

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521618

(P2004-521618A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 6 4
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	4 B O 6 5
C O 7 K 14/00	C O 7 K 14/00	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	Z C C 4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 321 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-543671 (P2002-543671)	(71) 出願人	503055934
(86) (22) 出願日	平成13年11月16日 (2001.11.16)		アルカベロ アクチェセルスカブ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月16日 (2003.5.16)		デンマーク デーコー 2970 ヘルスホ
(86) 国際出願番号	PCT/DK2001/000764		ルム ペーグ アレ 6-8
(87) 国際公開番号	W02002/040676	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成14年5月23日 (2002.5.23)		弁理士 中村 稔
(31) 優先権主張番号	PA 2000 01718	(74) 代理人	100067013
(32) 優先日	平成12年11月16日 (2000.11.16)		弁理士 大塚 文昭
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	60/249, 361		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成12年11月16日 (2000.11.16)	(74) 代理人	100065189
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 宍戸 嘉一
(31) 優先権主張番号	60/298, 170	(74) 代理人	100074228
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		弁理士 今城 俊夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規変異体アレルゲン

(57) 【要約】

複数の変異及び減少した I g E 結合親和性を有する新規組換えアレルゲンを開示する。前記アレルゲンは、天然に存在するアレルゲンの天然に存在しない変異体である。その全体のα炭素骨格三次構造は、本質的に保存される。さらに、この組換えアレルゲンの調製方法及びその使用も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然に存在するアレルゲンの変異体であって各々が前記天然に存在するアレルゲンの I g E 結合能力と比べて変異アレルゲンの特異的な I g E 結合能力を減少する少なくとも四つの第一変異を有し、前記第一変異の各々が別の残基による一つの表面露出アミノ酸残基の置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の種の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列の同じ位置に存在せず、前記第一変異の各々が各他の第一変異から少なくとも $15 \text{ \AA}$ が隔てられ少なくとも一つの面積 $800 \text{ \AA}^2$ である円形表面領域が変異を含まないように配置されることを特徴とする組換えアレルゲン。

【請求項 2】

10

第一変異が互いに $20 \text{ \AA}$ 、好ましくは $25 \text{ \AA}$ 、最も好ましくは $30 \text{ \AA}$ 隔てられている、請求項 1 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 3】

幾つかの第二変異を含み、前記第二変異の各々が前記天然に存在するアレルゲンと比べて変異アレルゲンの特異的な I g E 結合能力を減少させ、前記第二変異の各々は他の残基による一つの表面露出アミノ酸残基の置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の種の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列の同じ位置に存在せず、前記第二変異が前記円形領域の外側に位置する、請求項 1 又は 2 に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 4】

20

天然に存在するアレルゲンの置換される表面露出アミノ酸の少なくとも一つが約 20% 、好ましくは約 30% 、より好ましくは約 40% 、最も好ましくは約 50% の溶媒接触性を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 5】

天然に存在するアレルゲンの置換される表面露出アミノ酸の少なくとも一つが、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質において 70% より高く、好ましくは 80% より高く、最も好ましくは 90% より高い同一性で保存されている、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 6】

前記天然に存在するアレルゲンと本質的に同じ α 炭素骨格三次構造を有する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

30

【請求項 7】

変異体アレルゲンへ組み込まれる各アミノ酸残基が前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の属、好ましくは亜科、さらに好ましくは科、より好ましくは上科、より好ましくは亜綱、より好ましくは亜目、最も好ましくは目の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列の同じ位置に存在しない、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 8】

変異アレルゲンに対する特異的な I g E 結合性が少なくとも 5% 、好ましくは少なくとも 10% 減少されることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

40

【請求項 9】

変異体及び天然に存在するアレルゲン分子の α 炭素骨格三次構造を比較した場合、原子座標の平均標準偏差が $2 \text{ \AA}$ より小さいことを特徴とする、請求項 6 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 10】

前記円形表面領域が $15 \sim 25$ アミノ酸残基の原子を含むことを特徴とする、請求項 1～9 のいずれか記載の組換えアレルゲン。

【請求項 11】

表面露出アミノ酸残基が溶媒接触性に関して順位付けられること、及び、より溶媒接触可

50

能であるアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が置換されることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 12】

表面露出アミノ酸残基が、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質における保存の程度に関して順位付けられること、及び、より保存されるアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が置換されることを特徴とする、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 13】

変異体アレルゲンが天然に存在しないアレルゲンである、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

10

【請求項 14】

5 ～ 20、好ましくは 6 ～ 15、さらに好ましくは 7 ～ 12、最も好ましくは 8 ～ 10 の第一変異を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 15】

変異体アレルゲンが第一変異あたり 1 ～ 4 つの第二変異を含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 16】

一つ以上の置換が部位特異的変異誘発によって行われることを特徴とする、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 17】

一つ以上の置換が DNA シャッフリングによって行われることを特徴とする、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

20

【請求項 18】

吸入アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 19】

花粉アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 18 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 20】

分類学上ファガレス目、オレアレス目又はピナレス目由来の花粉アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 19 記載の組換えアレルゲン。

30

【請求項 21】

Bet v 1 の変異体であることを特徴とする、請求項 20 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 22】

一つ以上の置換が 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 及び E-73 からなる群より選択される、請求項 21 記載の組換えアレルゲン。

40

【請求項 23】

分類学上ポアレシ目由来の花粉アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 19 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 24】

分類学上アステラレス目又はウルチカレス目由来の花粉アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 19 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 25】

50

イエダニアレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 18 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 26】

デルマトファゴイデス由来のダニアレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 25 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 27】

ゴキブリアレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 18 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 28】

動物アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 18 記載の組換えアレルゲン。 10

【請求項 29】

ネコ、イヌ又はウマ由来の動物アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 28 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 30】

毒物アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 31】

分類学上ヒメノプテラ目由来の毒物アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 30 記載の組換えアレルゲン。

【請求項 32】

分類学上ベスピダエ目、アピダエ目又はフォルミコイダエ目由来の毒物アレルゲンの変異体であることを特徴とする、請求項 31 記載の組換えアレルゲン。 20

【請求項 33】

Ves v 5 の変異体であることを特徴とする、請求項 30～32 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 34】

一つ以上の置換が 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 及び I-182 からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 33 記載の組換えアレルゲン。 30 40

【請求項 35】

医薬品として使用するための、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン。

【請求項 36】

アレルギーを予防及び／又は治療するための医薬品を調製するための、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲンの使用。

【請求項 37】

各変異体が他の変異体の少なくとも一つに存在しない第一変異の少なくとも一つを有し、前記各変異体について第二変異が前記第一変異の各々から半径 15 Å の範囲内に存在しな 50

い、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の 2 つ以上の組換え変異体アレルゲンを含む組成物。

【請求項 38】

2～12、好ましくは 3～10、さらに好ましくは 4～8、最も好ましくは 5～7 の変異体を含む請求項 37 記載の組成物。

【請求項 39】

医薬品として使用するための、請求項 37 又は 38 記載の組成物。

【請求項 40】

アレルギーを予防及び／又は治療するための医薬品を調製するための、請求項 37 又は 38 に記載の組成物の使用。

10

【請求項 41】

請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン、又は、請求項 37 若しくは 38 に記載の組成物を含み、これに組合せて任意で医薬として許容される担体及び／又は賦形剤、及びアジュバントを含んでもよいことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 42】

アレルギーを患う患者の天然に存在するアレルゲンによって誘発されるアレルギー反応に対するワクチンの形態であることを特徴とする、請求項 41 記載の医薬組成物。

【請求項 43】

請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン、請求項 37 若しくは 38 記載の組成物、又は、請求項 41 若しくは 42 記載の医薬組成物を対象者に投与することを含む、対象者に免疫応答を発生させる方法。

20

【請求項 44】

請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン、請求項 37 若しくは 38 記載の組成物、又は、請求項 41 若しくは 42 記載の医薬組成物を対象者に投与することを含む、対象者のワクチン接種又は治療。

【請求項 45】

医薬として許容される物質及び／又は賦形剤と共に、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン、又は、請求項 37 若しくは 38 記載の組成物を混合することを含む、請求項 41 若しくは 42 記載の医薬組成物を調製する製法。

【請求項 46】

請求項 45 記載の製法によって得られる医薬組成物。

30

【請求項 47】

請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲン、請求項 37 若しくは 38 記載の組成物、又は、請求項 41～42 若しくは 46 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を対象者に投与することを含む、対象者のアレルギー反応の治療、予防又は軽減のための方法。

【請求項 48】

a) 天然に存在するアレルゲンにおいて少なくとも 20% の溶媒接触性を有するアミノ酸残基の番号を同定すること；

b) 前記同定されたアミノ酸残基から少なくとも四つのアミノ酸残基を選択することであって、各選択されたアミノ酸が各他の選択されたアミノ酸から少なくとも 15 Å 隔てられており、少なくとも一つの面積 800 Å² の円形表面領域が前記選択されたアミノ酸を含まないように配置されるように前記選択を行うこと；及び

40

c) 前記各選択されたアミノ酸に対して、前記天然に存在するアレルゲンの結合能力と比べて変異アレルゲンの特異的 IgE 結合能力を減少させる第一変異を起こすことであって、前記第一変異の各々は別のアミノ酸による前記選択されたアミノ酸残基の置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の種の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列の同じ位置に存在しないことを特徴とする、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組換えアレルゲンを調製する方法。

【請求項 49】

50

前記同定されたアミノ酸残基を溶媒接触性に関して順位付けること、及び、より溶媒接触可能なアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸を置換することを特徴とする、請求項４８記載の方法。

【請求項５０】

前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質において、７０％より高い同一性を保存する同定されたアミノ酸残基を選択することを特徴とする、請求項４８又は４９記載の方法。

【請求項５１】

前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質における保存の程度に関して前記同定されたアミノ酸残基を順位付けすること、及び、より保存されたアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸を置換することを特徴とする、請求項５０記載の方法。 10

【請求項５２】

前記天然に存在するアレルゲンと本質的に同じα炭素骨格三次構造を有する変異体アレルゲンを形成するために、前記同定されたアミノ酸を選択することを含む、請求項４８～５１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

アミノ酸残基の置換が部位特異的変異誘発によって行われることを特徴とする、請求項４８～５２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５４】

対応する天然に存在するアレルゲンをコードするＤＮＡのＤＮＡシャッフリング（分子育種）によって得られるＤＮＡ配列からアレルゲンが作製されることを特徴とする、請求項１～３４のいずれか１項に記載の組換えアレルゲンを調製する方法。 20

【請求項５５】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の組換えアレルゲンをコードするＤＮＡ配列、その誘導体、その部分配列、その縮重配列又はストリンジェントな条件下でそれらとハイブリダイズする配列であって、少なくとも一つのＢ細胞エピトープを有するペプチドをコードする前記誘導体、前記部分配列、前記縮重配列又は前記ハイブリダイズする配列。

【請求項５６】

天然に存在するアレルゲンをコードするＤＮＡ配列の誘導体である、請求項５５記載のＤ 30
ＮＡ配列。

【請求項５７】

天然に存在するアレルゲンをコードするＤＮＡの部位特異的変異誘発によって誘導体 that 得られる、請求項５６記載のＤＮＡ配列。

【請求項５８】

図３に示す配列の誘導体であって、V 2, D 7 2, E 8 7, K-1 2 9, E-6 0, N-4 7, K-6 5, P-1 0 8, N-1 5 9, D-9 3, K-1 2 3, K-3 2, D-1 2 5, R-1 4 5, D-1 0 9, E-1 2 7, Q-3 6, E-1 3 1, L-1 5 2, E-6, E-9 6, D-1 5 6, P-6 3, H-7 6, E-8, K-1 3 4, E-4 5, T-1 0, V-1 2, K-2 0, S-1 5 5, H-1 2 6, P-5 0, N-7 8, K-1 1 9, V-2, L-2 4, E-4 2, N-4, A-1 5 3, I-4 4, E-1 3 8, G-6 1, A-1 3 0, R-7 0, N-2 8, P-3 5, S-1 4 9, K-1 0 3, Y-1 5 0, H-1 5 4, N-4 3, A-1 0 6, K-1 1 5, P-1 4, Y-5, K-1 3 7, E-1 4 1, E-8 7 及び E-7 3 からなる群より選択される変異を少なくとも四つ有するアレルゲンをコードするように変異するＤＮＡ配列である、請求項５５～５７のいずれか１項に記載のＤＮＡ配列。 40

【請求項５９】

図１３に示す配列の誘導体であって、K-1 6, K-1 8 5, K-1 1, K-4 4, K-2 1 0, R-6 3, K-1 3, F-6, K-1 4 9, K-1 2 8, E-1 8 4, K-1 1 2, F-1 5 7, E-3, K-2 9, N-2 0 3, N-3 4, K-7 50

8, 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及びI-182からなる群より選択される変異を少なくとも四つ有するアレルゲンをコードするように変異するDNA配列である、請求項55～57のいずれか1項に記載のDNA配列。

【請求項60】

図16に示す配列の誘導体であって、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及び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及びK-15からなる群より選択される変異を少なくとも四つ有するアレルゲンをコードするように変異するDNA配列である、請求項55～57のいずれか1項に記載のDNA配列。

【請求項61】

請求項55～60のいずれか1項に記載のDNAを含む、発現ベクター。

【請求項62】

請求項61記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項63】

請求項62記載の宿主細胞を培養する工程を含む、組換え変異体アレルゲンを作製する方法。

【請求項64】

天然に存在するアレルゲンに対して特異的なT細胞クローン又はT細胞株を刺激する能力を有するT細胞エピトープを少なくとも一つ含む、請求項1～34のいずれか1項に記載の組換えアレルゲン、又は、請求項55～60のいずれか1項に記載のDNA配列によってコードされる組換えアレルゲン。

【請求項65】

請求項1～34のいずれか1項に記載の組換え変異体アレルゲン、又は、請求項37若しくは38記載の組成物を用い、対象者のIgEを含むサンプルと前記変異体又は前記組成物を混合して前記サンプル中のIgEと前記変異体間の反応性レベルを評価する、対象者の治療の妥当性、安全性又は成果を評価するための診断的アッセイ。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【0001】

(発明の分野)

本発明は、天然に存在するアレルゲンの変異体である新規組換えアレルゲンに関する。また本発明は、新規組換え変異体アレルゲンの混合物を含む組成物にも関する。さらに本発明は、前記組換え変異体アレルゲンの調製方法、及び、組換え変異体アレルゲンを含むワクチンを含む医薬組成物の調製方法に関する。さらなる態様において本発明は、対象者に免疫応答を発生させる方法、対象者のワクチン接種又は治療、及び、本発明の前記組成物を調製するための方法に関する。

