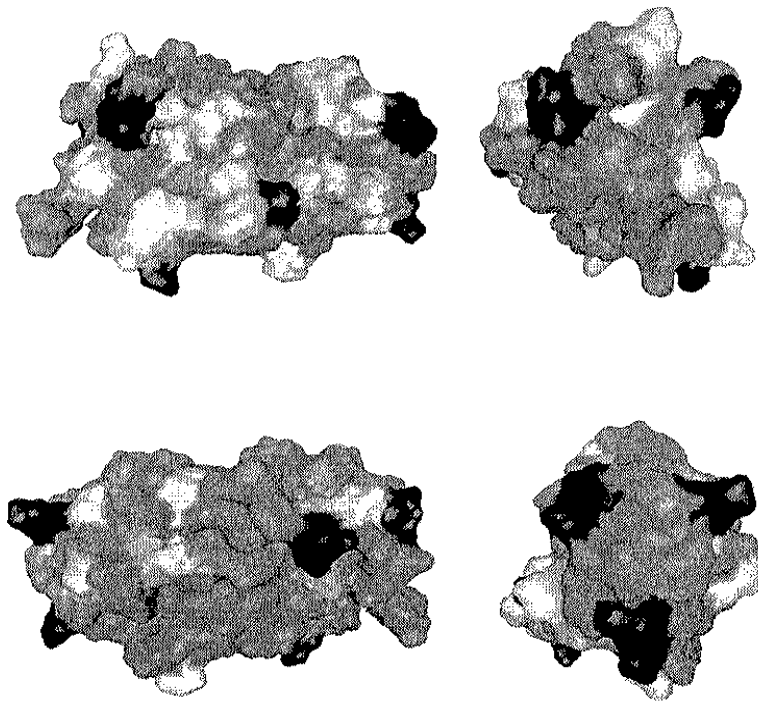
	90	100	110	120
1 DERP2 ALKG Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L GDN G VLA CA I ATH AK IRD			
2 DERP2 CDNA Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
3 DERP2 ISO101 Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
4 DERP2 ISO102 Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
5 DERP2 ISO104 Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
6 DERP2 ISO113 Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
7 DERP2 ISO120 Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD			
8 ASV Derp2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV M GDD G VLA CA I ATH AK IRD	PDB		
9 DEF7 DERFA Derf2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD	Q0785		
10 B61241 Derf2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD	B61241		
11 AAK Derf2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD	PDB		
12 A61501 Derf2	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD	A61501		
13 O86430 Eurm.20101 O86430	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD			
14 Q877Z Eurm.20102 Q877Z	VKGGQYD IKY TWN VPK I APK SEN VVV TVKV L IGDN G VLA CA I ATH AK IRD			

도면33



Der p 2

도면34



Der p 2 돌연변이체

도면35Ab

Der p1 (계속)

	.40	.30	.20	.10	1	10
Derp1AK						
SPPTFTNNMAL DERPT Derp1	KYIVFSNKGGAIIWHLSLSLSLDEFFKNRFUMSAEAFIEHLKTQFDLNAETHACSTIN.GNAPPAEIIID					
IKCHIBAGUQBAB Eorm1.0000	KYIVFSNKGGAIIWHLSLSLSLDEFFKNRFUMWNAFEQLKTQFDLNAETHACSTINHSVSLPSEIILD					
IKCIZZIQBTZZ Eorm1.0000KNQFUMWNAFEQLKTQFDLNAETHACSTINHSVSLPSEIILD					
IKCIZZIQBTZZ Eorm1.0002	KYIVFSNKGGAIIWHLSLSLSLDEFFKNQFUMWNAFEQLKTQFDLNAETHACSTINHSVSLPSEIILD					
SPPTFTNNMAL DERPA Derp1	KYIVFANKGGAIIWHLSLSLSLDEFFKNRYLUMSAEAFIEQLNTQFDLNAETHACSTINHSVNVVPSIILD					
SPPTZTQEUH1 EORMNA Eorm1YACSTINHSVSLPSEIILD					
IKMAGCQZVHAGSGBZ Derp1SHACSTINHSVNVVPSIILD					

도면35Ba

Der p1(계속)

	80	90	100	110	120	130
Derp ALK						
SPRSTYIMNAL DERPT Derp1	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDESYHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
MSBQAPQCBQD Form 1001	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
MSZTZA9TZA Form 1001	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
MSZTZA9TZA Form 1002	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
SPRSTYIMNAL DERPA Derp1	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
SPSTSEIML EORNA Form 1	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ
MPASQSZAPASQSD Derp1	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ	PPRGTEVYIQIGVYDEHYVAREDSCHRPNAQREFGSHYCCQYPPNWKREALAQ

도면35Bb

Der p1 (계속)

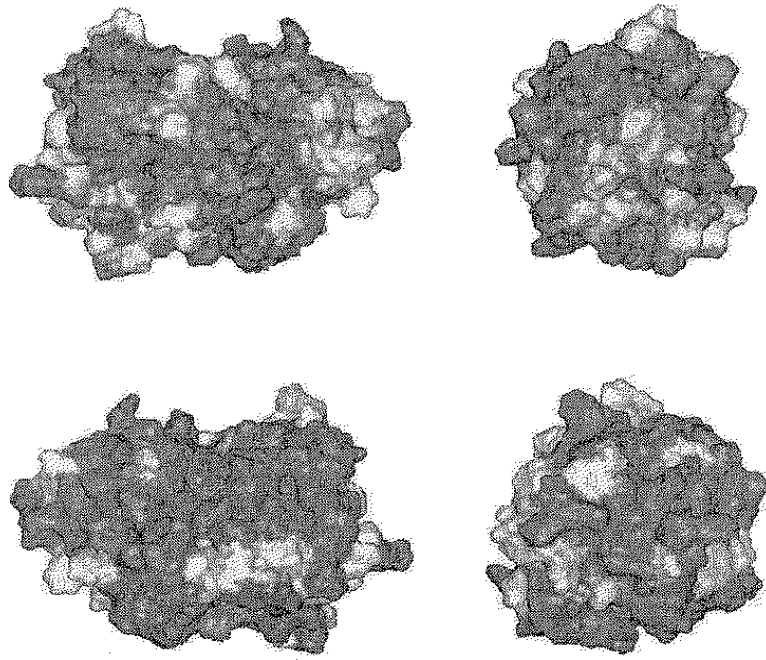
	140	150	160	170	180	190
DerpAK	SSIAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
SPF878HMALDERP Derp1	SSIAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
ECOR1.0001	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
ECOR1.0001	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
ECOR1.0002	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
SPF311HMALDERP Derp1	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
SPF278EUMI ERMAL Ecor1	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					
IPMAG162IHAQDEZO Derp1	TVAVAVIGFINDLDAERHYDGRITQRDGGYQPIYHAYLIVGYSHEGGYDYMEVRSWDTI					

도면35Bc

Der p1(계속)