(背景技術)

遺伝的素因がある個体は、種々の環境原因に由来する抗原に対し、曝露されるアレルゲン 10
に対して感作される(アレルギー性)。以前に感作された個体が同じ又は相同なアレルゲンに再び曝露された時に、アレルギー反応が起こる。アレルギー応答は花粉症、鼻結膜炎、鼻炎及び喘息から、例えばミツバチ又はスズメバチの針又は虫刺されに反応しての全身アナフィラキシー及び死亡までにわたる。この反応は即時型であり、草本、樹木、雑草、虫、食物、薬物、化学薬品及び香水に由来する化合物のような種々のアトピー性アレルゲンによって引き起こされ得る。

しかしながら、個体が初めてアレルゲンに曝露された時には、応答は起こらない。最初の適応応答は時間がかかり、通常は何の症状も引き起こさない。しかしアレルゲンと反応する能力がある抗体及びT細胞が産生されると、続いて起こるいかなる曝露も症状を誘発し得る。このようにアレルギー応答は、命にかかわり得る深刻な病理状態を免疫応答自身が 20
引き起こし得ることを実証する。

【0002】

アトピー性アレルギーに関与する抗体は、本来IgEクラスの免疫グロブリンに属する。IgEは、肥満細胞及び好塩基球の表面の特異的レセプターに結合する。肥満細胞に結合したIgEと特異的アレルゲンの複合体形成に続く細胞表面上のレセプターの架橋結合が、標的細胞のレセプターを通じたシグナル伝達及び生理反応を生じさせる。脱顆粒が特にヒスタミン、ヘパリン、好酸性白血球に対する化学走化因子、気管平滑筋細胞の長期的な収縮を引き起こすロイコトリエンC₄、D₄及びE₄の放出を生じさせる。その結果生じる影響は、事実上全身又は局所的であり得る。

抗体媒介性の過敏反応は四種類、すなわちI型、II型、III型及びIV型に分類することが 30
できる。I型アレルギー反応は、抗原の曝露に続いて数秒又は数分以内に起こる古典的即時型過敏反応である。これらの症状はアレルゲン特異的IgEによって媒介されている。

一般的にアレルギー反応は、例えば花粉、イエダニ、動物の毛及びフケ、毒物及び食品に存在するタンパク質アレルゲンに対する応答として観察される。

アレルギー反応を減少させる又は排除するために、慎重に制御され繰り返されるアレルギーワクチン投与が通常用いられる。アレルギーワクチン接種は、かなり長期間にわたって投与量を増加しながら非経口、鼻腔内又は舌下投与によって伝統的に行われており、患者の脱感作を導く。その正確な免疫学的メカニズムは知られていないが、誘導されるアレル 40
ゲン特異的T細胞の表現型の違いが特に重要であると考えられる。

【0003】

アレルギーワクチン接種

ワクチン接種の概念は2つの基本的な免疫系の特徴、すなわち特異性及び記憶に基づく。ワクチン接種はレシピエントの免疫系を初回抗原刺激し得て、同様なタンパク質に対する曝露が繰り返された時に、例えば微生物感染症の攻撃に対して免疫系はさらに厳しく応答する状態になり得る。ワクチンは、レシピエントにそのような防御免疫応答を発生させることを目的としてワクチン接種に用いられることを意図するタンパク質の混合物である。この防御は、ワクチン及び相同抗原に存在する構成成分のみを含み得る。

他の種類のワクチン接種と比較して、アレルギーワクチン接種はアレルギー患者において 50
進行中の免疫応答の存在によって複雑にされている。この免疫応答は、アレルゲンに対す

る曝露においてアレルギー症状の放出を媒介するアレルゲン特異的 I g E の存在によって特徴付けられる。このように、自然源由来のアレルゲンを用いるアレルギーワクチン接種は、患者に対し命にかかわる極端な結果となる副作用の本来的な危険性を有する。

この問題を回避するアプローチは、三つのカテゴリーに分類され得る。実際には多くの場合、2つ以上のカテゴリーに由来する処置が併用される。処置の第一カテゴリーは、十分な累積投与量を達成するための長期間にわたる少用量の複数回投与を含む。処置の第二カテゴリーは、アルミニウムヒドロキシドのようなゲル状物質中へのアレルゲンの混合によるアレルゲンの物理改変を含む。アルミニウムヒドロキシド製剤はアジュバント効果、及び、活性アレルゲン成分の組織濃度を減少させる緩慢なアレルゲン放出という徐放製剤効果を有する。処置の第三カテゴリーは、アレルギー性すなわち I g E 結合性を減少するためのアレルゲンの化学改変を含む。 10

成功したアレルギーワクチン接種の背後にある詳細なメカニズムには、議論の余地が残されている。しかしながら、免疫応答の全体的な調節において T 細胞が重要な役割を果たすことは同意されている。現在の総意によると、T 細胞表現型の両極端である T h 1 及び T h 2 間の関係が個体のアレルギー状態を決定する。アレルゲンで刺激されると、T h 1 細胞はインターフェロン γ によって支配されるインターロイキンを分泌して防御免疫をもたらし、個体は健康である。反対に T h 2 細胞はインターロイキン 4 及び 5 を優勢に分泌して I g E 合成及び好酸球増加をもたらし、個体はアレルギー状態にある。I n v i t r o の研究は、関連する T 細胞エピトープを含むアレルゲン由来のペプチドでの攻撃によってアレルゲン特異的 T 細胞応答を変化させる可能性を示している。従って、新しいアレルギーワクチンに対する現在のアプローチは主に T 細胞に対処することに基づき、T 細胞を静めること（アレルギー誘導）又は応答を T h 2 表現型から T h 1 表現型にシフトすることを目的とする。 20

【0004】

抗体結合エピトープ（B細胞エピトープ）

F_ab-抗原複合体の X 線結晶解析は、抗体結合エピトープの理解を高めている。この種類の解析によると、抗体結合エピトープは 15～25 アミノ酸残基に由来する原子を含む抗原表面の一部として定義することができ、前記アミノ酸残基は抗体原子と直接相互作用できる距離範囲内にある。抗原抗体相互作用の親和性は、ファンデルワールス相互作用、水素結合又はイオン結合が寄与するエンタルピーのみからは予測することができない。 30
界面からの水分子のほぼ完全な排除に付随するエントロピーは、同様な規模のエネルギー貢献を示す。これは、相互作用する分子の輪郭間の完全な適合が、抗原抗体高親和性相互作用の根底にある主要な要因であることを意味する。

WO 97/30150（参考文献 1）においてタンパク質分子の集団がクレームされており、このタンパク質分子は親タンパク質に比べてアミノ酸配列における特異的変異の分布を有する。この記述からこの発明は、親タンパク質と比べて改変されるが、処理され消化された、T 細胞に対して親タンパク質（天然に存在するアレルゲン）と同じ様式で提示されるアナログを作製することに関すると考えられる。これにより、改変された T 細胞応答が得られる。改変タンパク質ライブラリーは PM（節約（p a r s i m o n i o u s）変異誘発）を表す技術を用いて調製される。 40

WO 92/02621（参考文献 2）において組換え DNA 分子が記述されており、この分子は A l n g 1、C o r a 1 及び B e t v 1 より選択されるファガレス目樹木アレルゲンの少なくとも一つのエピトープを有するポリペプチドをコードする DNA を含む。この明細書に記述される組換え分子は全て、天然に存在するアレルゲンの配列に対応するアミノ酸配列又はその一部を有する。

WO 90/11293（参考文献 3）は特に、ブタクサ花粉の単離アレルギー性ペプチド及び改変ブタクサ花粉ペプチドに関する。ここで開示されたペプチドは、天然に存在するアレルゲンの配列又はその天然に存在するイソフォームの配列のいずれかに対応するアミノ酸配列を有する。

【0005】

アレルゲンの化学改変

アレルゲンの化学改変に対して複数のアプローチが行われている。70年代初めのアプローチは、アレルゲンのポリマーとの化学共役、及び、ホルムアルデヒドを用いたアレルゲンの化学架橋結合などを含み、いわゆる「アレルゴイド」を作製することを含む。これらのアプローチの理論的根拠は、化学リガンドの付加によるIgE結合エピトープのランダム破壊が、この複合体分子量を増加することによって免疫原性を保持する一方でIgE結合性を減少することである。「アレルゴイド」作製に固有な不利益は、化学架橋結合工程の制御における困難、及び、得られる高分子量複合体の解析及び標準化における困難に結び付けられる。「アレルゴイド」は現在臨床使用されており、IgE結合エピトープのランダム破壊のために従来ワクチンに比べて多い用量を投与することができる。しかし、その安全性及び有効性評価基準は、従来ワクチンの使用を超えて改善されていない。

より最近のアレルゲンの化学改変に対するアプローチは、アレルゲンの三次構造を全体的に破壊してIgE結合を排除することを目的とし、治療上の本質的な標的がT細胞特異的なアレルゲンであると仮定している。このようなワクチンは最小T細胞エピトープを表す合成ペプチド由来のアレルゲン配列、結合T細胞エピトープを表すさらに長いペプチド、免疫優性T細胞エピトープ領域を表す合成ペプチド由来のより長いアレルゲン配列、又は、組換え技術により二つ半分に切断されたアレルゲン分子を含む。この理論的根拠に基づく別のアプローチは、“低IgE結合”組換えイソフォームの使用を提案している。天然アレルゲンは不均一であって、およそ25%に至るアミノ酸置換を有するイソアレルゲン及び変異体を含むことが、近年明らかになっている。幾つかの組換えイソアレルゲンは、おそらく不可逆的な変性によって三次構造が全体的に破壊されるため、IgE結合における効果が弱まることが見出されている。

【0006】

In vitroの変異誘発及びアレルギーワクチン接種

In vitroの部位特異的変異誘発によりアレルゲン性を減少する試みが、Der f 2 (Takai et al、参考文献4)、Der p 2 (Smith et al、参考文献5)、39 kDaのデルマトファゴイデス・ファリナエ (Dermatophagoides farinae) アレルゲン (Aki et al、参考文献6)、ハチ毒物ホスホリパーゼA2 (Forster et al、参考文献7)、Ara h 1 (Birks et al、参考文献8)、Ara h 2 (Stanley et al、参考文献9)、Bet v 1 (Ferreira et al、参考文献10及び11)、カバノキ・プロフィリン (Wiedemann et al、参考文献12) 及びOry s 1 (Alvarez et al、参考文献13) を含む種々のアレルゲンを用いて行われている。

これらのアプローチの理論的根拠は、この場合もやはりアレルゲン特異的T細胞に向けられているが、一方同時に組換え変異体アレルゲンの三次構造の破壊によるIgE結合性の減少又は排除によってIgEが媒介する副作用の危険性を減少することである。これらのアプローチの理論的根拠は、優性IgE結合エピトープの概念を含まず、B細胞及び抗体産生をも伴う新しい防御免疫応答を開始させるという概念を含まない。

Ferreira等の論文 (参考文献11) は、IgE結合性を減少する目的で部位特異的変異誘発の使用を記述している。この論文の中でBet v 1の三次元構造が述べられているが、著者等は変異のためのアミノ酸残基 (その半分は低い程度の溶媒露出を有する) の予測のためにこの構造を使用していない。彼等はむしろ、ここに記述する保存表面領域の同定に基づく構造という概念と異なり、タンパク質における機能的残基の予測のために開発された方法を用いている。この著者等は α 炭素骨格三次構造の保存を議論しているが、その概念は治療的戦略の一部ではなく単にin vitroのIgE結合性を評価するために含まれるだけである。さらに、一般的な問題であるがCDスペクトルの標準化がサンプルの空間的な大きさの変性の評価を妨げるために、示された証拠は不十分である。記載された治療的戦略はアレルゲン特異的T細胞におけるトレランスの誘導を目的としており、新しい免疫応答の開始は述べられていない。

Wiedemann等による論文（参考文献12）は、モノクローナル抗体エピトープを特徴付ける目的のため、部位特異的変異誘発及びペプチド合成の使用を記述している。この著者等は抗原の三次構造について知識があり、この知識を使用し変異誘発のためアミノ酸を露出する表面を選択している。相同配列と異なるアミノ酸が選択されているため、用いられたアルゴリズムは本発明者により記述されるものと反対であると言える。この研究は、表面露出アミノ酸の置換はモノクローナル抗体の結合特性を改変する能力を有することを実証しているが、これは通常の知識を考慮すれば驚くべきことではない。記述された実験はアレルギー患者の血清IgEのようなポリクローナル抗体の結合性における変化を評価することを設計していない。この実験の一つは定量的評価には適していないが血清IgEを適用することを含み、行われた変異誘発によってIgE結合性は影響されないようである。 10

Smith等による論文（参考文献5）は、モノクローナル抗体のエピトープマッピング及びIgE結合性の減少を目的とする部位特異的変異誘発の使用を記述している。この著者等は三次構造の知識がなく、 α 炭素骨格三次構造の保存を評価する試みを行っていない。用いられたアルゴリズムは、変異誘発のために選択されたアミノ酸が実際に分子表面に露出されることを保証していない。記述された変異体の一つのみが、IgE結合性の実質的な減少をもたらす。この変異体は試験した抗体全部の結合性を欠いており、三次構造が破壊されていることを示している。この著者等は治療的戦略を定めておらず、新しい免疫応答の開始は言及されていない。 20

Columbo等による論文（参考文献14）は、部位特異的変異誘発及びペプチド合成の使用によるIgE結合エピトープの研究を記述している。この著者等は、相同タンパク質の結晶構造に基づく三次元コンピューターモデル構造を使用し、分子表面上のエピトープの存在を例示している。エピトープを表す合成ペプチドを用いて、一次構造相同性を示す異なるアレルゲン上のエピトープのさらなる存在が取り扱われている。この治療的戦略は、一価IgE結合エピトープを表すこの合成ペプチドを用いた治療に基づく。相同アレルゲン間の保存表面領域及び新しい防御免疫応答を開始するという治療的概念は、言及されていない。 30

Spangfort等による論文（参考文献15）は、主要なカバノキアレルゲンの三次元構造及び保存された表面露出パッチを記述している。この論文は主要なIgE結合エピトープも部位特異的変異誘発も言及しておらず、治療的応用も扱われていない。 30

上記研究のいずれにおいても、表面露出アミノ酸の置換によってIgE結合性が減少する一方で α 炭素骨格三次構造を保存することを記述していない。上記言及されたアプローチの理論的根拠は、優性IgE結合エピトープの概念を含まず、新しい防御免疫応答を開始するという治療的概念を含まない。