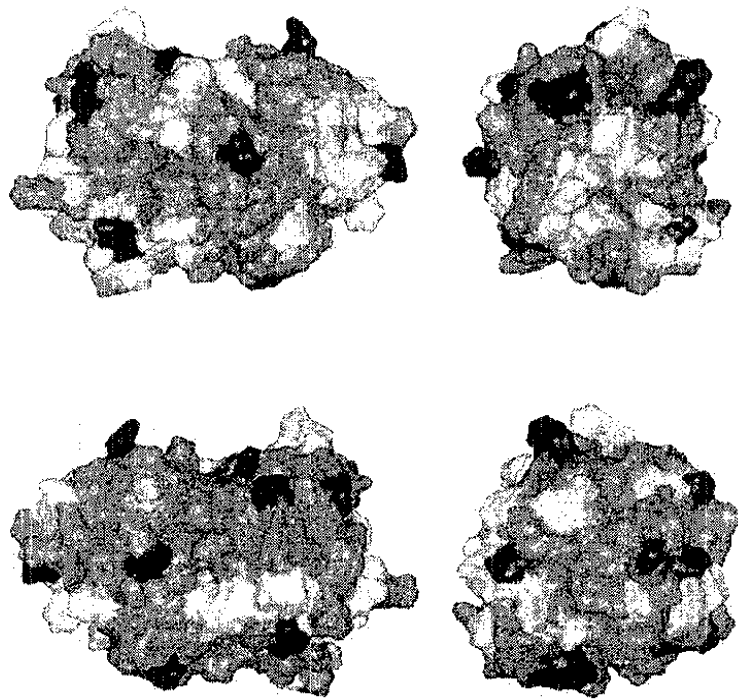
	200	210	220
Derp ASK	WG D N G Y G Y F A A N I D L M N T E E X P Y V V I E		
SPF0878MMAL DERPT Derp1	WG D N G Y G Y F A A N I D L M N T E E X P Y V V I E		
WG08UBAQBQBAU Eurm 10001	WG D N G Y G Y F A A N I N L M N T E Q M P Y V V M I		
WG08TZAQBTZA Eurm 10001	WG D N G Y G Y F A A N I N L M N T E Q M P Y V V M I		
WG08TZAQBTZA Eurm 10002	WG D N G Y G Y F A A N I N L M N T E Q M P Y V V I E		
SPF0831MMAL DERFA Derf1	WG D S G Y G Y F Q A G N I N L M N T E Q Y P Y V V I M		
SPF2830EUMI EURMA Eurm 1	WG D N G Y G Y F A A N I N L		
WG08G0820AAG0820 Derf1	WG D S G Y G Y F Q A G N I N L		

도면36



Der p 1

도면37



Der p 1 돌연변이체

도면38Ab

phl p5(계속)

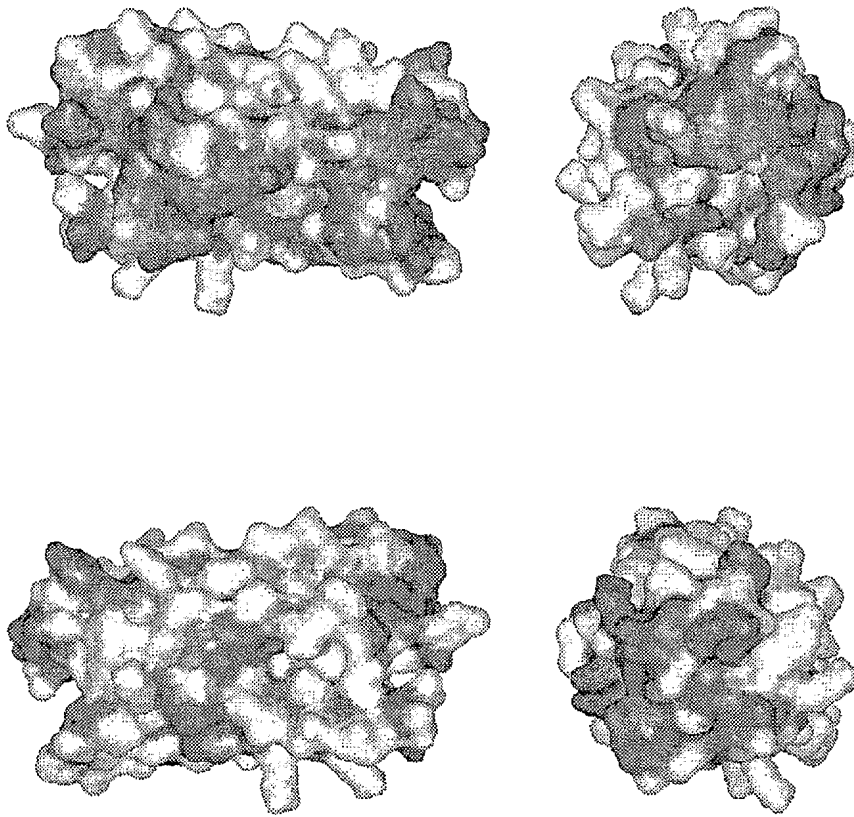
		10	20	30
tr C81341 C81341	Phl p 5.0103	ATPAPAPAGYTPATPAAPAGAPAGKAT
tr C40960 C40960	Phl p 5	ATPAPAPAGYTPATPAAPAEAPAGKAT
sp C40962 MP5A_PHLPR	Phl p 5A	ATPAPAPAGYTPATPAAPAGDAPAGKAT
sp P22286 MP92_POAPR	Poa p 5 (KBG41)	PIATL	ATPAPAPAGYTPAAPAGAPAGKAT
sp P22286 MP93_POAPR	Poa p 5 (KBG60)	P.....	ATPAPAPAGYTPAAPAGAPAGKAT
tr C66319 C66319	Phl p 5	GATPAAPAEAPAGKAT
tr C66320 C66320	Phl p 5	GATPAAPAEAPAGKAT
tr C66321 C66321	Phl p 5	GATPAAPAEAPAGKAT
tr C66318 C66318	Phl p 5	GATPAAPAEAPAGKAT
tr P93467 P93467	Phl p 5	GATPAAPAEAPAGKAT
sp P22284 MP91_POAPR	Poa p 5 (KBG 31)	PPASKFKAK	PKVIAAYTPAAPAGGAPAGKAT
sp C40237 MP5B_LOLPR	Lol p 5B	.ATP	ATPAATPAIAAVISGKAT
tr C9XF24 C9XF24	Lol p 5A	TAAATPATPIATPIAGKAT
tr C8SC99 C8SC99	Lol p 5C	TAAATPATPIATPIAGGKAT
tr C81343 C81343	Phl p 5.0206	AATPAAGATAGKAT
tr C23972 C23972	Hdl 15	AAPAAAGAGKAT
tr C81344 C81344	Phl p 5.0207	AATPAAGATAGKAT
tr AAG42255 AAG42255	Hdl 15B	ATTPAAGATAGKATP
tr AAG42254 AAG42254	Poa p 5	AATPAAGATAGKATP
tr C81342 C81342	Phl p 5.0203	AATPAAGATAGKAT
tr P93466 P93466	Phl p 5	AATPAAGATAGKAT
sp C40963 MP5B_PHLPR	Phl p 5B	AATPAAGATAGKAT
tr C8S6E0C C8S6E0	Phl p 5.0204	AATPAAGATAGKAT
tr C23971 C23971	Phl p 5.02
sp P56166 MP53_PHAAG	Pha a 5.3	GTPATPIAGKAT
HAAQ	Pha a 5.1	TPRTPILIPPIRRIKIA
tr C04828 C04828	Horv 9	NIFIPVFNRI
tr C89995 C89995	Horv 5 (30kDa)IIE

도면38Ca

phI p5 (계속)