WO 99/47680は、アレルゲンの α 炭素骨格三次構造を保持したままでの規定した重要な位置への人為的アミノ酸置換の導入を開示している。特にWO 99/47680は天然に存在するアレルゲンに由来する天然に存在しない変異体である組換えアレルゲンを開示し、この組換えアレルゲンにおいてはB細胞エピトープの少なくとも一つの保存された表面露出アミノ酸残基が他の残基によって置換され、これは前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の目の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列において同じ位置には起こらない。前記変異体アレルゲンは前記天然に存在するアレルゲンと本質的に同じ α 炭素骨格三次構造を有し、前記天然に存在するアレルゲンに比べ変異アレルゲンに対する特異的IgE結合性が減少している。 40

WO 99/47680において開示される組換えアレルゲンは、a) 前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の目の範囲内にある全既知相同タンパク質において、70%より高い同一性で保存される天然に存在するアレルゲンのアミノ酸残基を同定すること、b) 少なくとも一つのB細胞エピトープを含み、少なくとも20%の溶媒接触性を有することにより定義され、アレルゲン分子の三次元表面の少なくとも $400 \text{ \AA}^2$ にわたって密着して連結される保存アミノ酸残基の少なくとも一つのパッチを決定すること、及びc) 前記少なくとも一つのパッチにおいて、少なくとも一つのアミノ酸残基がアレルゲン 50

分子の全体的な α 炭素骨格三次構造を本質的に保存しながら特定の位置で他の非保存的アミノ酸残基により置換されることによって、得ることができる。

【0007】

(発明の目的)

本発明の理論的根拠

本発明はユニークな原理に基づいている。この原理によると、成功したアレルギーワクチン接種のメカニズムは進行中のTh2型免疫応答の変更ではなく、むしろB細胞及び抗体形成物による三次エピトープ認識に関する新しい免疫応答の並行的開始である。この新しい免疫応答は部分的にTh1型免疫応答であると信じられている。このモデルは、成功したワクチン接種治療により特異的IgEレベルが影響されないこと、及び、成功した治療は多くの場合アレルゲン特異的IgG4の実質的な増加を伴うことの観察によって支持される。加えて、アレルゲン攻撃前後の鼻のバイオプシー研究はTh2様表現型を有するT細胞の減少を示さないが、むしろTh1様T細胞の増加が観察される。ワクチン（又は医薬組成物）が気道以外の経路を経て投与される場合、進行中のTh2応答とは物理的に離れた位置において新しい免疫応答が発達し、二つの応答が並行して存在することを可能にしていることが仮定される。

免疫系の別の重要な側面は、いわゆる優性IgE結合エピトープの存在の表明である。これら優性IgE結合エピトープは、抗体結合を収容するのに十分な大きさの密着した表面領域に依存する三次構造によって構成されており、近縁種由来のイソアレルゲン、変異体及び／又は相同アレルゲンのうちで保存されることが提唱される。相同アレルゲン上の同様なエピトープに結合する能力がある交差反応性のIgEの存在は、例えばハンノキ、カバノキ及びハシバミといった種々の近縁種、多様な草本種又はデルマトファゴイデ種の様々なイエダニに対してアレルギー患者が頻繁に反応するという臨床観察によって支持される。これはさらに、近縁種由来の相同アレルゲン間のIgE交差反応性、及び、相同アレルゲンに対するIgE結合を阻害する一つのアレルゲンの能力を実証する研究室での実験（Ipsen et al., 1992, 参考文献16）によって支持される。曝露及び免疫応答は、用量依存的な様式に関連することがよく知られている。これらの観察の組合せに基づき、保存表面領域は非保存表面領域よりも高用量で免疫系に対して曝露されて高親和性を伴うIgE抗体産生を生じることが仮定され、従って「優性IgE結合エピトープ」という用語で呼ぶ。

この原理によると、アレルゲンは天然アレルゲンと本質的に同じ α 炭素骨格三次構造を有し、IgE結合性の減少を目的とする変異誘発のための標的を表す保存パッチを取り囲む領域の表面トポロジーの保存を確実にすることが必要不可欠である。これらの基準を満たすことにより、アレルゲンは安全性を妥協することなく防御免疫応答を発生させることにおいてその効果が改善し、相対的に高い用量で投与される可能性を有する。さらに本発明は、アレルギー症状はエフェクター細胞、すなわち肥満細胞及び好塩基球の表面に高親和性IgEレセプターFc ϵ RIを介して結合した二つの特異的IgEとアレルゲンの架橋結合により引き起こされるという発見に基づく。説明のために、我々はIgE結合エピトープを伴うアレルゲンの理論的モデルを示す図15に言及する。肥満細胞からのメディエーター放出の誘導及びそれによるアレルギー症状は、肥満細胞表面に結合したIgEのアレルゲン媒介架橋結合によって影響を受ける（図15Aを参照）。図15Bに示す状態において、エピトープの二つがIgE結合能力を減少するように変異させられて、それによりアレルゲン媒介架橋結合が妨害される。これに関連して、アレルゲンは通常三つより多いB細胞エピトープを含むことを述べるべきである。しかしながら、図15に描かれた理論上の状態から、より多くのエピトープがIgE結合能力を除去又は減少されるように変異させられるにつれて、アレルゲン媒介架橋結合及び結果として生ずるアレルギー症状の危険性がより低下することが想定され得る。

しかしながら、変異アレルゲンがIgG応答を含む新しい免疫応答を生じることが可能になるためには、アレルゲンは少なくとも一つの原型のエピトープを含まなければならない。好ましくは、この原型のエピトープが優性エピトープである。なぜならそのような変異

10

20

30

40

50

アレルゲンがワクチン接種に用いられる場合、改善された防御を提供するであろうからである。

結論として、本発明の発明概念は、複数の B 細胞エピトープにおいて I g E 結合性を減少する変異及び少なくとも一つの原型のエピトープを有する変異アレルゲンが、一方ではアレルゲン媒介架橋結合を減少し他方では I g E に競合する結合能力を有する I g G 応答の発生を可能にし得るという認識に基づく。このように、前記変異アレルゲンはアナフィラキシー反応の危険性を強く減少させ得る点で非常に有利なアレルゲンを構成するであろう。

また、本発明は、理想的にはその多数又は全エピトープが原型のまま提示されるような変異アレルゲンの異なる混合物を含むワクチンは、アレルギー症状に対して防御を誘導する能力において、この変異アレルゲンの起源である天然に存在するアレルゲンと同等な効果が有り得るという認識に基づく。

【0008】

(発明の要約)

本発明は、各変異エピトープの特異的 I g E 結合能力の減少を目的として、複数の特定の重要な位置、すなわち I g E 結合エピトープへの人為的なアミノ酸置換の導入に関する。本発明は、以下の点で特徴付けられる組換えアレルゲンを提供する。この組換えアレルゲンは天然に存在するアレルゲンの変異体であって、各々が前記天然に存在するアレルゲンの I g E 結合能力と比べて変異アレルゲンの特異的 I g E 結合能力を減少する少なくとも四つの第一変異を有し、各第一変異は他の残基による一つの表面露出アミノ酸残基の置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の目の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列の同じ位置に存在せず、各第一変異は各他の第一変異から少なくとも $15 \text{ \AA}$ 隔てられており、かつ面積 $800 \text{ \AA}^2$ の円形表面領域の少なくとも一つが変異を含まないように配置される。

理論に縛られることなく、B 細胞エピトープはアレルゲンの全表面の大部分にわたって分布し得ることが信じられている。さらに、少なくとも複数のエピトープが重複エピトープの多数を含むエピトープのクラスターの一部を構成することの実験証拠が存在する。従って本発明に対する理論的根拠は、どの表面露出アミノ酸も変異の潜在的部位を構成し、結果として変異は特異的 I g E を結合する能力を減少し得ることである。

従って、第一変異は相互に関してその位置によって規定され、すなわち離して隔てられ、それらがエピトープの分離クラスターに存在する変異であることを確実にする。

本発明は、請求項 1 に記載する二つ以上の異なる組換え変異体アレルゲンを含む組成物も提供する。各前記変異体は少なくとも一つの主要な変異を有することによって規定され、その変異は別の変異体の少なくとも一つには存在しない。各変異体に対して各前記主要な第一変異から半径 $15 \text{ \AA}$ の範囲内に第二変異は存在しない。この組成物は、好ましくは 2 ～ 12、さらに好ましくは 3 ～ 10、さらに好ましくは 4 ～ 8、最も好ましくは 5 ～ 7 の変異体を含む。

本発明は、a) ～ c) の点で特徴付けられる請求項 1 記載の組換えアレルゲンの調製方法も提供する。

a) 天然に存在するアレルゲンにおいて少なくとも 20 % の溶媒接触性を有するアミノ酸の番号を同定すること；

b) 同定されたアミノ酸残基から少なくとも四つを選択することであって、各選択されたアミノ酸は他の選択されたアミノ酸の各々から少なくとも $15 \text{ \AA}$ 隔てられており、面積 $800 \text{ \AA}^2$ の円形表面領域内の少なくとも一つに存在しないように配置されていること；及び

c) 選択されたアミノ酸の各々に対して、前記天然に存在するアレルゲンの結合能力と比べて変異アレルゲンの特異的 I g E 結合能力を減少する第一変異を行うことであって、各第一変異は選択されたアミノ酸残基の別のアミノ酸による置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の目の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列において同じ位置に存在しないこと。

10

20

30

40

50

別の側面において本発明は、対応する天然に存在するアレルゲンをコードするDNAのDNAシャッフリング (shuffling) (分子育種) によって得られたDNA配列からアレルゲンが作製されることによって特徴付けられる、本発明の組換えアレルゲンの調製方法に関する。

さらに、本発明は医薬品として使用するための請求項1の組換えアレルゲンに関する。

また、本発明はアレルギーを予防及び／又は治療するための医薬品を調製するための請求項1の組換えアレルゲンの使用に関する。

さらに、本発明は医薬品として使用するための請求項37の組成物に関する。

また、本発明はアレルギーを予防及び／又は治療するための医薬品を調製するための請求項37の組成物の使用に関する。

さらに、本発明は請求項1の組換えアレルゲン又は請求項37の組成物を含み、これに組合せて医薬的に許容される担体及び／又は賦形剤を含んでもよく、アジュバントを含んでもよいことを特徴とする医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、アレルギーを患う患者において天然に存在するアレルゲンによって誘発されるアレルギー反応に対するワクチンの形態をとり得る。

また、本発明は請求項1の組換えアレルゲン、請求項37の組成物、又は、請求項41-42若しくは46の医薬組成物を対象者に投与することを含む、対象者に免疫応答を発生させる方法に関する。

さらに、本発明は請求項1の組換えアレルゲン、請求項37の組成物、又は、請求項41-42若しくは46の医薬組成物を対象者に投与することを含む、対象者のワクチン接種又は治療に関する。

また、本発明は請求項1の組換えアレルゲン又は請求項37の組成物を医薬的に許容される物質及び／又は賦形剤とともに混合することを含む、請求項41又は42の医薬組成物を調製する方法に関する。

さらに本発明は請求項45の方法によって得ることができる医薬組成物に関する。

また、本発明は請求項1の組換えアレルゲン、請求項37の組成物、又は、請求項41-42若しくは46の医薬組成物を対象者に投与することを含む、患者のアレルギー反応の治療、予防又は軽減のための方法に関する。

さらに本発明は、本発明のアレルゲンをコードするDNA配列、その誘導体、その部分配列、その縮重配列、又は、ストリンジェントな条件下でそれらとハイブリダイズする配列であって、少なくとも一つのB細胞エピトープを有するペプチドをコードする前記誘導体、前記部分的配列、前記縮重配列又は前記ハイブリダイズする配列に関する。

また、本発明は本発明のDNAを含む発現ベクターに関する。

さらに、本発明は本発明の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

加えて、本発明は本発明の宿主細胞を培養する工程を含む組換え変異体アレルゲンを作製する方法に関する。

最後に、本発明は、天然に存在するアレルゲンに特異的なT細胞クローン又はT細胞株を刺激する能力がある少なくとも一つのT細胞エピトープを含む、本発明の組換えアレルゲン又は本発明のDNA配列によってコードされる組換えアレルゲンに関する。本発明の変異体は、T細胞刺激指標の測定による同様な様式／程度でアレルゲン特異的T細胞株を刺激し得るのが好ましい。

【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明の好ましい態様では、第一変異同士が20 Å、好ましくは25 Å、最も好ましくは30 Å隔てられている。

アレルゲンは特異的IgEに対して幾つかの潜在的結合領域を含み、その各領域はおおよそ800 Å²の大きさを有し、その各表面領域は重複エピトープの多数を含むことが信じられている。このように、アレルゲンは800 Å²で分割された表面領域の潜在的な第一変異の幾つかを有する。

好ましくは、本発明の組換えアレルゲンが5～20、好ましくは6～15、さらに好まし

10

20

30

40

50

くは7～12、最も好ましくは8～10の第一変異を含む。

本発明の好ましい態様では、変異を含まない表面領域が $700 \text{ \AA}^2$ 、好ましくは $600 \text{ \AA}^2$ 、さらに好ましくは $500 \text{ \AA}^2$ 、最も好ましくは $400 \text{ \AA}^2$ の面積を有する。

本発明の好ましい態様では、組換えアレルゲンが、前記天然に存在するアレルゲンの結合能力に比べて各々が変異アレルゲンの特異的IgE結合能力を減少する第二変異を幾つか含み、この各第二変異は別の残基による一つの表面露出アミノ酸残基の置換であって前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の種の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列において同じ位置に存在せず、前記円形領域の外側に位置する。

第二変異は第一変異の近くに位置付けることができ、すなわち第二変異は第一変異によって変異された同じエピトープに対する付加的な変異であるだろう。

10

本発明の好ましい態様では、天然に存在するアレルゲンにおいて置換される少なくとも一つの表面露出アミノ酸が約20%、好ましくは約30%、さらに好ましくは約40%、最も好ましくは約50%の溶媒接触性を有する。

本発明の別の好ましい態様では、天然に存在するアレルゲンにおいて置換される少なくとも一つの表面露出アミノ酸が、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質において70%より高く、好ましくは80%より高く、最も好ましくは90%より高い同一性で保存される。

好ましくは、本発明の組換えアレルゲンが本質的に前記天然に存在するアレルゲンと同じ α 炭素骨格三次構造を有する。

変異体及び天然に存在するアレルゲン分子の α 炭素骨格三次構造を比較した場合、原子座標の平均標準偏差が $2 \text{ \AA}$ より小さいのが好ましい。

20

本発明の組換えアレルゲンの好ましい態様では、変異体アレルゲンに組み込まれる各アミノ酸残基は、前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の属、好ましくは亜科、さらに好ましくは科、さらに好ましくは上科、さらに好ましくは亜綱、さらに好ましくは亜目、最も好ましくは目の範囲内にある既知相同タンパク質のアミノ酸配列において同じ位置に存在しない。

本発明の好ましい態様では、本発明の組換え変異体アレルゲンは天然に存在しないアレルゲンである。

変異アレルゲンに対する特異的IgE結合性が、起源特異的IgE反応性アレルギー患者由来の血清又はそのプールを用いた免疫アッセイにおいて、天然に存在するイソアレルゲン又は同様な組換えタンパク質と比較して、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%減少されるのが好ましい。

30

変異体の減少したIgE結合性及び減少した架橋結合媒介能力を評価する別の手段は、変異体のヒスタミン放出(HR)を開始する能力である。ヒスタミンの放出は種々のヒスタミン放出アッセイで測定することができる。変異体の減少したヒスタミン放出は、細胞表面の特異的IgE結合に対する減少した親和性、及び、架橋結合促進の減少した能力に由来する。天然に存在するアレルゲンと比較して本発明の変異体に対し、HRが好ましくは5～100%、さらに好ましくは25～100%、さらに好ましくは50～100%、最も好ましくは75～100%減少される。

一般的に、変異を含まない面積 $800 \text{ \AA}^2$ の円形表面領域は、15～25のアミノ酸残基の原子を含む。

40

本発明の好ましい組換えアレルゲンは、表面露出アミノ酸残基が溶媒接触性に関して順位付けられ、より溶媒接触可能なアミノ酸残基のうち一つ以上のアミノ酸が置換されることに特徴付けられる。

本発明のさらに好ましい組換えアレルゲンは、表面露出アミノ酸残基が前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質における保存の程度に関して順位付けられ、より保存されたアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が置換されることに特徴付けられる。

好ましくは、本発明の組換えアレルゲンは第一変異あたり一つ～四つの第二変異を含む。

本発明の好ましい態様は、一つ以上の置換が部位特異的変異誘発によって行われることに

50

特徴付けられる。

本発明の別の好ましい態様は、一つ以上の置換がランダム変異誘発によって行われることに特徴付けられる。

本発明のさらに好ましい態様は、一つ以上の置換がDNAシャッフリングによって行われることに特徴付けられる。

本発明の組換えアレルゲンは、特に樹木、草本、ハーブ、菌類、イエダニ、ゴキブリ及び動物の毛若しくはフケに由来する吸入アレルゲンの変異体であるのが適切であろう。樹木、草本又はハーブ由来の重要な花粉アレルゲンは、特にカバノキ（ベツラ（*Betula*））、ハンノキ（アルナス（*Alnus*））、ハシバミ（コリルス（*Corylus*））、シデ（カルピナス（*Carpinus*））及びオリーブ（オレア（*Olea*））を含む分類学上ファガレス（*Fagales*）目、オレアレス（*Oleales*）目及びピナレス（*Pinales*）目、特にロリウム（*Lolium*）属、フェレウム（*Phleum*）属、ポア（*Poa*）属、シノドン（*Cynodon*）属、ダクチリス（*Dactylis*）属及びセカレ（*Secale*）属の草本を含むポアレス（*Poales*）目、特にアンブロシア（*Ambrosia*）属及びアルテミシア（*Artemisia*）属のハーブを含むアステラレス（*Asterales*）目及びウルチカレス（*Urticales*）目に由来する。菌類由来の重要な吸入アレルゲンは、特にオルターナリア（*Alternaria*）属及びクラドスポリウム（*Cladosporium*）属に由来する。他の重要な吸入アレルゲンは、デルマトファゴイデス属のイエダニ由来、ゴキブリ由来及びネコ、イヌ及びウマのような哺乳動物由来である。さらに、本発明の組換えアレルゲンはミツバチ（アピダエ（*Apidae*）上科）、ワスプ（ベスピデア（*Vespidae*）上科）及びアリ（フォルミコイダエ（*Formicoidae*）上科）を含む分類学上ヒメノプテラ（*Hymenoptera*）目に由来するような虫が刺すこと又は噛むことに由来するアレルゲンを含む毒物アレルゲンの変異体であり得る。

特異的アレルゲン成分は、例えばファガレス目の *Bet v 1*（*B. verrucosa*）、カバノキ）、*Aln g 1*（アルナス・グルチノサ（*glutinosa*））、ハンノキ）、*Cor a 1*（コリルス・アベラナ（*avelana*））、ハシバミ）及び *Car b 1*（カルピナス・ベツルス（*betulus*））、シデ）を含む。他のものは、*Cry j 1*（ピナレス）、*Amb a 1*及び2、*Art v 1*（アステラレス）、*Par j 1*（ウルチカレス）、*Ole e 1*（オレアレス）、*Ave e 1*、*Cyn d 1*、*Dac g 1*、*Fes p 1*、*Hol l 1*、*Lol p 1*及び5、*Pas n 1*、*Phl p 1*及び5、*Poa p 1*、2及び5、*Sec c 1*及び5、及び *Sor h 1*（種々の草本の花粉）、*Alt a 1*及び *Cla h 1*（菌類）、*Der f 1*及び2、*Der p 1*及び2（イエダニ、それぞれ *D. ファリナエ*及び *D. プテロニスシナス*（*pteronyssinus*））、*Lep d 1*及び2（レピドグリフュス・デストルクター（*Lepidoglyphus destructor*）；倉庫（*storage*）ダニ）、*Bla g 1*及び2、*Per a 1*（ゴキブリ、それぞれブラテルラ・ジャーマニカ（*Blatella germanica*）及びペリプラネタ・アメリカーナ（*Periplaneta americana*））、*Fel d 1*（ネコ）、*Can f 1*（イヌ）、*Equ c 1*、2及び3（ウマ）、*Apis m 1*及び2（ミツバチ）、*Ves v 1*、2及び5、*Pol a 1*、2及び5（全スズメバチ）及び *Sol i 1*、2、3及び4（ハリアリ）である。

一つの態様では、組換えアレルゲンは *Bet v 1* の変異体である。置換に対して潜在的に適切なアミノ酸は、アミノ酸 *V 2*、*D 7 2*、*E 8 7*、*K-1 2 9*、*E-6 0*、*N-4 7*、*K-6 5*、*P-1 0 8*、*N-1 5 9*、*D-9 3*、*K-1 2 3*、*K-3 2*、*D-1 2 5*、*R-1 4 5*、*D-1 0 9*、*E-1 2 7*、*Q-3 6*、*E-1 3 1*、*L-1 5 2*、*E-6*、*E-9 6*、*D-1 5 6*、*P-6 3*、*H-7 6*、*E-8*、*K-1 3 4*、*E-4 5*、*T-1 0*、*V-1 2*、*K-2 0*、*S-1 5 5*、*H-1 2 6*、*P-5 0*、*N-7 8*、*K-1 1 9*、*V-2*、*L-2 4*、*E-4 2*、*N-4*、*A-1 5 3*、*I-4 4*、*E-1 3 8*、*G-6 1*、*A-1 3 0*、*R-7 0*、*N-2 8*、

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及びE-73を含む。一つ以上の第一置換及び第二置換は、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及び+160Nからなる群より選択され得る（+は付加的なアミノ酸が含まれることを意味する）。
本発明によるBet v 1変異体の例は以下である（用いられている括弧は第一及び第二変異を示す）： 10

変異体A：

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

変異体B：

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

変異体2595（実施例2）：

N28T, K32Q, E45S, P108G

変異体2628（実施例4）：

Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu 20

変異体2637（実施例4）：

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

変異体2724：

N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H, +160N

変異体2733（実施例4）：

(Tyr5Val, Lys134Glu), (Asn28Thr, Lys32Gln), Glu45Ser, Lys65Asn, (Asn78Lys, Lys103Val), Lys97Ser, Pro108Gly, Arg145Glu, (Asp156His, +160Asn) 30

変異体2744：

(Tyr5Val, Lys134Glu), (Glu42Ser, Glu45Ser), (Asn78Lys, Lys103Val), Lys123Ile, (Asp156His, +160Asn)

変異体2753（実施例4）：

(Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, (Glu96Leu, Lys97Ser), (Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser), Arg145Glu 40

変異体2744+2595：

Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N

変異体2744+2628：

Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, K123I, K134E, D156H, +160N

変異体2744+2595+2628：

Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N, N78K, K9 50

7 S, K 1 0 3 V, P 1 0 8 G, K 1 2 3 I, K 1 3 4 E, D 1 5 6 H, + 1 6 0 N

さらに、上記変異体の全ては以下の置換を一つ以上含む：V 2 F, V 2 L, V 2 I, V 2 M, T 1 0 A, K 2 0 N, Q 3 6 A又はQ 3 6 K, D 7 2 H, D 7 2 Q, D 7 2 N, E 8 7 G, K 1 2 9 N及びS 1 4 9 R又はS 1 4 9 T。

別の態様では、組換えアレルゲンは分類学上ベスピダエ目、アピダエ目及びフォルミコイダエ目由来の毒物アレルゲンに由来する。

さらなる態様では、組換えアレルゲンはV e s v 5に由来する。置換に対して潜在的に適切なアミノ酸は、アミノ酸K-1 6, K-1 8 5, K-1 1, K-4 4, K-2 1 0, R-6 3, K-1 3, F-6, K-1 4 9, K-1 2 8, E-1 8 4, K-1 1 2, F-1 5 7, E-3, K-2 9, N-2 0 3, N-3 4, K-7 8, K-1 5 1, L-1 5, L-1 5 8, Y-1 0 2, W-1 8 6, K-1 3 4, D-8 7, K-5 2, T-6 7, T-1 2 5, K-1 5 0, Y-4 0, Q-4 8, L-6 5, K-8 1, Q-1 0 1, Q-2 0 8, K-1 4 4, N-8, N-7 0, H-1 0 4, Q-4 5, K-1 3 7, K-1 5 9, E-2 0 5, N-8 2, A-1 1 1, D-1 3 1, K-2 4, V-3 6, N-7, M-1 3 8, T-2 0 9, V-8 4, K-1 7 2, V-1 9, D-5 6, P-7 3, G-3 3, T-1 0 6, N-1 7 0, L-2 8, T-4 3, Q-1 1 4, C-1 0, K-6 0, N-3 1, K-4 7, E-5, D-1 4 5, V-3 8, A-1 2 7, D-1 5 6, E-2 0 4, P-7 1, G-2 6, Y-1 2 9, D-1 4 1, F-2 0 1, R-6 8, N-2 0 0, D-4 9, S-1 5 3, K-3 5, S-3 9, Y-2 5, V-3 7, G-1 8, W-8 5及びI-1 8 2を含む。一つ以上の第一置換及び第二置換は、K 2 9 A, T 6 7 A, K 7 8 A, V 8 4 S, Y 1 0 2 A, K 1 1 2 S, K 1 4 4 A, K 2 0 2 M及びN 2 0 3 Gからなる群より選択され得る。

さらなる態様では、組換えアレルゲンはD e r p 2に由来する。置換に対して潜在的に適切なアミノ酸は、アミノ酸R-1 2 8, D-1 2 9, H-1 1, H-3 0, S-1, K-7 7, Y-7 5, R-3 1, K-8 2, K-6, K-9 6, K-4 8, K-5 5, K-8 9, Q-8 5, W-9 2, I-9 7, H-2 2, V-6 5, S-2 4, H-7 4, K-1 2 6, L-6 1, P-2 6, N-9 3, D-6 4, I-2 8, K-1 4, K-1 0 0, E-6 2, I-1 2 7, E-1 0 2, E-2 5, P-6 6, L-1 7, G-6 0, P-9 5, E-5 3, V-8 1, K-5 1, N-1 0 3, Q-2, N-4 6, E-4 2, T-9 1, D-8 7, N-1 0, M-1 1 1, C-8, H-1 2 4, I-6 8, P-7 9, K-1 0 9及びR-1 2 8, D-1 2 9, H-1 1, H-3 0, S-1, K-7 7, Y-7 5, R-3 1, K-8 2, K-6, K-9 6, K-4 8, K-5 5, K-8 9, Q-8 5, W-9 2, I-9 7, H-2 2, V-6 5, S-2 4, H-7 4, K-1 2 6, L-6 1, P-2 6, N-9 3, D-6 4, I-2 8, K-1 4, K-1 0 0, E-6 2, I-1 2 7, E-1 0 2, E-2 5, P-6 6, L-1 7, G-6 0, P-9 5, E-5 3, V-8 1, K-5 1, N-1 0 3, Q-2, N-4 6, E-4 2, T-9 1, D-8 7, N-1 0, M-1 1 1, C-8, H-1 2 4, I-6 8, P-7 9, K-1 0 9, K-1 5を含む。一つ以上の第一置換及び第二置換は、K 6 A, N 1 0 S, K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 N, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N及びR 1 2 8 Qからなる群より選択され得る。

本発明によるB e t v 1変異体の例は、以下である。

変異体A：

K 6 A, K 1 5 E, H 3 0 N, E 6 2 S

変異体B：

K 6 A, K 1 5 E, H 3 0 N, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N

変異体C：

K 6 A, N 1 0 S, K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 N, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N 及び R 1 2 8 Q

【0010】

ワクチン

ワクチンの調製は、この技術分野において一般的によく知られている。ワクチンは通常、溶液又は懸濁液いずれかのように注射可能物質として調製される。前記ワクチンは、経鼻投与及び、口内及び舌下を含む経口投与を可能にするため、乳化又は調合されることもある。問題とする免疫成分（本明細書に定義する組換えアレルゲン）は、適切には医薬的に許容される賦形剤と混合され得、さらに活性成分と互換性がある。適切な賦形剤の例は、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノール等及びこれらの組合せである。ワクチンは付加的に、湿潤剤、乳化剤、緩衝化剤又はワクチンの効果を増強するアジュバントのような他の物質を含み得る。

10

ワクチンは皮下又は筋肉内注射によって、最も頻繁に投与される。他の経路による投与に対して適切な製剤は、経口製剤及び坐剤を含む。経口投与のためのワクチンは、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常前記製剤に使用される賦形剤と適切に調合され得る。組成物は溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、エアロゾル、粉末又は顆粒として調合されることが可能である。

ワクチンは、治療上効果的かつ免疫原性のある量を適合する投薬製剤形態の方法で投与される。ワクチンに含まれる活性成分の量は、治療される対象者、特に治療に対して対象者の免疫系が応答する能力、投与経路、及び、対象者の年齢若しくは体重に依存する。適切な処方量の範囲は、約 0.0001 µg ~ 1000 µg の範囲内で変えることができる。