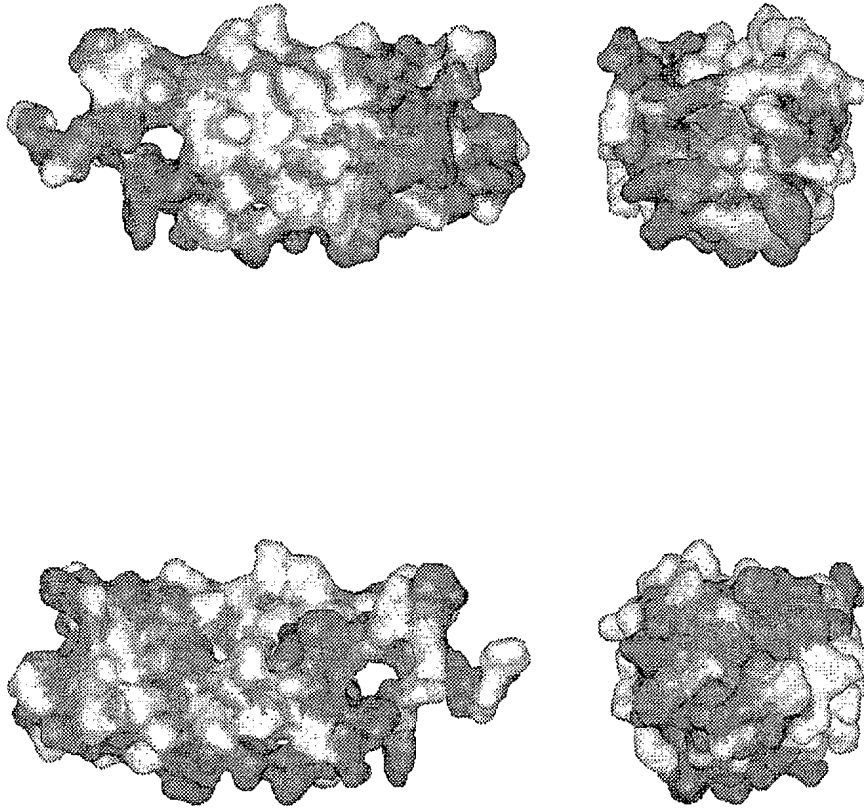
			11810	11910	200
tr O81341 O81341	PhI p5.0103	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D D I K A S T G G A		
tr Q40960 Q40960	PhI p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
sp Q40962 MP5A_PHLPR	PhI p5 A	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D E I K A S T G G A		
sp P22285 MP92_POAPR	Poa p5 (KBG41)	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D I K A S T G G A		
sp P22286 MP93_POAPR	Poa p5 (KBG60)	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
tr O65319 O65319	PhI p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N I K A S T G G A		
tr O65320 O65320	PhI p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N I K A S T G G A		
tr O65321 O65321	PhI p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N I K A S T G G A		
tr O65318 O65318	PhI p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N I K A S T G G A		
tr P93467 P93467	PhI p5	T A A N A A A A N D K F T V F E A A F N H I K A S T G G A		
sp P22284 MP91_POAPR	Poa p5 (KBG 31)	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
sp Q40292 MP5B_LOLPR	Lol p5B	T A A N A A P A N D K F T V E E N I T F N N A L V S L Q A A		
tr Q8XF24 Q8XF24	Lol p5A	T A A N A A P T N D K F T V F E S A F N K L N E C T G G A		
tr Q8SC99 Q8SC99	Lol p5C	T A A N A A P T H D F F T V F E S A F N K L N E C T G G A		
tr O81343 O81343	PhI p5.0206	T A A I T A R A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q23972 Q23972	Hol15	T A A N A A P V N D K F T V F E G A F N K A I K E S T G G A		
tr O81344 O81344	PhI p5.0207	T A A I T A P A D I . . . T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr AAG42255 AAG42255	Hol15B	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K E S T G G A		
tr AAG42254 AAG42254	Poa p5	T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K E S T G G A		
tr O81342 O81342	PhI p5.0203	T A A I T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr P93466 P93466	PhI p5	T A A I T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
sp Q40963 MP5B_PHLPR	PhI p5B	T A A I T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q8SBE0 Q8SBE0	PhI p5.0204	T A A I T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q23971 Q23971	PhI p5.02	T A A N A A P A N D K F T V F E T I F N K A L E S T G G A		
sp P56168 MP53_PHAHQ	Pha a5.3	TIVAITPLSHS	T A A N S A P A N D K F T V F E G A F N K A I K E R H G G P		
PHAHQ	Pha a5.1	T A A N S A P A N D K F T V F E G A F N K A I K E S T A G A		
tr D04828 D04828	Horv9	T A A D A A P A N D K F T V F E S I L Q Q G P S R K P I R G G A		
tr Q33999 Q33999	Horv5 (D10a)	T A A D A A P A N D K F T V F E S I L Q Q G P S R K P I R G G A		

도면39A



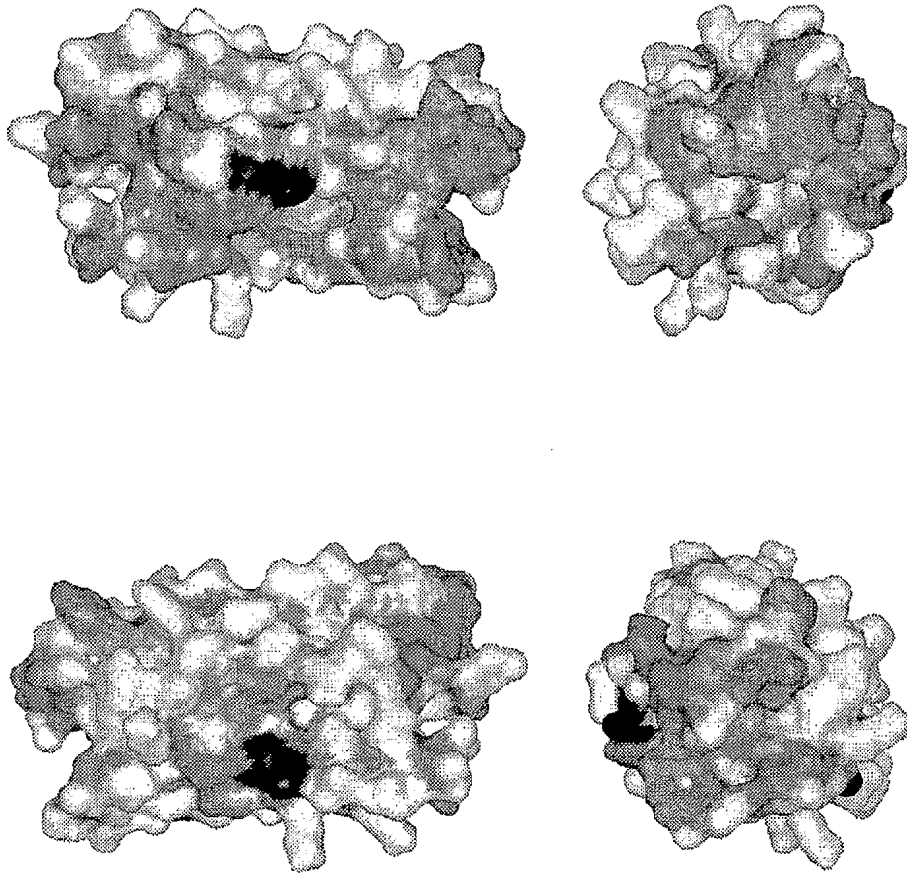
Phl p 5, 모델 A

도면39B



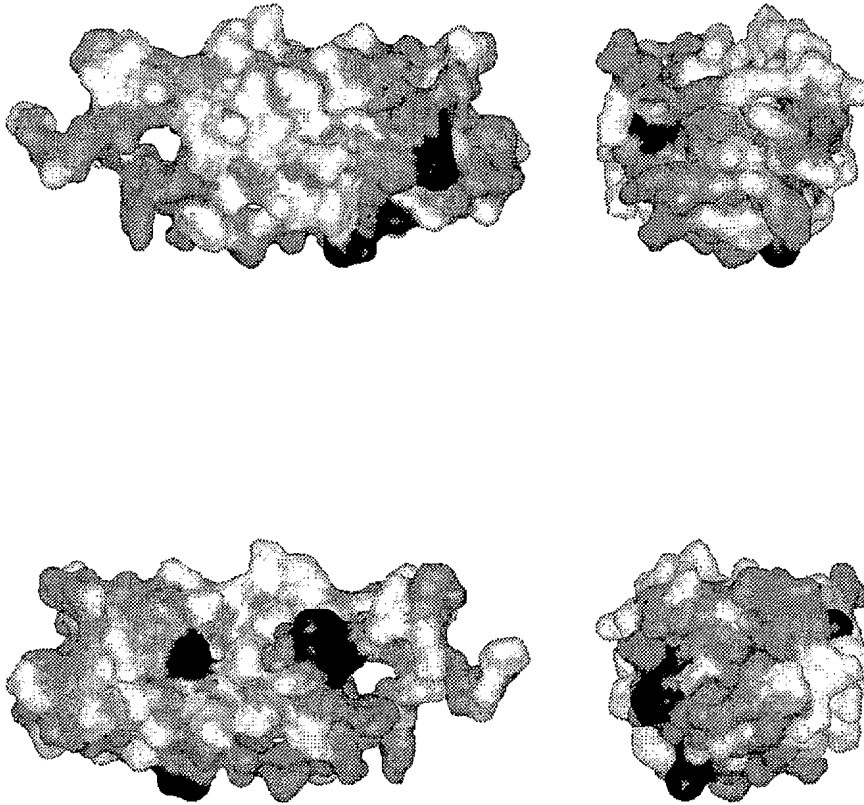
Phl p 5, 모델 B

도면40A



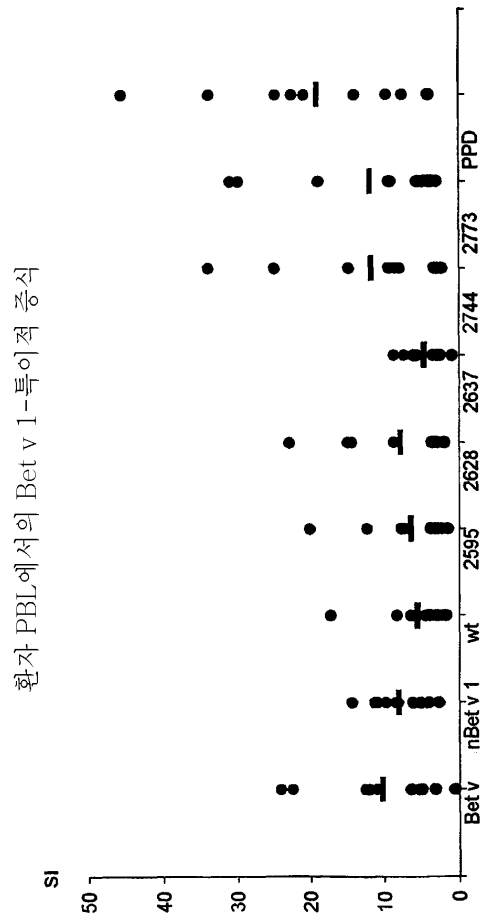
Phl p 5 돌연변이체, 모델 A

도면40B



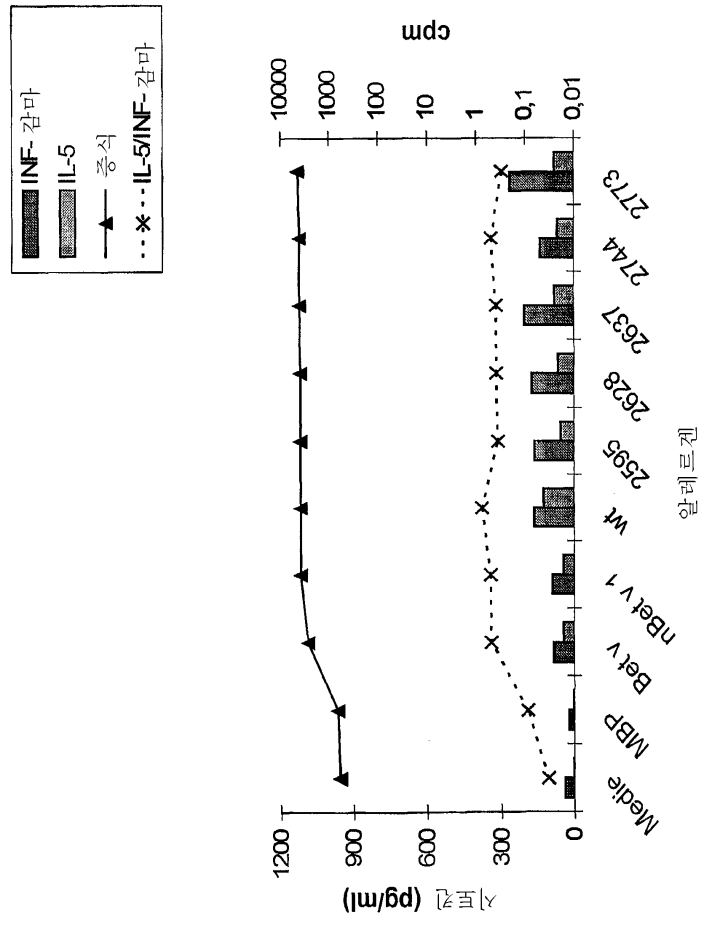
Phl p 5 돌연변이체, 모델 B

도면41

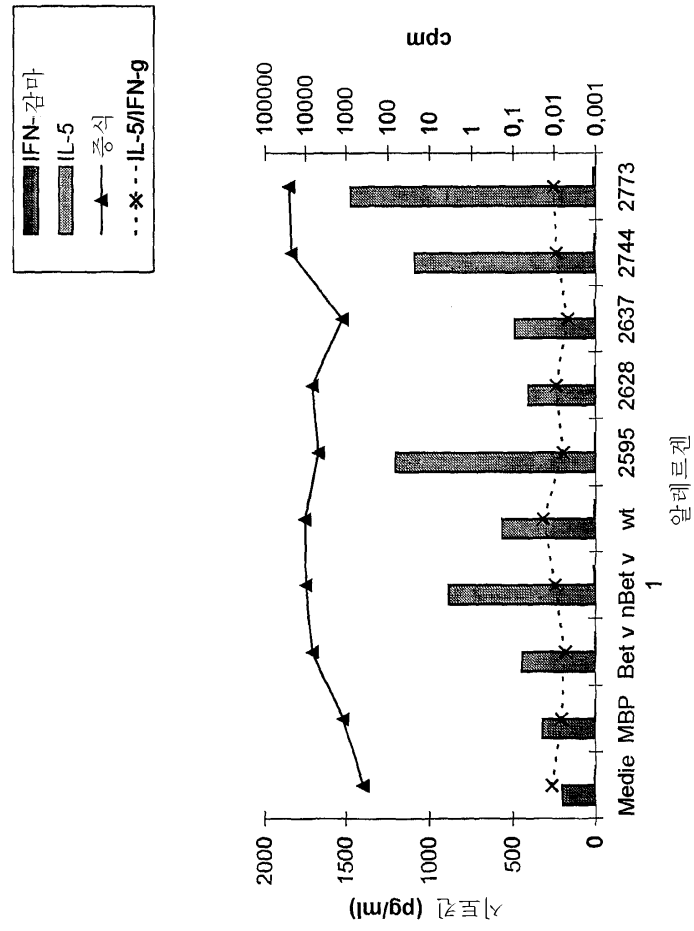


Bet v 1 샘플의 자극

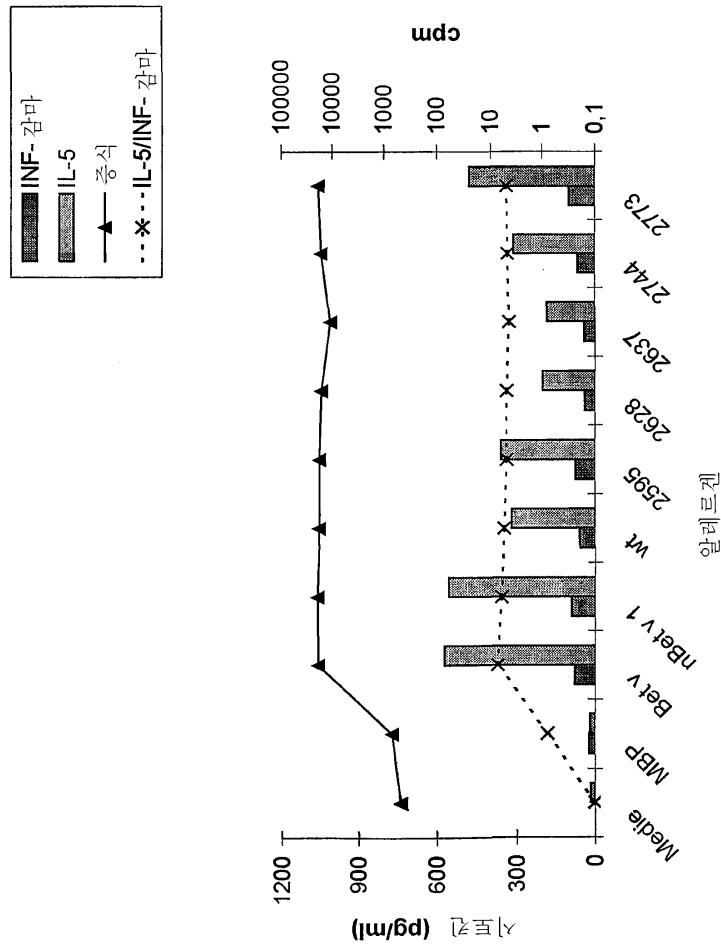
도면42



도면43



도면44



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ALK-ABELLO A/S
- <120> Novel mutant allergens
- <130> P199901213 WO
- <140> PCT/DK01/00764
- <141> 2001-11-16
- <150> DK PA 2000 01718
- <151> 2000-11-16
- <150> US 60/298,170
- <151> 2001-06-14
- <150> US 60/249,361
- <151> 2000-11-16
- <160> 90
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 160
- <212> PRT
- <213> Betula verrucosa
- <220><221> mutation
- <222> (28)..(28)

<220>

<221> mutation
 <222> (32)..(32)
 <220>

<221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (145)..(145)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <220>

<221> mutation
 <222> (160)..(160)
 <400> 1

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser

 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val

 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

 130 135 140
 Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160
 <210> 2
 <211> 159

<212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (42)..(42)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (123)..(123)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <400> 2

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser

 100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val

115 120 125
Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140
Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn

145 150 155
<210> 3
<211> 159
<212> PRT
<213> Betula verrucosa
<220>

<221> mutation
<222> (28)..(28)
<220>

<221> mutation
<222> (32)..(32)
<220>

<221> mutation
<222> (45)..(45)
<220>

<221> mutation
<222> (108)..(108)
<400> 3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

20 25 30
Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly

35 40 45
Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

50 55 60
Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys

65 70 75 80
Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

85 90 95
Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser

100 105 110
Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val

115 120 125
Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

145 150 155

<210> 4
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (65)..(65)
 <220>

<221> mutation
 <222> (97)..(97)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <400> 4

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Ser Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser

 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val

 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

 130 135 140
 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser

100 105 110
Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val

115 120 125
Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140
Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn

145 150 155

<210> 6
<211> 160
<212> PRT
<213> Betula verrucosa
<220>

<221> mutation
<222> (28)..(28)
<220>

<221> mutation
<222> (32)..(32)
<220>

<221> mutation
<222> (78)..(78)
<220>

<221> mutation
<222> (103)..(103)
<220>

<221> mutation
<222> (108)..(108)
<220>

<221> mutation
<222> (145)..(145)
<220>

<221> mutation
<222> (156)..(156)
<220>

<221> mutation
<222> (160)..(160)
<400> 6

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60
 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
 65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95
 Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
 130 135 140
 Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
 145 150 155 160
 <210> 7
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> *Betula verrucosa*
 <220>
 <221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (28)..(28)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (32)..(32)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (65)..(65)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>
 <221> mutation
 <222> (97)..(97)

<220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (108)..(108)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <220>

<221> mutation
 <222> (145)..(145)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <220>

<221> mutation
 <222> (160)..(160)
 <400> 7

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser

 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val

 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

 130 135 140
 Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160

<210> 8

<211> 160

<212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (42)..(42)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (123)..(123)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <220>

<221> mutation
 <222> (160)..(160)
 <400> 8

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

85 90 95
 Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser

100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val

115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140
 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160

<210> 9
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (28)..(28)
 <220>

<221> mutation
 <222> (32)..(32)
 <220>

<221> mutation
 <222> (65)..(65)
 <220>

<221> mutation
 <222> (96)..(96)
 <220>

<221> mutation
 <222> (97)..(97)
 <220>

<221> mutation
 <222> (108)..(108)
 <220>

<221> mutation
 <222> (109)..(109)
 <220>

<221> mutation
 <222> (125)..(125)
 <220>

<221> mutation