20

既に述べたように、製剤にアジュバントを加えることにより増加した効果が得られ得る。このようなアジュバントの具体例は、リン酸緩衝生理食塩水の水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウム（アルム）又はリン酸カルシウムの 0.05 ~ 0.1 % 溶液、糖又はポリラクチドグリコリド（PLG）の合成ポリマーの 0.25 % 溶液である。C. パルブム（parvum）のような細菌細胞、グラム陰性菌のエンドトキシン又はリポ多糖成分の混合物、マンニド（mannide）モノアセテート（アラセル A）のような生理的に許容されるオイルビヒクルのエマルジョン、又は、遮断物質として用いられるペルフルオロカーボン（例えば Fluosol-D A）の 20 % 溶液のエマルジョンも使用され得る。MF-59 のようなオイルエマルジョンも用いられ得る。完全及び不完全フロイントアジュバントのような他のアジュバント、Quil A、Qs-21 及び ISCOM のようなサポニン、及び RIBI も用いられ得る。

30

ほとんどの場合、効果を確実にするためワクチンの複数回投与が必要である。多くの場合、ワクチンは最初の投与とそれに続く接種又は他の投与によって投与される。ワクチン接種の回数は 1 ~ 50 の範囲内が典型であり、通常は 35 回のワクチン接種を超えない。ワクチン接種は普通、3 ヶ月 ~ 5 年の期間に週 2 回 ~ 隔月で行われる。これは所望する予防的又は治療的效果レベルを与えるために企図される。

組換えアレルゲンは医薬製剤として用いられてもよく、症状が起こる（予防）期間中にアレルギー応答に対してある種の防御を提供することに適する。通常、防御効果を維持するためこの処置を毎年繰り返さなければならないであろう。経鼻、経口及び舌下の適用に対して調合された製剤は、この目的に特に適する。

40

【0011】

本研究の組換えアレルゲンを調製する方法

既に述べたように、本発明は本発明の組換え変異体アレルゲンを調製する方法にも関する（請求項 48 を参照）。

本発明によると置換に適する表面露出アミノ酸は、表面露出の程度を表す溶媒（水）接触性の情報に基づいて同定され得る。本発明の方法の好ましい態様は、前記同定されたアミノ酸残基を溶媒接触性に関して順位付けすること、及び、より溶媒に接触可能なアミノ酸

50

のうち一つ以上のアミノ酸を置換することによって特徴付けられる。

本発明において置換に適する表面露出アミノ酸の同定に貢献し得る第二パラメーターは、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質においてアミノ酸が保存される程度である。あるいは、前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の属、亜科、科、上科、亜綱、亜目又は目の範囲内にある全既知相同タンパク質における程度が、前記第二パラメーターとして用いられる。

従って、本発明の方法の好ましい態様は、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質において70%より高く、好ましくは80%より高く、最も好ましくは90%より高い同一性が保存される同定されたアミノ酸残基を選択することに特徴付けられる。

10

さらに、本発明の方法の特に好ましい態様は、前記天然に存在するアレルゲンが由来する種の範囲内にある全既知相同タンパク質における保存の程度に関して前記同定されたアミノ酸残基を順位付けすること、及び、より保存されたアミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸を置換することに特徴付けられる。

本発明の方法のさらなる好ましい態様は、前記天然に存在するアレルゲンと本質的に同じ α 炭素骨格三次構造を有する変異体アレルゲンを形成するように、同定されたアミノ酸を選択することを含む。

本発明の方法のもう一つの好ましい態様は、アミノ酸残基の置換が部位特異的変異誘発によって行われることに特徴付けられる。

本発明の方法の別の好ましい態様は、アミノ酸残基の置換がDNAシャッフリングによって行われることに特徴付けられる。

20

【0012】

置換に対する基準

三次構造が決定されている（例えば、X線結晶解析又はNMR電子顕微鏡によって）分子に対して、置換されたアミノ酸を持つ変異体は、好ましくは次の基準を満たすべきである：

1. 分子の全体的な α 炭素骨格三次構造が保存されているのが好ましい。保存とは、構造を比較して原子座標の平均標準偏差が2 Åより少ないこととして定義される。これは二つの理由のため重要である：a) 天然アレルゲンの全体表面は潜在的抗体結合エピトープの重複連続体を構成することが予測される。分子表面の大部分はこの置換によって影響されずその抗体結合誘導特性を維持し、このことは天然のアレルゲン上にも存在するエピトープに向けられる新しい防御抗体特異性の発生に重要である。b) 保存期間及び体液へ注入する際の両方に関係する安定性。

30

2. 置換されるアミノ酸は表面に位置し、それにより抗体結合に対して接触可能であるのが好ましい。三次元構造において表面に位置するアミノ酸は通常少なくとも20%、適切には20~80%、さらに適切には30~80%の溶媒（水）接触性を有する。溶媒接触性は、溶媒分子に匹敵する半径（水、 $r = 1.4 \text{ \AA}$ ）の球に対して接触可能な分子の面積として定義される。

3. 置換されたアミノ酸の各々は、好ましくは $400 \text{ \AA}^2$ より大きい面積を有する保存されたパッチに位置する。保存されたパッチは、表面露出保存アミノ酸残基及び骨格の密着して連結した面積として定義される。保存アミノ酸残基は、分類学上の同じ種、属、亜科、科、上科、亜綱、亜目又は目の範囲内にある相同タンパク質の全既知（導き出された）アミノ酸配列の配列アラインメントによって定義される。配列の70%より高く同一なアミノ酸残基を有するアミノ酸配置を、保存されたとみなす。保存されたパッチは、患者の大部分のIgEが対象とするエピトープを含むと予想される。

40

α 炭素骨格三次構造の保存は、変異誘発前及び変異誘発後のX線結晶解析又はNMRにより同一構造が得られることによって決定されるのが最もよい。変異体を表す構造的データが無い場合、構造的に決定された分子の解析によって得られるデータと比較してみて、区別できないCDスペクトル又は例えば抗体反応性といった免疫学的データが α 炭素骨格三次構造の保存を与え得る。

50

4. 保存されたパッチ中にある変異誘発のためのアミノ酸は、好ましくは保存されたパッチの中心近くに位置する最も溶媒（水）接触可能なアミノ酸の中から優先的に選択されるべきである。

5. 極性アミノ酸残基が他の極性残基によって優先的に置換され、非極性アミノ酸残基は他の非極性アミノ酸残基によって置換される。

アレルゲンの三次元構造を本質的に維持する目的で組み込まれるアミノ酸は、アレルゲンと構造的相同体であって例えばアレルゲンと分類学上同じ目に属しアレルゲンとどんな交差反応性も持たないタンパク質、との比較に基づいて選択され得る。

【0013】

本発明のDNA

10

好ましい態様では、本発明のDNA配列が天然に存在するアレルゲンをコードするDNA配列の誘導体である。

好ましくは、DNA誘導体が天然に存在するアレルゲンをコードするDNAの部位特異的変異誘発又はランダム変異誘発によって得られる。

特に好ましい第一態様では、DNA配列が図3に示す配列の誘導体である。図3に示すDNA配列は、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からなる群より選択される少なくとも四つの変異を有するアレルゲンをコードするように変異する。

20

特に好ましい第二態様では、DNA配列が図13に示す配列の誘導体である。この図13に示すDNA配列は、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及びI-182からなる群より選択される少なくとも四つの変異を有するアレルゲンをコードするように変異する。

30

40

特に好ましい第三態様では、DNA配列が図16に示す配列の誘導体である。この図16に示すDNA配列は、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及びR-128, D-

50

1 2 9, H-1 1, H-3 0, S-1, K-7 7, Y-7 5, R-3 1, K-8 2, K-6, K-9 6, K-4 8, K-5 5, K-8 9, Q-8 5, W-9 2, I-9 7, H-2 2, V-6 5, S-2 4, H-7 4, K-1 2 6, L-6 1, P-2 6, N-9 3, D-6 4, I-2 8, K-1 4, K-1 0 0, E-6 2, I-1 2 7, E-1 0 2, E-2 5, P-6 6, L-1 7, G-6 0, P-9 5, E-5 3, V-8 1, K-5 1, N-1 0 3, Q-2, N-4 6, E-4 2, T-9 1, D-8 7, N-1 0, M-1 1 1, C-8, H-1 2 4, I-6 8, P-7 9, K-1 0 9, K-1 5からなる群より選択される少なくとも四つの変異を有するアレルゲンをコードするように変異する。

【0014】

10

DNAシャッフリング

本発明の組換え変異体アレルゲンは、対応する天然DNAのDNAシャッフリング（分子育種）によって得られたDNA配列を用いて作製され得る。DNAシャッフリングはPunnonen等による論文（参考文献25）で開示される手順及び前記論文で言及された論文で開示される手順に従って行われ得る。これら前記論文は全て、この参照により本明細書中に含まれるものとする。

診断的アッセイ

さらに、本発明の組換え変異体アレルゲンは診断的な可能性及び利点を有する。先行技術のアレルギーワクチンは天然に存在するアレルゲン原料の抽出物に基づいており、そのため多種多様なイソフォームを表す。アレルギー性の個体は最初に感作されて、一つ又は複数の存在するイソフォームに対するIgEを持つ。イソフォームの幾つかは、相同性及び続いて起こるアレルギー性の個体に対するイソフォームとの交差反応のため、アレルギー性の個体のアレルギー反応について関係し得る。一方他のイソフォームは、アレルギー性の個体が有する特異的IgEに対するいかなるIgE結合エピトープも保持しないため、無関係であり得る。このIgE集団の特異性の不均一性によって、幾つかのイソフォームは結果的に投与が安全であり得、すなわちこれらはIgEを介してアレルギー応答を起こす結果とならず、一方他のイソフォームは望ましくない副作用を引き起こし有害であり得る。

20

このように、治療的に投与されることを意図する本発明の変異体及び組成物は、前記変異体又は組成物を用いる治療の妥当性、安全性又は成果をモニターするin vivo又はin vitroでの診断的アッセイにも用いられ得る。適用される診断サンプルは、血清のような身体サンプルを含む。

30

このように本発明は、本発明による組換え変異体アレルゲン又は組成物を用いる対象者の治療の妥当性、安全性又は成果を評価する診断的アッセイにも関する。対象者のIgEを含むサンプルが前記変異体又は前記組成物と混合され、サンプル中IgEの前記変異体間の反応性レベルを評価される。サンプル中のIgEと前記変異体間の反応性レベルの評価は、既知の免疫アッセイを用いて行われ得る。

【0015】

定義

本発明に関して「前記天然に存在するアレルゲンのIgE結合能力と比較して特異的IgE結合能力を減少する」という表現は、天然に存在するアレルゲンに対してアレルギー性の対象者に由来する血清を用いる少なくとも一つの免疫アッセイにおいて、減少が統計的に有意な様式で（ $P < 0.05$ ）測定可能であることを意味する。好ましくはIgE結合能力が少なくとも5%、さらに好ましくは少なくとも10%減少される。

40

「表面露出アミノ酸」という表現は、アレルゲンが溶液中に存在する場合にアミノ酸残基の少なくとも一原子の少なくとも一部分が周囲の溶媒と接触可能であるように、アミノ酸残基が三次元構造の表面に位置することを意味する。好ましくは、三次元構造中のアミノ酸酸基が少なくとも20%、適切には少なくとも30%、さらに適切には少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%の溶媒（水）接触性を有する。

「溶媒接触性」という表現は、溶媒分子に匹敵する半径（水、 $r = 1.4 \text{ \AA}$ ）を有する球

50

に接触し得る分子の面積として定義される。

「表面露出」及び「溶媒露出」という表現は互換的に用いられる。

「前記天然に存在するアレルゲンが由来する分類学上の種」という表現は、分類学上の系統における種を意味する。

さらに「前記天然に存在するアレルゲンと本質的に同じ α 炭素骨格三次構造を有する前記変異体アレルゲン」という表現は、構造を比較する場合に原子座標の平均標準偏差が2 Åより小さいことを意味する。

本発明に関して「置換」という表現は、天然に存在するアレルゲンのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の欠失、置換又は付加を意味する。

本発明は以下の非限定的な実施例によって、さらに説明される。

10

【0016】

(実施例)

実施例1

実施例1は、一つ及び三つの第一変異を有する組換え変異体アレルゲンの調製を記述する。本発明の組換え変異体アレルゲン、すなわち少なくとも四つの第一変異を含むアレルゲンは、同じ手順を用いて調製され得る。

ファガレス花粉アレルゲンに含まれる共通エピトープの同定

主要なカバノキ花粉アレルゲンBet v 1は、分類学上の近縁な樹木すなわちファガレス（例えばハシバミ及びシデ）の花粉に由来する主要なアレルゲンと約90%のアミノ酸配列同一性を示し、カバノキ花粉アレルギー患者は多くの場合これらBet v 1相同タンパク質に対してアレルギー交差反応性の臨床症状を示す。

20

Bet v 1は、ある種の果物（例えばリンゴ及びサクランボ）及び野菜（例えばセロリ及びニンジン）に存在するアレルギー性タンパク質とも約50～60%の配列同一性を示し、Bet v 1及びこれら食物関連タンパク質間のアレルギー性交差反応性に対する臨床的証拠が存在する。

加えてBet v 1は病原関連タンパク質（PR-10）と呼ばれる植物タンパク質群と有意な配列同一性（20～40%）を共有するが、しかしながら、これらPR-10タンパク質に対するアレルギー性交差反応性の報告は存在しない。

分子モデリングは、ファガレス及び食物アレルゲン及びPR-10タンパク質の構造がBet v 1の構造とほぼ同一であることを示唆する。

30

アレルギー性Bet v 1交差反応性の構造的根拠は（Gajhede et al 1996, 参考文献17）で報告されており、Bet v 1分子表面上の三つのパッチが既知の主要な樹木花粉アレルゲンに対して共通であることが確認できた。このように、Bet v 1上のこれらパッチを認識するどのIgEも他のファガレス主要花粉アレルゲンに対し交差反応及び結合することが可能であり、アレルギー症状を生じさせ得る。主要な樹木花粉アレルゲンの全既知アミノ酸配列アラインメント後に、参考文献17に報告された α 炭素骨格三次構造により明らかにされたBet v 1分子表面の解析と組合せて、これらの共通パッチの同定を行った。加えてパッチは、結合している抗体によって覆われた面積に基づいて一定の最小サイズ（400 Å²より大きい）を有することが明らかにされた。

40

【0017】

部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基の選択

部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基は、その改変が臨床樹木花粉アレルギー性交差反応性を示している患者の大部分に由来する血清IgEの結合性に影響することが予想されるので、Bet v 1特異的領域及び共通パッチに存在する残基の中から選択した。

それぞれのパッチ内にある各アミノ酸残基の相対方向及び溶媒露出のパーセンテージを、それらの原子座標に基づいて計算した。低度の溶媒露出（20%より少ない）を有する残基は、構造を破壊する可能性又は抗体相互作用を失う可能性があるために、変異に対して適切であるとみなさなかった。残りの残基を、溶媒露出の程度に従って順位付けした。