 <222> (127)..(127)
 <220>

<221> mutation

<222> (145)..(145)
 <400> 9
 Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Ser Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Gly Asn Gly Gly Ser

 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Tyr His Ser Val

 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

 130 135 140
 Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

145 150 155
 <210> 10
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> *Betula verrucosa*
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (28)..(28)
 <220>

<221> mutation
 <222> (32)..(32)
 <220>

<221> mutation
 <222> (42)..(42)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)

<220>

<221> mutation

<222> (78)..(78)

<220>

<221> mutation

<222> (103)..(103)

<220>

<221> mutation

<222> (108)..(108)

<220>

<221> mutation

<222> (123)..(123)

<220>

<221> mutation

<222> (134)..(134)

<220>

<221> mutation

<222> (156)..(156)

<220>

<221> mutation

<222> (160)..(160)

<400> 10

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

 20 25 30
Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser

 100 105 110
Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val

 115 120 125
Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160

<210> 11
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (42)..(42)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (65)..(65)
 <220>

<221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>

<221> mutation
 <222> (97)..(97)
 <220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (123)..(123)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <220>

<221> mutation
 <222> (160)..(160)
 <400> 11

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60
 Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
 65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95
 Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
 130 135 140
 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160

<210> 12
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <220>

<221> mutation
 <222> (5)..(5)
 <220>

<221> mutation
 <222> (28)..(28)
 <220>

<221> mutation
 <222> (32)..(32)
 <220>

<221> mutation
 <222> (42)..(42)
 <220>

<221> mutation
 <222> (45)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (65)..(65)
 <220>

<221> mutation
 <222> (78)..(78)
 <220>

<221> mutation
 <222> (97)..(97)
 <220>

<221> mutation
 <222> (103)..(103)
 <220>

<221> mutation
 <222> (108)..(108)
 <220>

<221> mutation
 <222> (123)..(123)
 <220>

<221> mutation
 <222> (134)..(134)
 <220>

<221> mutation
 <222> (156)..(156)
 <220>

<221> mutation
 <222> (160)..(160)
 <400> 12

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln

 20 25 30
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly

 35 40 45
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe

 50 55 60
 Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys

65 70 75 80
 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

 85 90 95
 Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser

 100 105 110
 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val

 115 120 125
 Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130 135 140
 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn

145 150 155 160

<210> 13
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (148)..(150)
 <220>

<221> mutation
 <222> (232)..(234)
 <220>

<221> mutation
 <222> (295)..(297)
 <220>

<221> mutation
 <222> (466)..(468)
 <220>

<221> mutation
 <222> (481)..(483)
 <220>

<221> mutation
 <222> (508)..(510)
 <400> 13

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30

tca tgt tgg

gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45

gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60

tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att 240

Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

210 215 220

<210> 15
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (148)..(150)
 <220>

<221> mutation
 <222> (232)..(234)
 <220>

<221> mutation
 <222> (295)..(297)
 <220>

<221> mutation
 <222> (466)..(468)
 <220>

<221> mutation
 <222> (481)..(483)
 <220>

<221> mutation
 <222> (499)..(501)
 <400> 15
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg
 gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att 240

 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
 65 70 75 80
 gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt 336
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

 100 105 110
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 16
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 16

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

1 5 10 15
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

 20 25 30
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

 35 40 45
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

 50 55 60
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile

65 70 75 80
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

 85 90 95
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

 100 105 110
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg

 115 120 125
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

 130 135 140
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln

145 150 155 160
Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly

 165 170 175
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp

 180 185 190
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile

 195 200 205
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

 210 215 220
<210> 17

<211> 666
<212> DNA
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(666)
<220>

<221> mutation
<222> (58)..(60)
<220>

<221> mutation
<222> (148)..(150)

<220>

<221> mutation
 <222> (232)..(234)
 <220>

<221> mutation
 <222> (295)..(297)
 <220>

<221> mutation
 <222> (466)..(468)
 <220>

<221> mutation
 <222> (481)..(483)
 <220>

<221> mutation
 <222> (499)..(501)
 <400> 17

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg gaa act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg	
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144	
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	
35 40 45	
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat	192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	
50 55 60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile	
65 70 75 80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	
ggt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt	336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	
100 105 110	
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt	384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg	
115 120 125	
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc	432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile	
130 135 140	
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa	480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln	
145 150 155 160	
cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt	528
Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly	

85 90 95 336
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

100 105 110 384
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

480
 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 20
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 20
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

50 55 60
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile

65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

85 90 95
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg

115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln

 145 150 155 160
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp

 165 170 175

 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile

 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

210 215 220
 <210> 21
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

 <221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (148)..(150)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (199)..(201)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (295)..(297)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (466)..(468)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (481)..(483)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (499)..(501)
 <400> 21
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

1 5 10 15
 cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg
 gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att 240

 Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt 336
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

 100 105 110
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa get ttg get caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 22
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 22
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

210 215 220

<210> 23
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (58)..(60)
 <220>

<221> mutation
 <222> (148)..(150)
 <220>

<221> mutation
 <222> (199)..(201)
 <220>

```

<221> mutation
<222> (295)..(297)
<220>

<221> mutation
<222> (466)..(468)
<220>

<221> mutation
<222> (481)..(483)
<220>

<221> mutation
<222> (499)..(501)
<400> 23
act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg      48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1          5          10          15
cga caa atg gaa act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt      96
Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
          20          25          30
tca tgt tgg
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg      144
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
          35          40          45
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat      192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
          50          55          60
tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att      240

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65          70          75          80
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac      288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
          85          90          95
gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt      336
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

          100          105          110
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt      384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
          115          120          125
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc      432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
          130          135          140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa      480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145          150          155          160
gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt      528
Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
          165          170          175
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
          576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
          180          185          190
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc      624

```

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 24
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 24
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

 1 5 10 15
 Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220
 <210> 25
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

```

<221> CDS
<222> (1)..(666)
<220>

<221> mutation
<222> (58)..(60)
<220>

<221> mutation
<222> (148)..(150)
<220>

<221> mutation
<222> (199)..(201)
<220>

<221> mutation
<222> (295)..(297)
<220>

<221> mutation
<222> (466)..(468)
<220>

<221> mutation
<222> (481)..(483)
<220>

<221> mutation
<222> (499)..(501)
<400> 25
act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg      48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1          5          10          15
cga caa atg cag act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt      96
Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
          20          25          30
tca tgt tgg
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg      144
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
          35          40          45
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat      192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
          50          55          60
tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att      240

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65          70          75          80
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac      288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
          85          90          95
gtt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt      336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

          100          105          110
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt      384

```

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
 576

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 26
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 26

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

50 55 60
 Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile

65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

85 90 95
 Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg

115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln

145 150 155 160
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp

 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile

 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

210 215 220
 <210> 27
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (37)..(39)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (148)..(150)
 <220>

<221> mutation
 <222> (232)..(234)
 <220>

<221> mutation
 <222> (295)..(297)
 <220>

<221> mutation
 <222> (325)..(327)
 <220>

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <220>

<221> mutation
 <222> (466)..(468)
 <220>

<221> mutation
 <222> (481)..(483)

<220>

<221> mutation

<222> (499)..(501)

<400> 27

```

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg      48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
1          5          10          15
cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt      96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
          20          25          30
tca tgt tgg
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg      144
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
          35          40          45
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat      192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
          50          55          60
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att      240

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
65          70          75          80
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac      288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
          85          90          95
gtt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt      336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly

          100          105          110
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att gaa      384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu
          115          120          125
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc      432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
          130          135          140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa      480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
          145          150          155          160
gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt      528
Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
          165          170          175
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
          576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
          180          185          190
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc      624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
          195          200          205
gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc      666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
Leu
          210          215          220

```

<210> 28

<211> 222

<212> PRT

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 28
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

 20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

 35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

 50 55 60
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile

65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

 85 90 95
 Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly

 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu

 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln

145 150 155 160
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly

 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp

 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile

 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

 210 215 220

<210> 29
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (37)..(39)
 <220>

<221> mutation

<222> (70)..(72)
<220>

<221> mutation
<222> (148)..(150)
<220>

<221> mutation
<222> (232)..(234)
<220>

<221> mutation
<222> (295)..(297)
<220>

<221> mutation
<222> (325)..(327)
<220>

<221> mutation
<222> (382)..(384)
<220>

<221> mutation
<222> (466)..(468)
<220>

<221> mutation
<222> (481)..(483)
<220>

<221> mutation
<222> (499)..(501)
<400> 29

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg	
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144	
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	
35 40 45	
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat	192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	
50 55 60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile	
65 70 75 80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	
gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt	336
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly	

```

          100          105          110
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cag      384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Gln
          115          120          125
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc      432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
          130          135          140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa      480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
145          150          155          160
cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt      528
Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
          165          170          175
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
          576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
          180          185          190
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc      624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
          195          200          205
gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc      666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
Leu
          210          215          220
<210> 30
<211> 222
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<400> 30
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu

1          5          10          15
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

          20          25          30
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

          35          40          45
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

          50          55          60
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile

65          70          75          80
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

          85          90          95
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly

          100          105          110
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Gln

          115          120          125
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

```


<220>

<221> mutation

<222> (481)..(483)

<220>

<221> mutation

<222> (499)..(501)

<220>

<221> mutation

<222> (574)..(576)

<400> 31

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg	
gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144	
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	
35 40 45	
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat	192
Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	
50 55 60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile	
65 70 75 80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	
gtt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt	336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly	
100 105 110	
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att gaa	384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu	
115 120 125	
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc	432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile	
130 135 140	
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa	480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln	
145 150 155 160	
gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt	528
Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly	
165 170 175	
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt ttt	
576	
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe	
180 185 190	
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc	624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile	
195 200 205	

gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 32
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 32
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly
 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu
 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220
 <210> 33
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(666)

<220>

<221> mutation

<222> (37)..(39)

<220>

<221> mutation

<222> (70)..(72)

<220>

<221> mutation

<222> (148)..(150)

<220>

<221> mutation

<222> (232)..(234)

<220>

<221> mutation

<222> (295)..(297)

<220>

<221> mutation

<222> (325)..(327)

<220>

<221> mutation

<222> (382)..(384)

<220>

<221> mutation

<222> (466)..(468)

<220>

<221> mutation

<222> (481)..(483)

<220>

<221> mutation

<222> (499)..(501)

<220>

<221> mutation

<222> (574)..(576)

<400> 33

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg 48

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu

1 5 10 15

cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

20 25 30

tca tgt tgg

gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

35 40 45

gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att 240

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
 65 70 75 80
 gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt 336
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly

100 105 110
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cag 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Gln
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt ttt
 576

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile

Leu
 210 215 220
 <210> 34
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 34

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu

1 5 10 15
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

35 40 45
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

50 55 60
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
 65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly
 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Gln
 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu

210 215 220
 <210> 35
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

 <221> CDS
 <222> (1)..(387)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (43)..(45)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (88)..(90)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (142)..(144)
 <220>

 <221> mutation
 <222> (184)..(186)
 <220>

 <221> mutation

<222> (229)..(231)
 <220>

<221> mutation
 <222> (244)..(246)
 <220>

<221> mutation
 <222> (298)..(300)
 <400> 35

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30

aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 36
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides

pteronysinus
 <400> 36

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

50 55 60

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15
 ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30
 aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45
 aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60
 gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240

 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80
 gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95
 att gca cca aaa tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

 100 105 110
 gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125
 gat 387
 Asp
 <210> 38
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides
 pteronyssinus
 <400> 38
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