配列アラインメント

問い合わせ配列（Bet v 1ナンバー2801、WHO IUISアレルゲン学名小委

50

員会) に対する配列相同性は、BLAST 検索 (Altschul et al., 参考文献 18) によって GenBank 及び EMBL 配列データベースから得た。BLAST が 0.1 より少ない確率を報告した全配列を考慮し、相同配列の非重複性一覧表を含む一つの一覧表を構成した。これらを CLUSTAL W (Higgins et al., 参考文献 19) によって整列させ、完全な一覧表又は分類学上の近縁種のみを考慮した配列における各位置に対し同一性のパーセンテージを計算した。全部で 122 の配列が Bet v 1 ナンバー 2801 に対して相同で、そのうちの 57 配列が分類学上の近縁種に由来していた。

Bet v 1 をコードする遺伝子のクローニング

フェノール抽出及び LiCl 沈殿によって、ベツラ・ベルルコサの花粉 (Allergon、スウェーデン) から RNA を調製した。オリゴ (dT) - セルロースアフィニティークロマトグラフィーをエッペンドルフチューブ中でバッチ式に行い、商業的に入手可能なキット (Amersham) を用いて二重鎖 cDNA を合成した。Bet v 1 をコードする DNA を PCR により増幅し、クローニングを行った。簡単に言うと、鋳型としての cDNA、及び Bet v 1 のアミノ末端及び 3' 非翻訳領域に対応する位置の cDNA 配列に適合するようにそれぞれ設計したプライマーを用いて PCR を行った。前記プライマーは pKK233-2 への方向性を有するクローニングのため制限酵素部位 (NcoI 及び HindIII) を提供するように 5' 末端を延長した。

【0018】

pMAL-c へのサブクローニング

続いて Bet v 1 をコードする遺伝子を、マルトース結合タンパク質融合ベクター pMAL-c (New England Biolabs) にサブクローニングした。参考文献 15 に記述されるように、この遺伝子を PCR によって増幅し malE とイン・フレームにサブクローニングして MBP 及び Bet v 1 が切断時に Bet v 1 真正アミノ末端配列を回復するように配置した因子 Xa プロテアーゼ切断部位によって隔てられたマルトース結合タンパク質 (MBP) - Bet v 1 タンパク質融合オペロンを生成した。簡単に言うと、鋳型として Bet v 1 を挿入した pKK233-3、及び、このタンパク質のアミノ及びカルボキシ末端にそれぞれ対応するプライマーを用いて PCR を行った。プロモーターに近いプライマーは、イン・フレームの Xa 因子プロテアーゼ切断部位をコードする四つのコドンを提供するように 5' 末端を延長した。両プライマーは、クローニングのための制限酵素部位 (KpnI) を提供するように 5' 末端をさらに延長した。Bet v 1 をコードする遺伝子を、PCR アーチファクトの頻度を減少するため 20 サイクルの PCR を用いてサブクローニングした。

In vitro の変異誘発

Bet v 1 を挿入した組換え pMAL-c を鋳型として用いた PCR によって、In vitro の変異誘発を行った。各変異体 Bet v 1 遺伝子を、四つのプライマーを用いる三つの PCR 反応によって生成させた。二つの変異特異的オリゴヌクレオチドプライマーを、各 DNA 鎖に対し一つ、各変異を提供するように合成した (図 1 及び 2 を参照)。変異ヌクレオチドを起点として用い、両プライマーを 5' 末端で 7 ヌクレオチド、3' 末端で 15 ヌクレオチドを延長した。延長ヌクレオチドは実際領域の Bet v 1 遺伝子と同一であった。

さらに二つの一般的に適用可能なプライマー (図 2 で「全センス」及び「全非センス」と表示) を合成し、全変異体に対して用いた。これらのプライマーは長さが 15 ヌクレオチドであり、pMAL-c ベクターの Bet v 1 からおよそ 1 キロベース上流及び下流の領域に対応する配列であった。上流プライマーの配列はセンス鎖に由来し、下流プライマーの配列は非センス鎖に由来する (図 2 を参照)。

【0019】

PCR アーチファクトの頻度を減らすために 20 回しか温度サイクルを行わなかったことを除き、本質的には標準的手順 (Sakai et al 1988, 参考文献 20) に従って二つの独立な PCR 反応を行った。各 PCR 反応は、鋳型として Bet v 1 を挿入

した pMAL-c、及び、一つの変異特異的プライマー及び一つの一般的に適用可能なプライマーの意味の有る組合せを用いた。

三重パッチ変異体における四つのアミノ酸置換 (Asn 28 Thr、Lys 32 Gln、Glu 45 Ser、Pro 108 Gly) の導入は、上述したように段階的処理で行った。鑄型として Bet v 1 ナンバー 2801、Bet v 1 (Glu 45 Ser)、Bet v 1 (Glu 45 Ser、Pro 108 Gly) をそれぞれ挿入した pMAL-c を用いて、最初に Glu 45 Ser 変異、次に Pro 108 Gly 変異、最後に Asn 28 Thr、Lys 32 Gln 変異を導入した。

この PCR 産物を、アガロースゲル電気泳動及び電気溶出に続くエタノール沈殿によって精製した。第三 PCR 反応は、鑄型として二つの第一 PCR 反応による PCR 産物の組合せ、及び、一般的に適用可能な両プライマーを用いて行った。再度、20 サイクルの標準的 PCR を用いた。この PCR 産物を、アガロースゲル電気泳動及び電気溶出に続くエタノール沈殿によって精製し、制限酵素 (BsiWI/EcoRI) で切断し、同じ制限酵素で切断した Bet v 1 挿入 pMAL-c へ方向性を持たせてライゲーションさせた。

図 3 は、以下の全 9 つの Bet v 1 変異体の概観を示す。

Thr 10 Pro, Asp 25 Gly, Asn 28 Thr + Lys 32 Gln, Glu 45 Ser, Asn 47 Ser, Lys 55 Asn, Glu 60 Ser (非パッチ), Thr 77 Ala 及び Pro 108 Gly。四つの変異を有する付加変異体も作製した (Asn 28 Thr, Lys 32 Gln, Glu 45 Ser, Pro 108 Gly)。これらから、さらなる試験のために五つの変異体を選択した: Asn 28 Thr + Lys 32 Gln, Glu 45 Ser, Glu 60 Ser, Pro 108 Gly 及び三重パッチ変異体 Asn 28 Thr, Lys 32 Gln, Glu 45 Ser, Pro 108 Gly。

【0020】

ヌクレオチドのシーケンシング

サブクローニングの前と後、及び in vitro の変異誘発後にそれぞれ、Bet v 1 をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の決定を行った。

アンピシリン 0.1 g/l を補充した LB 培地中で一晩飽和状態まで増殖させた細菌培養液 10 ml から、プラスミド DNA を Qiagen-tip 20 カラムで精製し、シーケンエース (Sequenase) バージョン 2.0 DNA シーケンシングキット (USB) を用い、供給元の推奨に従ってシーケンシングを行った。

組換え Bet v 1 及びその変異体の発現及び精製

参考文献 15 に記述されるように、マルトース結合タンパク質と融合した組換え Bet v 1 (Bet v 1 ナンバー 2801 及び変異体) を大腸菌 DH5a で過剰発現させ、精製した。簡単に言うと、組換え E. coli 細胞を 436 nm での光学密度 1.0 まで 37 °C で増殖させてから、IPTG の添加によって Bet v 1 融合タンパク質の発現を誘導した。細胞を 3 時間誘導した後、遠心分離によって収穫し、溶菌緩衝液に再懸濁し、超音波処理によって破碎した。超音波処理後さらなる遠心分離を行い、アミロースアフィニティークロマトグラフィーによって組換え融合タンパク質を単離し、続けて Xa 因子とインキュベーションすることによって切断した (参考文献 15)。第 Xa 因子切断後、組換え Bet v 1 をゲル濾過によって単離した。必要があれば、微量のマルトース結合タンパク質を除去するために、さらにもう一回アミロースアフィニティークロマトグラフィーを行った。

精製組換え Bet v 1 を限外濾過によって約 5 mg/ml まで濃縮し、4 °C で保存した。精製組換え Bet v 1 調製品の最終的な収率は、E. coli 細胞培養液 1 リットルあたり 2 ~ 5 mg であった。

精製組換え Bet v 1 調製品は、銀染色 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後に見かけ上の分子量 17.5 kDa の単一なバンドとして現れた。N 末端シーケンシングは、cDNA ヌクレオチド配列由来の期待される配列を示し、定量アミノ酸分析は予想されるアミノ酸構成成分を示した。

10

20

30

40

50

我々は既に、組換えBet v 1ナンバー2801が天然に存在するBet v 1と免疫化学的に区別がつかないことを示している（参考文献15）。

【0021】

ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫電気泳動

Bet v 1の七つの変異体を組換えBet v 1タンパク質として作製し、上述のように精製し、カバノキ花粉から単離したBet v 1に対して産生されたポリクローナルウサギ抗体に対する反応性を試験した。未変性状態で免疫電気泳動（ロケットライン免疫電気泳動）によって分析した場合ウサギ抗体は全変異体を沈殿させることができ、このことは変異体が保存された α 炭素骨格三次構造を有することを示している。

ヒトポリクローナルIgE応答への効果を分析する目的で、変異体Glu45Ser、Pro108Gly、Asn28Thr+Lys32Gln及びGlu60Serをさらなる分析のために選択した。

Bet v 1 Glu45Ser変異体

位置45のグルタミン酸は高度の溶媒露出（40%）を示し、ファガレスアレルゲンに共通な分子表面パッチ（パッチI）に位置する。Bet v 1相同PR-10タンパク質の幾つかにおいて位置45を占めるセリン残基が見出され、グルタミン酸が α 炭素骨格三次構造の歪み無しにセリンで置き換えられることが可能であることを支持している。加えて、どの既知ファガレスアレルゲン配列も位置45にセリンを有していないことから、セリンによるグルタミン酸の置換が天然に存在しないBet v 1分子を生ずる。

組換えGlu45Ser Bet v 1変異体を用いたT細胞増殖アッセイ

この分析は、Spangfort等の1996aに記述されたように行った。組換えBet v 1 Glu45Ser変異体は、三つの異なるカバノキアレルギー患者由来のT細胞株において、組換え体及び天然に存在するアレルゲンと同様な刺激指数で増殖を誘導することが可能であったことが見出された。

【0022】

組換えGlu45Ser Bet v 1の結晶化及び構造決定

組換えGlu45Ser Bet v 1の結晶を、本質的には（Spangfort et al 1996b、参考文献21）に記述されたように、25℃の蒸発拡散によって成長させた。濃度5 mg/mlのGlu45Ser Bet v 1を等体積の2.0 M硫酸アンモニウム、0.1 Mクエン酸ナトリウム、1%（v/v）ジオキサン、pH 6.0と混合し、100倍の体積の2.0 M硫酸アンモニウム、0.1 Mクエン酸ナトリウム、1%（v/v）ジオキサン、pH 6.0に対して平衡化した。24時間の平衡化の後、組換え野生型Bet v 1の結晶を種のもととして用い参考文献21に記述される播種技術を応用することによって、結晶の成長を誘導した。

約2ヶ月後に結晶を収穫し、参考文献21に記述されるようにRigaku回転アノードから発生させたX線を用いて解析し、分子置換を用いて構造を明らかにした。

Bet v 1 Glu45Ser変異体の構造

回転アノードから発生させたX線によって三次元のBet v 1 Glu45Serタンパク質結晶回析を解像度3.0 Åまで上げて解析し、変異誘発の構造的効果に取り組んだ。位置45におけるセリンによるグルタミン酸の置換がBet v 1 Glu45Ser構造電子密度マップによって検証され、全体的な α 炭素骨格三次構造が保存されていることも示された。

【0023】

Bet v 1 Glu45Ser変異体のIgE結合特性

カバノキアレルギー患者由来の血清IgEのプールを用いた流動相IgE阻害アッセイによって、Bet v 1 Glu45Ser変異体のIgE結合特性を組換えBet v 1と比較した。

組換えBet v 1ナンバー2801を、1:5（Bet v 1ナンバー2801：ビオチン）のモル分率でビオチン化した。阻害アッセイは次のように行った：血清サンプル（25 μ l）を抗IgE固体相とインキュベートし、洗滌し、ビオチン化Bet v 1ナ

ンバー 2801 (3.4 nM) 及び得られた変異体 (0~28.6 nM) の混合物に再懸濁してさらにインキュベートし、固体相に結合したビオチン化 Bet v 1 ナンバー 2801 の量をアクリジニウムエステル標識ストレプトアビジンとインキュベーションした後に測定した RLU から推定した。緩衝液及び阻害剤として変異体を用いて得られた RLU の間の比として、阻害の程度を計算した。

図 4 は、非ビオチン化 Bet v 1、Bet v 1 Glu45Ser 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 IgE に対するビオチン化組換え Bet v 1 の結合の阻害を示す。

血清プール中に存在する血清 IgE に対する結合の 50% 阻害を達成するために必要な各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換え Bet v 1 は約 6.5 ng で 50% 阻害を達成する一方、Bet v 1 Glu45Ser 変異体の対応する濃度は約 12 ng である。このことは、Bet v 1 Glu45Ser 変異体に導入された点変異が特異的血清 IgE に対する親和性を約 1/2 に低下させることを示す。Bet v 1 Glu45Ser 変異体によって達成された阻害の最大値は、組換え Bet v 1 と比べて明らかに低くなる。このことは、Glu45Ser 置換すると血清プール中に存在する特異的 IgE の幾らかは Bet v 1 Glu45Ser 変異体を認識できないことを示し得る。

【0024】

Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln

位置 28 及び 32 のアスパラギン及びリジンはそれぞれ、高度の溶媒露出 (それぞれ、35% 及び 50%) を示し、ファガレスアレルギーに共通の分子表面パッチ (パッチ II) に位置する。構造上、アスパラギン 28 及びリジン 32 は分子表面上で互いに近接して位置し、水素結合を介して相互作用する可能性が高い。Bet v 1 相同 PR-10 タンパク質の幾つかにおいてスレオニン及びグルタミン残基がそれぞれ位置 28 及び 32 を占めるのが見出され、アスパラギン及びリジンがそれぞれ α 炭素骨格三次構造の歪み無しにスレオニン及びグルタミンで置き換えられることが可能なことを支持している。加えて、どの天然に存在するイソアレルゲン配列も位置 28 及び 32 にそれぞれスレオニン及びグルタミンを有していないことから、この置換が天然に存在しない Bet v 1 分子を生ずる。

Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln の IgE 結合特性

上述のように、カバノキアレルギー患者由来の血清 IgE のプールを用いた流動相 IgE 阻害アッセイによって、変異体 Asn28Thr+Lys32Gln の IgE 結合特性を組換え Bet v 1 と比較した。

図 5 は、非ビオチン化 Bet v 1、Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln による、アレルギー患者のプール由来の血清 IgE に対するビオチン化組換え Bet v 1 の結合の阻害を示す。

血清プール中に存在する血清 IgE に対する結合の 50% 阻害を達成するために必要な各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換え Bet v 1 は約 6.5 ng で 50% 阻害を達成する一方、Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln の対応する濃度は約 12 ng である。このことは、Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln に導入された点変異が特異的血清 IgE に対する親和性を約 1/2 に低下させたことを示す。

Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln により達成された阻害の最大値は、組換え Bet v 1 に比べて明らかに低くなる。このことは、Asn28Thr+Lys32Gln 置換すると血清プール中に存在する特異的 IgE の幾らかは Bet v 1 変異体 Asn28Thr+Lys32Gln を認識できないことを示し得る。

【0025】

Bet v 1 変異体 Pro108Gly

位置 108 のプロリンは高度の溶媒露出 (60%) を示し、ファガレスアレルギーに共通する分子表面パッチ (パッチ III) に位置する。Bet v 1 相同 PR-10 タンパク

質の幾つかにおいてグリシン残基が位置108を占めるのが見出され、プロリンは α 炭素骨格三次構造の歪み無しにグリシンで置き換えられることが可能であることを支持している。加えて、どの天然に存在するイソアレルゲン配列も位置108にグリシンを有さないことから、グリシンによるプロリンの置換が天然に存在しないBet v 1分子を生ずる。

Bet v 1 Pro108Gly変異体のIgE結合特性

上述のようにカバノキアレルギー患者由来の血清IgEのプールを用いた流動相IgE阻害アッセイによって、Bet v 1 Pro108Gly変異体のIgE結合特性を組換えBet v 1と比較した。

図6は、非ビオチン化Bet v 1、Bet v 1 Pro108Gly変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清IgEに対するビオチン化組換えBet v 1の結合の阻害を示す。 10

血清プール中に存在する血清IgEに対する結合の50%阻害を達成するために必要な各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換えBet v 1は約6.5 ngで50%阻害を達成する一方、Bet v 1 Pro108Glyの対応する濃度は15 ngである。このことは、Bet v 1 Pro108Glyに導入された一つの点変異が特異的血清IgEに対する親和性を約1/2に低下させることを示す。

Bet v 1 Pro108Gly変異体によって達成される阻害の最大値は、組換えBet v 1と比べていくらか低くなる。このことは、Pro108Gly置換すると血清プール中に存在する特異的IgEの幾らかはBet v 1 Pro108Gly変異体を認識できないことを示し得る。 20

【0026】

Bet v 1変異体Glu60Ser（非パッチ変異体）

位置60のグルタミン酸は高度の溶媒露出（60%）を示すが、ファガレスアレルゲンに共通の分子表面パッチに位置しない。Bet v 1相同PR-10タンパク質の幾つかにおいてセリン残基が位置60を占めるのが見出され、グルタミン酸が α 炭素骨格三次構造の歪み無しにセリンで置き換えられることが可能であることを支持している。加えて、どの天然に存在するイソアレルゲン配列も位置60にセリンを有さないことから、セリンによるグルタミン酸の置換が天然に存在しないBet v 1分子を生ずる。

Bet v 1 Glu60Ser変異体のIgE結合特性

上述のようにカバノキアレルギー患者由来の血清IgEのプールを用いた流動相IgE阻害アッセイによって、Bet v 1 Glu60Ser変異体のIgE結合特性を組換えBet v 1と比較した。 30

図7は非ビオチン化Bet v 1、Bet v 1 Glu60Ser変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清IgEに対するビオチン化組換えBet v 1の結合の阻害を示す。Glu45Ser、Pro108Gly及びAsn28Thr+Lys32Gln変異体とは対照的に、グルタミン酸60のセリンへの置換はIgE結合特性にどんな有意な効果も示さない。このことは、明らかにされたファガレス共通パッチの外側の置換は、特異的血清IgEの結合に重要でない効果を有するのみであることを示し、保存されたアレルゲン分子表面領域が優性IgE結合エピトープを含むという概念を支持している。 40

Bet v 1三重パッチ変異体

三重パッチ変異体では、上述した三つの異なるファガレス共通パッチに導入された点変異（Glu45Ser、Asn28Thr+Lys32Gln及びPro108Gly）を同時に導入して、四つのアミノ酸置換を有する人為的変異体を作成した。

Bet v 1三重パッチ変異体の構造解析

精製三重パッチ変異体の構造上の完全性を、円二色性（CD）分光法によって解析した。図8は、ほぼ等しい濃度で記録された組換え体及び三重パッチ変異体のCDスペクトルを示す。二つの組換えタンパク質由来のCDスペクトルにおけるピークの振幅及び位置における重複は二つの調製品が二次構造を等量含むことを示し、導入されたアミノ酸置換によ 50

って α 炭素骨格三次構造が影響されないことを強く示唆している。

【0027】

Bet v 1三重パッチ変異体のIgE結合特性

上述のようにカバノキアレルギー患者由来の血清IgEのプールを用いた流動相IgE阻害アッセイによって、Bet v 1三重パッチ変異体のIgE結合特性を組換えBet v 1と比較した。

図9は、非ビオチン化Bet v 1、Bet v 1三重パッチ変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清IgEに対するビオチン化組換えBet v 1の結合の阻害を示す。上述した単変異体とは対照的に、三重パッチ変異体の阻害曲線は組換え体に対し、もはや並行関係でない。このことは、三重パッチ変異体に導入された置換が組換え体と比べてIgE結合特性及びエピトープの外形を変化させていることを示す。この並行性の欠如が、特異的血清IgEに対する三重パッチ変異体の親和性の減少を定量化することを困難にしている。 10

組換えBet v 1は約6 ngで50%阻害を達成する一方、Bet v 1三重パッチ変異体の対応する濃度は30 ng、すなわち1/5の親和性減少である。しかしながら、80%阻害を達成するための対応する値はそれぞれ20 ng及び400 ng、すなわち1/20の減少である。

組換えBet v 1三重パッチ変異体を用いたT細胞増殖アッセイ

この分析は、参考文献15に記述されたように行った。三つの異なるカバノキ花粉アレルギー患者由来のT細胞株において、組換えBet v 1三重パッチ変異体が組換え体及び天然に存在するアレルゲンと同様な刺激指数で増殖を誘導できることが見出された。このことは、三重パッチ変異体が抗体産生に必要な細胞性免疫応答を開始可能であることを示唆する。 20

【0028】

実施例2

実施例2は、一つの第一変異を有する組換え変異体アレルゲンの調製を記述する。本発明の組換え変異体アレルゲン、すなわち少なくとも四つの第一変異を含むアレルゲンは、同じ手順を用いて調製され得る。

ベスプラ・ブルガリス毒物主要アレルゲン抗原5に含まれる共通エピトープの同定

抗原5は、ヒトにおけるアレルゲンとして知られる三つのスズメバチ毒物タンパク質の一つである。前記スズメバチはホーネット、イエロージャケット及びワスプを含む。他二つのスズメバチ毒物の既知アレルゲンは、ホスホリパーゼA₁及びヒアルロニダーゼである。ベスプラ・ブルガリス由来の抗原5 (Ves v 5) はクローニングされて、酵母系において組換えタンパク質として発現されている (Monsalve et al., 1999、参考文献22)。組換えVes v 5の三次元結晶構造は1.8 Åの解像度で最近決定されている (近刊)。この構造の主な特徴は、「 α - β - α サンドイッチ」を生じる三つの積み重ねられた層に配置された四つの β 鎖及び四つの α ヘリックスから構成される。異なるベスプラ種に由来する抗原5の相同アレルゲン間の配列同一性は約90%であり、保存された分子表面領域及び保存されたB細胞エピトープの存在を示唆している。 30

既に樹木花粉アレルゲンに対して述べたように、ベスプラ抗原5アレルゲンの全既知アミノ酸配列のアラインメント後、Ves v 5の三次元構造によって明らかにされた抗原5の分子表面の解析と組合せて、共通パッチの存在を明らかにし、その同定を行った。図10は、個々に整列させた抗原5の残基の溶媒接触性、及び、ベスプラ抗原5配列アラインメント (左パネル) を示す。図10右パネル上で、ベスプラ抗原5:sの中の保存された領域を着色して、抗原5の分子表面を示す。 40

【0029】

部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基の選択

臨床ベスプラアレルギー性交差反応性を示す患者の大部分に由来する血清IgEの結合性にアミノ酸残基の改変が影響することが予測されるため、部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基をベスプラに共通するパッチに存在する残基の中から選択した。 50

各パッチ内の各アミノ酸残基の相対方向及び溶媒露出パーセンテージを、各アミノ酸残基の原子座標に基づいて計算した。低度の溶媒露出を有する残基は、構造を破壊する可能性又は抗体相互作用を失う可能性により、変異誘発に適切であるとみなさなかった。残りの残基を溶媒露出の程度に従って順位付けした。

Ves v 5をコードする遺伝子のクローニング

全RNAを(Fang et al. 1988、参考文献23)に記述されるようにベスブラ・ブルガリス・スズメバチの毒物胃酸分泌線から単離した。

第一鎖cDNA合成、PCR増幅及びVes v 5遺伝子のクローニングを(Luet al. 1993、参考文献24)に記述されるように行った。

pPICZαAへのサブクローニング

続いてVes v 5をコードする遺伝子を、ピチア・パストリス(Pichia pastoris)におけるVes v 5の分泌発現のため、pPICZαAベクター(Invitrogen)へサブクローニングした。この遺伝子をPCRによって増幅し、酵母のα因子分泌シグナルのためのコード配列とともに、イン・フレームにサブクローニングした。この構築物において、α因子はタンパク質分泌の間にピチア・パストリスKex2プロテアーゼ系によりin vivoで切断除去される。

簡単に言うと、鋳型としてVes v 5、及び、タンパク質のアミノ及びカルボキシル末端にそれぞれ対応するプライマーを用いてPCRを行った。このプライマーはそれぞれ、クローニングのためのEcoRI及びXbaI制限酵素部位を提供するように5'末端を延長した。Kex2切断部位をコードするヌクレオチドを、この構築物においてタンパク質のアミノ末端に対し18ヌクレオチド上流に配置し、アミノ末端に六つの付加アミノ酸Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Pheを有するVes v 5を発現させた。

P. パストリスへのpPICZαA-Ves v 5の挿入

Ves v 5遺伝子が挿入されたpPICZαAベクターをSacI制限酵素切断によって線形にし、ピチア・パストリスのゲノム上のAOX1遺伝子座に挿入した。Invitrogenの推奨に従ってKM71細胞のピチア・パストリス上の相同組換えによって、挿入を行った。

【0030】

In vitroの変異誘発

鋳型としてVes v 5を挿入した組換えpPICZαAを用いたPCRによって、in vitroの変異誘発を行った。四つのプライマーを用いた三つのPCR反応によって各変異体Ves v 5遺伝子を生成させた。

二つの変異誘発特異的オリゴヌクレオチドプライマーを、各変異を提供するように、各DNA鎖に対し一つずつ合成した(図11及び12を参照)。変異ヌクレオチドを起点として用い、両プライマーを5'末端側に6~7ヌクレオチド、3'末端側に12~13ヌクレオチド延長した。延長ヌクレオチドは、実際領域においてVes v 5遺伝子と配列が同一であった。

さらに、二つの一般的に適用可能なプライマー(図12において「全センス」及び「全非センス」と表示)を合成して、全変異体に対して用いた。真正アミノ末端を有するVes v 5変異体の発現を保証するために、タンパク質のアミノ末端に対応する一つのプライマーはXhoI認識部位を有するように5'末端で延長した。Ves v 5変異体遺伝子のpPICZαAベクターへの挿入時に、Kex2プロテアーゼ切断部位をVes v 5アミノ末端の上流に直接再生成させた。第二プライマーは、pPICZαAベクターのVes v 5遺伝子からおよそ300 bp下流に位置する領域の配列に対応させた。Ves v 5アミノ末端に対応するプライマー配列はセンス鎖由来であり、下流プライマー配列は非センス鎖由来である(図11を参照)。

PCRアーチファクトの頻度を減少するために20回しか温度サイクルを行わなかったことを除き、二つの独立したPCR反応を本質的には標準的手順(Saiki et al 1988)に従って行った。各PCR反応は、鋳型としてVes v 5を挿入されたpPICZαA、一つの変異特異的プライマー及び一つの一般的に適用可能なプライマーの意

10

20

30

40

50

味のある組合せを用いた。

このPCR産物を”コンサート、ラピッドPCRピュアリフィケーションシステム”(Life Technologies)を用いて精製した。鋳型として二つの第一PCR反応によるPCR産物の組合せ、及び、一般的に適用可能な両プライマーを用いて、第三PCR反応を行った。再び、20サイクルの標準的PCRを用いた。このPCR産物を”コンサート、ラピッドPCRピュアリフィケーションシステム”(Life Technologies)を用いて精製し、制限酵素(XhoI/XbaI)で切断し、同じ酵素で制限酵素切断したpPICZαAベクターに方向性を持たせてライゲーションさせた。図13は、全Ves v 5変異の概要を示す。

【0031】

10

P. パストリスへのpPICZαA-Ves v 5変異体の挿入

Ves v 5変異体遺伝子を挿入されたpPICZαAベクターをSacI制限酵素切断によって線形にし、ピチア・パストリスのゲノム上のAOX1遺伝子座に挿入した。In vitroの推奨に従ってKM71細胞のピチア・パストリス上の相同組換えによって、挿入を行った。

スクレオチドのシークエンシング

サブクロニングの前及び後、in vitroの変異誘発後にそれぞれ、Ves v 5をコードする遺伝子のスクレオチド配列の決定を行った。

アンピシリン0.1 g/lを補充したLB培地中で一晩飽和に達するまで増殖させた細菌培養液10 mlから、プラスミドDNAをQiagen-tip 20カラムで精製し、シークエネース・バージョン2.0 DNAシークエンシングキット(USB)を用いて供給元の推奨に従ってシークエンシングを行った。

20

組換えVes v 5の発現及び精製

酵母窒素塩基、ビオチン、グリセロール及びヒスチジンを含むpH 6.0のリン酸緩衝液100 mlを含む500 mlボトル中、30℃、225 rpmで軌道振盪しながら、ピチア・パストリス株KM71の組換え酵母細胞をA₆₀₀ nmが4~6になるまで増殖させた。細胞は遠心分離によって集め、グリセロールの代わりにメタノールを含む同様な緩衝化培地10 mlに再懸濁した。毎日メタノール0.05 mlを加えながら、30℃で7日間インキュベーションを続けた。