 1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

 20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

 35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

 50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu

 65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

 85 90 95
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

 100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125

Asp

<210> 39
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(387)
 <220>

<221> mutation
 <222> (43)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (88)..(90)
 <220>

<221> mutation
 <222> (142)..(144)
 <220>

<221> mutation
 <222> (229)..(231)
 <220>

<221> mutation
 <222> (244)..(246)
 <220>

<221> mutation
 <222> (298)..(300)
 <220>

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <400> 39

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt	48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val	
1 5 10 15	
ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt	96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly	
20 25 30	
aaa cca ttc	
caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144	
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala	
35 40 45	
aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta gaa gtt gat	192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp	

50 55 60
 gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
 att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
 gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
 gat 387
 Asp

<210> 40

<211> 129

<212> PRT

<213> Dermatophagoides

pteronysinus

<400> 40

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp

50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
 Asp

<210> 41

<211> 387

<212> DNA

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<220>

<221> mutation
 <222> (43)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (88)..(90)
 <220>

<221> mutation
 <222> (184)..(186)
 <220>

<221> mutation
 <222> (229)..(231)
 <220>

<221> mutation
 <222> (244)..(246)
 <220>

<221> mutation
 <222> (298)..(300)
 <220>

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <400> 41

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt	48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val	
1 5 10 15	
ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt	96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly	
20 25 30	
aaa cca ttc	
caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca aaa 144	
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys	
35 40 45	
aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat	192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp	
50 55 60	
gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg	240
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu	
65 70 75 80	
gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa	288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys	
85 90 95	
att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt	336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly	

100 105 110
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
gat 387

Asp
<210> 42
<211> 129
<212> PRT
<213> Dermatophagoides

pteronysinus
<400> 42
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

20 25 30
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys

35 40 45
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

50 55 60
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu

65 70 75 80
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
Asp

<210> 43
<211> 387
<212> DNA
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(387)
<220>

<221> mutation
<222> (43)..(45)
<220>

<221> mutation
<222> (88)..(90)
<220>

<221> mutation

<222> (142)..(144)
<220>

<221> mutation
<222> (184)..(186)
<220>

<221> mutation
<222> (229)..(231)
<220>

<221> mutation
<222> (244)..(246)
<220>

<221> mutation
<222> (298)..(300)
<220>

<221> mutation
<222> (382)..(384)
<400> 43

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

aaa cca ttc
caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

gat 387
Asp

<210> 44
<211> 129
<212> PRT
<213> Dermatophagoides

pteronyssinus
<400> 44

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

 20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

 35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

 50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

 85 90 95
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

 100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

 115 120 125
 Asp

- <210> 45
- <211> 387
- <212> DNA
- <213> Dermatophagoides pteronyssinus
- <220>

- <221> CDS
- <222> (1)..(387)
- <220>

- <221> mutation
- <222> (70)..(72)
- <220>

- <221> mutation
- <222> (88)..(90)
- <220>

- <221> mutation
- <222> (142)..(144)
- <220>

- <221> mutation
- <222> (184)..(186)
- <220>

- <221> mutation
- <222> (229)..(231)
- <220>

<221> mutation
 <222> (244)..(246)
 <220>

<221> mutation
 <222> (298)..(300)
 <220>

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <400> 45

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa aaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30

aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

ggt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80

ggt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387

Asp

<210> 46

<211> 129

<212> PRT

<213> Dermatophagoides

pteronysinus

<400> 46

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

gat 387
 Asp
 <210> 48
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides

pteronysinus
 <400> 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg

115 120 125
Asp

<210> 49
<211> 387
<212> DNA
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(387)
<220>

<221> mutation
<222> (43)..(45)
<220>

<221> mutation
<222> (70)..(72)
<220>

<221> mutation
<222> (91)..(93)
<220>

<221> mutation
<222> (142)..(144)
<220>

<221> mutation
<222> (184)..(186)
<220>

<221> mutation
<222> (220)..(220)
<220>

<221> mutation
<222> (244)..(246)
<220>

<221> mutation
<222> (382)..(384)
<400> 49

gat	caa	gtc	gat	gtc	aaa	gat	tgt	gcc	aat	cat	gaa	atc	aaa	gaa	gtt	48
Asp	Gln	Val	Asp	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	
1		5					10						15			
ttg	gta	cca	gga	tgc	cat	ggt	aac	gaa	cca	tgt	atc	att	cat	agc	ggt	96
Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Asn	Glu	Pro	Cys	Ile	Ile	His	Ser	Gly	
		20					25						30			
aaa	cca	ttc														
caa	ttg	gaa	gct	tta	ttc	gaa	gcc	aat	caa	aac	tca	gcg			144	
Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Ser	Ala	
		35					40					45				

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aaa tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387
 Asp
 <210> 50
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides
 pteronyssinus
 <400> 50
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
 Asp
 <210> 51
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(387)
 <220>

<221> mutation
 <222> (43)..(45)
 <220>

<221> mutation
 <222> (70)..(72)
 <220>

<221> mutation
 <222> (91)..(93)
 <220>

<221> mutation
 <222> (142)..(144)
 <220>

<221> mutation
 <222> (220)..(222)
 <220>

<221> mutation
 <222> (244)..(246)
 <220>

<221> mutation
 <222> (298)..(300)
 <220>

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <400> 51

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125
gat 387
Asp
<210> 52
<211> 129
<212> PRT
<213> Dermatophagoides
pteronyssinus
<400> 52
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp

50 55 60
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
Asp
<210> 53
<211> 387
<212> DNA
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<220>
<221> mutation
<222> (43)..(45)
<220>
<221> mutation
<222> (70)..(72)

<220>

<221> mutation

<222> (91)..(93)

<220>

<221> mutation

<222> (184)..(186)

<220>

<221> mutation

<222> (220)..(222)

<220>

<221> mutation

<222> (244)..(246)

<220>

<221> mutation

<222> (298)..(300)

<220>

<221> mutation

<222> (382)..(384)

<400> 53

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30

aaa cca ttc

caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp

50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125

gat 387

Asp

<210> 54

<211> 129

<212> PRT

<213> Dermatophagoides

pteronysinus

<400> 54

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

 20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

 35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp

 50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

 85 90 95
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

 100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

 115 120 125
 Asp

<210> 55

<211> 387

<212> DNA

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<220>

<221> mutation

<222> (43)..(45)

<220>

<221> mutation

<222> (91)..(93)

<220>

<221> mutation

<222> (142)..(144)

<220>

<221> mutation

<222> (184)..(186)

<220>

<221> mutation

<222> (220)..(222)
<220>

<221> mutation
<222> (244)..(246)
<220>

<221> mutation
<222> (298)..(300)
<220>

<221> mutation
<222> (382)..(384)
<400> 55

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

aaa cca ttc
caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

ggt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80
ggt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

gat 387

Asp

<210> 56

<211> 129

<212> PRT

<213> Dermatophagoides

pteronyssinus

<400> 56

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val

1 5 10 15
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

<221> mutation
 <222> (382)..(384)
 <400> 57

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa aaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

aaa cca ttc
 caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

ggt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

ggt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 58
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides

pteronysinus
 <400> 58

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val

1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly

20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp

50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu

65 70 75 80
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys

85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly

100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln

115 120 125
 Asp

<210> 59
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(861)
 <220>

<221> mutation
 <222> (133)..(135)
 <220>

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (562)..(564)
 <220>

<221> mutation
 <222> (664)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (728)..(730)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 59

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

aag gcg acg
 acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275 280 285
 <210> 61
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(861)
 <220>

<221> mutation
 <222> (196)..(198)

<220>

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (562)..(564)
 <220>

<221> mutation
 <222> (664)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (727)..(729)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 61

```

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1           5           10           15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
           20           25           30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
           35           40           45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
           50           55           60
tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240

Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65           70           75           80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
           85           90           95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

           100           105           110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
           115           120           125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
           130           135           140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145           150           155           160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
    
```


<222> (760)..(762)
 <400> 63

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

aag gcg acg
 acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

100 105 110

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

gcc acc gta agc gag gcg ctc agc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
 576

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190

gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys

Lys Ala Tyr
 210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250

255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 64
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 64
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

115 120 125
 Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly

145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu

180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu

195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr

210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu

225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly

260 265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275 280 285

<210> 65
<211> 861
<212> DNA
<213> Phleum pratense
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(861)
<220>

<221> mutation
<222> (133)..(135)
<220>

<221> mutation
<222> (409)..(411)
<220>

<221> mutation
<222> (562)..(564)
<220>

<221> mutation
<222> (664)..(666)
<220>

<221> mutation
<222> (726)..(728)
<220>

<221> mutation
<222> (760)..(762)
<400> 65

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110
 aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 gcc acc gta agc gag gcg ctc cgc aaa atc gcc gcc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140
 cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc gcc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg gcc gcc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Lys Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt gcc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt gcc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 66
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 66
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (559)..(561)
 <220>

<221> mutation
 <222> (664)..(666)
 <220>

<221> mutation
 <222> (726)..(728)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 67

```

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1          5          10          15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
          20          25          30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
          35          40          45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
          50          55          60
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65          70          75          80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
          85          90          95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

          100          105          110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
          115          120          125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
          130          135          140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
          145          150          155          160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
          165          170          175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag
    
```

576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Lys Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 68
 <211> 287
 <212
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 68
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140

<400> 69	
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly 1 5 10 15	48
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly 20 25 30	96
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly 35 40 45	
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys 50 55 60	192
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe 65 70 75 80	
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser 85 90 95	288
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr 100 105 110	336
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val 115 120 125	384
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130 135 140	432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145 150 155 160	480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165 170 175	528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag 576 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu 180 185 190	
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195 200 205	624
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr 210 215 220	672
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ggc gag gtc aag tac act gtc ttt gag Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu 225 230 235 240	720
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala 245 250	768
255 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc	816

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 70
 <211> 287
 <212
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 70
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly

 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu

 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu

 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr

 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu

 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly

260 265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275 280 285

<210> 71
<211> 861
<212> DNA
<213> Phleum pratense
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(861)
<220>

<221> mutation
<222> (133)..(135)
<220>

<221> mutation
<222> (397)..(399)
<220>

<221> mutation
<222> (562)..(564)
<220>

<221> mutation
<222> (640)..(642)
<220>

<221> mutation
<222> (726)..(728)
<220>

<221> mutation
<222> (760)..(762)
<400> 71

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110
 aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc gcc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140
 cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc gcc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg gcc gcc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc gcc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Gln Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt gcc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt gcc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 72
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 72
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly

 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu

 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu

 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr

 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu

 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly

 260 265 270
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

 275 280 285

<210> 73
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(861)
 <220>

<221> mutation
 <222> (133)..(135)
 <220>

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (562)..(564)
 <220>

<221> mutation
 <222> (631)..(633)
 <220>

<221> mutation
 <222> (730)..(732)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 73

```

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1          5          10          15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
          20          25          30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
          35          40          45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
          50          55          60
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65          70          75          80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
          85          90          95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

          100          105          110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
          115          120          125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
          130          135          140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
          145          150          155          160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
          165          170          175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
    
```

576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Gln Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 74
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 74
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140

<400> 75
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60
tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125
gcc acc gta agc gag gcg ctc agc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
Lys Ala Tyr
210 215 220
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250
255
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 76
 <211> 287
 <212
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 76
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly

 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu

 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu

 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr

 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu

 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly

260 265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275 280 285
<210> 77

<211> 861

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(861)

<220>

<221> mutation

<222> (196)..(198)

<220>

<221> mutation

<222> (409)..(411)

<220>

<221> mutation

<222> (562)..(564)

<220>

<221> mutation

<222> (664)..(666)

<220>

<221> mutation

<222> (730)..(732)

<220>

<221> mutation

<222> (760)..(762)

<400> 77

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

20 25 30

aag gcg acg

acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc 144

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly

35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

50 55 60

tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

65 70 75 80

gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

100 105 110
 aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 gcc acc gta agc gag gcg ctc cgc aaa atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag
 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Lys Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 78
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 78
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (556)..(558)
 <220>

<221> mutation
 <222> (640)..(642)
 <220>

<221> mutation
 <222> (727)..(729)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 79

```

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1           5           10           15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
           20           25           30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
           35           40           45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
           50           55           60
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65           70           75           80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
           85           90           95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

           100           105           110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
           115           120           125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
           130           135           140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
           145           150           155           160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
           165           170           175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag
    
```

576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc ggc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Gln Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 80
 <211> 287
 <212
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 80
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

 275 280 285
 <210> 81
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Phleum pratense
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(861)
 <220>

<221> mutation
 <222> (133)..(135)
 <220>

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (556)..(558)
 <220>

<221> mutation
 <222> (631)..(633)
 <220>

<221> mutation
 <222> (727)..(729)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)

<400> 81
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag
576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205
agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
Gln Ala Tyr
210 215 220
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250
255
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 82
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 82
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

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

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly

260 265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275 280 285

<210> 83
<211> 861
<212> DNA
<213> Phleum pratense
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(861)
<220>

<221> mutation
<222> (133)..(135)
<220>

<221> mutation
<222> (397)..(399)
<220>

<221> mutation
<222> (640)..(642)
<220>

<221> mutation
<222> (694)..(696)
<220>

<221> mutation
<222> (727)..(729)
<220>

<221> mutation
<222> (760)..(762)
<400> 83

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110
 aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc gcc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140
 cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc gcc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag
 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg gcc gcc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aag ttc atc gcc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Gln Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg gcc gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt gcc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc gcc gcc gcc acc gcc gct act ggt gcc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 84
 <211> 287
 <212>
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 84
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

<221> mutation
 <222> (397)..(399)
 <220>

<221> mutation
 <222> (631)..(633)
 <220>

<221> mutation
 <222> (694)..(696)
 <220>

<221> mutation
 <222> (727)..(729)
 <220>

<221> mutation
 <222> (760)..(762)
 <400> 85

```

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1          5          10          15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
          20          25          30
aag gcg acg
acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
          35          40          45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
          50          55          60
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65          70          75          80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
          85          90          95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

          100          105          110
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
          115          120          125
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
          130          135          140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
          145          150          155          160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
          165          170          175
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag
    
```

576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 Gln Ala Tyr
 210 215 220
 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ggc gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250
 255
 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285
 <210> 86
 <211> 287
 <212
 > PRT
 <213> Phleum pratense
 <400> 86
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly

 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe

 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val

 115 120 125
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val

 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

 275 280 285
 <210> 87
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <400> 87

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg cga act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg gct ttc	
tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144	
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	
35 40 45	
gct tac cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat	192
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	
50 55 60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att	240
Cys Ala	
Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile	
65 70 75 80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	
gtt gca cga gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt	336
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	

100 105 110

atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cga aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cgc gat aat ggt tac caa cca aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg
 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile
 Leu
 210 215 220
 <210> 88
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 88
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu

 1 5 10 15
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

 20 25 30
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

 35 40 45
 Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp

 50 55 60
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile

 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

 85 90 95
 Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly

 100 105 110
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg

 115 120 125
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

 130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220
 <210> 89
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(387)
 <400> 89
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa aaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15
 ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att cat cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
 20 25 30
 aaa cca ttc caa ttg
 gaa gcc gtt ttc gaa gcc aac caa aac aca aaa 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys
 35 40 45
 acc gct aaa att gaa atc aaa gcc tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60
 gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tac atg aaa tgc cca ttg 240
 Val Pro
 Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80
 gtt aaa gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt ccg aaa 288
 Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95
 att gca cca aaa tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt atg ggt 336
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
 100 105 110
 gat gat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
 Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125
 gat 387
 Asp
 <210> 90
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 90

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