細胞を遠心分離によって収穫し、集めた培養液を限外濾過によって濃縮した。pH 4.6の50 mMアンモニウムアセテート緩衝液に透析した後、このサンプルを同じ緩衝液で平衡化したFPLC (Pharmacia) SE-53カチオン交換カラムに装填した。このカラムを0~1.0 M NaCl、50 mMアンモニウムアセテートの直線グラジエントで溶離した。約0.4 M NaClで溶離された組換えVes v 5のピークを集め、0.02 N酢酸に透析した。約10 mg/mlまで濃縮した後、精製Ves v 5を4℃で保存した。

30

【0032】

組換えVes v 5の結晶化

Ves v 5の結晶を、25℃の蒸発拡散技術によって成長させた。結晶化のために、5 μlの5 mg/ml Ves v 5を5 μlの18% PEG 6000、0.1 Mクエン酸ナトリウム、pH 6.0と混合し、1 mlの18% PEG 6000、0.1 Mクエン酸ナトリウム、pH 6.0に対して平衡化した。

40

天然Ves v 5結晶及び重原子取込み後の誘導体から100 KでX線回析データを集め、Ves v 5三次元構造を解析することに用いた(図10を参照)(原稿は準備中)。

ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫電気泳動

二つのVes v 5変異体を組換えVes v 5タンパク質として作製し、組換えVes v 5に対して産生されたポリクローナルウサギ抗体に対する反応性を試験した。未処理状態でロケット免疫電気泳動によって分析した場合、ウサギ抗体は組換えVes v 5及び両前記変異体を沈殿させることが可能であった。このことは前記変異体が保存されたα炭素骨格三次構造を有することを示している。

50

特異的血清 I g E の阻害

スズメバチ毒物アレルギー患者由来の血清 I g E のプールを用いた流動相 I g E 阻害アッセイによって、Ves v 5 変異体の I g E 結合特性を組換え Ves v 5 と比較した。この阻害アッセイは、Bet v 1 の代わりにビオチン化組換え Ves v 5 を用いて上述のように行った。

Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体

位置 72 のリジンは高度の溶媒露出（70%）を示し、ベスプラ抗原 5 に共通な分子表面パッチに位置する。この相対方向及び高度の溶媒露出は、リジン 72 が α 炭素骨格三次構造の歪み無しにアラニン残基によって置き換えられることが可能であることを支持した。加えて、どの天然に存在するイソアレルゲン配列も位置 72 にアラニンを有さないことから、アラニンによるリジンの置換が天然に存在しない Ves v 5 分子を生ずる。 10

【0033】

Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体の I g E 結合特性

上述のようにカバノキアレルギー患者由来の血清 I g E のプールを用いた流動相 I g E 阻害アッセイによって、Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体の I g E 結合特性を組換え Ves v 5 と比較した。

図 14 は、非ビオチン化 Ves v 5、Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 I g E に対するビオチン化組換え Ves v 5 の結合の阻害を示す。

血清中に存在する血清 I g E に対する結合の 50% 阻害を達成するために必要な各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換え Ves v 5 は約 6 ng で 50% 阻害を達成する一方、ves v 5 Lys 72 Ala の対応する濃度は 40 ng である。このことは、Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体に導入された一つの点変異が特異的血清 I g E に対する親和性を約 1/6 に低下させることを示す。Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体によって達成された阻害の最大値は、組換え Ves v 5 に比べて著しく低下する。このことは、Lys 72 Ala 置換すると血清プール中に存在する特異的 I g E の幾らかは Ves v 5 Lys 72 Ala 変異体を認識できないことを示し得る。 20

【0034】

Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体

位置 96 のチロシンは高度な溶媒露出（65%）を示し、ベスプラ抗原 5 に共通な分子表面パッチに位置する。この相対方向及び高度な溶媒露出は、チロシン 96 が三次元構造の歪み無しにアラニン残基で置き換えられることが可能であることを支持した。加えて、どの天然に存在するイソアレルゲン配列も位置 96 にアラニンを有さないことから、アラニンによるチロシンの置換が天然に存在しない Ves v 5 分子を生ずる。 30

Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体の I g E 結合特性

上述のようにカバノキアレルギー患者由来の血清 I g E のプールを用いた流動相 I g E 阻害アッセイによって、Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体の I g E 結合特性を組換え Ves v 5 と比較した。

図 14 は、非ビオチン化 Ves v 5、Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 I g E に対するビオチン化組換え Ves v 5 の結合の阻害を示す。 40

血清プール中に存在する血清 I g E に対する結合の 50% 阻害を達成するために必要な各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換え Ves v 5 は約 6 ng で 50% 阻害を達成する一方、Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体の対応する濃度は 40 ng である。

このことは、Ves v 96 Tyr 96 Ala 変異体に導入された一つの点変異が特異的血清 I g E に対する親和性を約 1/6 に低下させることを示す。

Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体により達成された阻害の最大値は、組換え Ves v 5 に比べて著しく低下する。このことは、Tyr 96 Ala 置換すると血清プール中に存在する特異的 I g E の幾らかは、Ves v 5 Tyr 96 Ala 変異体を認識でき 50

ないことを示し得る。

【0035】

実施例 3

置換のためのアミノ酸の同定及び選択

溶媒接触性及び保存の程度のパラメータを用いて、アレルゲン Bet v 1、Der p 2 及び Ves v 5 のための置換に適する表面露出アミノ酸の同定及び選択をした。溶媒接触性

ソフトウェア Insight II バージョン 97.0 (MSI) 及び半径 1.4 Å (コナリー (Connolly) 表面) のプローブを用いて、溶媒接触性を計算した。

ソフトウェア PASS (球による推定活性部位) を用いプローブで満たすことによって解析から内部空洞を排除した。その後、表面上のプローブを手動で取り出した。

保存

Bet v 1 :

3-D 構造は、アクセッション番号 Z80104 (1bv1.pdb) に基づく。

保存残基の解析に含まれた 38 の他の Bet v 1 配列は、アクセッション番号：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 を含む。

【0036】

Der p 2 :

3-D 構造はアクセッション番号 P49278 (1a9v.pdb) に基づく。

保存残基の解析に含まれた 6 つの他の Der p 2 配列は、以下の置換を含む：

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.

Ves v 5 :

3-D 構造はアクセッション番号 Q05110 (pdb 座標は公知でない) に基づく。

保存残基の解析における他の Ves v 5 配列は、一つのアミノ酸置換：M202K を含む。

結果

Bet v 1

高度に溶媒露出された 59 アミノ酸：

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。

【0037】

高度に溶媒露出され、70%より高く保存された57アミノ酸：

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-1 10
 54, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141,
 E-87, E-73。

実施した23変異：

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

表1は、Bet v 1アミノ酸の溶媒露出を降順にした一覧表を示す。第1欄はアミノ末端から始まるアミノ酸番号を記載し、第2欄は1文字略語でアミノ酸を記載し、第3欄は標準化溶媒露出指数を記載し、第4欄はこの位置において関連アミノ酸を有する既知配列 20
 のパーセンテージを記載する。

【0038】

【表1】

表 1 : Bet v 1

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

10

20

30

24	L	0,528	100
42	E	0,519	100
4	N	0,517	95
153	A	0,513	100
44	I	0,508	97
138	E	0,496	100
61	G	0,488	100
130	A	0,479	97
70	R	0,474	100
28	N	0,469	90
35	P	0,467	100
149	S	0,455	92
103	K	0,447	100
150	Y	0,438	100
154	H	0,436	100
43	N	0,412	100
106	A	0,411	95
115	K	0,411	100
14	P	0,410	97
5	Y	0,410	100
137	K	0,396	100
141	E	0,387	95
87	E	0,385	100
73	E	0,384	100
16	A	0,367	100
79	F	0,362	100
3	F	0,355	100
158	Y	0,346	100
105	V	0,336	100
101	E	0,326	100
64	F	0,325	100
86	I	0,322	100
39	S	0,314	100
124	G	0,310	100
72	D	0,308	97
142	T	0,293	67
66	Y	0,289	100
55	K	0,288	100
7	T	0,279	67
40	S	0,274	95

10

20

30

40

25	D	0,271	87
135	A	0,267	92
68	K	0,262	100
97	K	0,247	100
46	G	0,235	100
27	D	0,232	97
1	G	0,227	100
113	I	0,225	77
51	G	0,220	100
92	G	0,218	100
80	K	0,212	100
110	G	0,211	100
107	T	0,203	85
94	T	0,202	92
41	V	0,201	97
48	G	0,198	100
91	I	0,192	18
31	P	0,188	100
75	D	0,188	97
33	V	0,183	100
49	G	0,176	100
17	R	0,172	100
99	S	0,158	64
89	G	0,154	100
53	I	0,154	100
121	H	0,153	100
9	T	0,150	72
74	V	0,148	97
132	Q	0,146	72
57	S	0,137	49
148	E	0,135	100
82	N	0,133	41
128	V	0,125	64
117	S	0,124	87
90	P	0,117	67
116	I	0,112	100
122	T	0,107	100
139	M	0,104	62
95	L	0,104	97
54	K	0,096	100
146	A	0,095	100

10

20

30

40

59	P	0,088	97
157	A	0,088	100
133	V	0,077	44
88	G	0,068	100
140	G	0,053	85
37	A	0,042	95
81	Y	0,041	100
23	I	0,036	95
104	I	0,036	92
15	A	0,036	97
58	F	0,029	100
29	L	0,028	100
19	F	0,027	100
100	N	0,022	97
22	F	0,021	97
71	V	0,014	100
111	G	0,014	100
13	I	0,014	100
18	L	0,014	97
114	L	0,014	100
11	S	0,007	100
151	L	0,007	97
144	L	0,007	90
52	T	0,007	100
84	S	0,007	97
118	N	0,007	97
102	I	0,007	100
21	A	0,000	97
26	G	0,000	97
30	F	0,000	44
34	A	0,000	100
38	I	0,000	87
56	I	0,000	100
67	V	0,000	97
69	D	0,000	62
83	Y	0,000	95
85	V	0,000	72
98	I	0,000	95
112	S	0,000	77
120	Y	0,000	95
136	S	0,000	67
143	L	0,000	100
147	V	0,000	100

10

20

30

40

【 0 0 3 9 】

Der p 2

高度に溶媒露出された 5 5 アミノ酸：

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-

50

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。

高度に溶媒露出され、70%より高く保存された54アミノ酸：

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。

10

実施した6変異：

K6A, K15E, H30N, E62S, H74N, K82N。

表2は、Derp 2アミノ酸の溶媒露出を降順にした一覧表を示す。第1欄はアミノ末端から始まるアミノ酸番号を記載し、第2欄はアミノ酸を1文字略語で記載し、第3欄は標準化溶媒露出指数を記載し、第4欄はこの位置における関連アミノ酸を有する既知配列

20

のパーセンテージを記載する。

【0040】

【表2】

表 2 : Der p 2

NO	AA	Solv_exp	Cons%
128	R	1,000	100
129	D	0,965	100
11	H	0,793	100
30	H	0,712	100
1	S	0,700	100
77	K	0,694	100
75	Y	0,681	100
31	R	0,677	100
82	K	0,658	100
6	K	0,645	100
96	K	0,643	100
48	K	0,642	100
55	K	0,641	100
89	K	0,627	100
85	Q	0,624	100
92	W	0,610	100
97	I	0,581	100
22	H	0,568	100
65	V	0,559	100
24	S	0,557	100
74	H	0,542	100
126	K	0,542	100
61	L	0,539	100
26	P	0,516	100
93	N	0,513	100
64	D	0,509	100
28	I	0,504	100
14	K	0,493	100
100	K	0,489	100
62	E	0,454	100

10

20

30

127	I	0,439	100
102	E	0,428	100
25	E	0,428	100
66	P	0,427	100
114	D	0,418	57
17	L	0,412	100
60	G	0,390	100
95	P	0,388	100
53	E	0,377	100
81	V	0,377	100
51	K	0,370	100
103	N	0,369	100
2	Q	0,366	100
46	N	0,360	100
42	E	0,357	100
91	T	0,340	100
87	D	0,334	100
10	N	0,333	100
111	M	0,325	71
8	C	0,323	100
124	H	0,315	100
68	I	0,313	100
79	P	0,307	100
109	K	0,307	100
15	K	0,302	100
49	T	0,292	100
44	N	0,291	100
113	D	0,290	100
63	V	0,286	100
105	V	0,280	100
19	P	0,270	100
84	Q	0,264	100
76	M	0,262	86
7	D	0,251	100
116	V	0,244	100
78	C	0,238	100
36	Q	0,235	100

10

20

30

40

45	Q	0,233	100
40	V	0,223	57
57	S	0,212	100
38	E	0,205	100
69	D	0,203	100
9	A	0,196	100
71	N	0,190	100
98	A	0,186	100
115	G	0,180	100
13	I	0,179	100
123	T	0,179	100
34	P	0,178	100
4	D	0,157	100
20	G	0,150	100
107	T	0,143	100
12	E	0,137	100
94	V	0,137	100
121	I	0,136	100
83	G	0,128	100
70	P	0,128	100
73	C	0,120	100
3	V	0,116	100
35	F	0,111	100
59	D	0,099	100
29	I	0,098	100
23	G	0,085	100
54	I	0,075	100
5	V	0,075	100
101	S	0,074	100
72	A	0,069	100
27	C	0,060	100
32	G	0,059	100
99	P	0,058	100
86	Y	0,056	100
16	V	0,052	100

10

20

30

40

50	A	0,040	100	
90	Y	0,039	100	
18	V	0,035	100	
33	K	0,033	100	
52	I	0,029	100	
58	I	0,029	100	
104	V	0,024	100	
112	G	0,023	100	
21	C	0,023	100	10
88	I	0,023	100	
117	L	0,016	100	
56	A	0,011	100	
41	F	0,011	100	
120	A	0,006	100	
119	C	0,006	100	
67	G	0,005	100	
122	A	0,005	100	20
37	L	0,000	100	
39	A	0,000	100	
43	A	0,000	100	
47	T	0,000	29	
80	L	0,000	100	
106	V	0,000	100	
108	V	0,000	100	
110	V	0,000	100	
118	A	0,000	100	30
125	A	0,000	100	

【0041】

V e s v 5

高度に溶媒露出された89アミノ酸：

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-8

5, I-182。

高度に溶媒露出され、70%より高く保存された88アミノ酸：

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。

実施した9変異：

K29A, T67A, K78A, V84S, Y102A, K112S, K144A, K202M, N203G。

表3は、Ves v 5アミノ酸の溶媒露出を降順にした一覧表を示す。第1欄はアミノ末端から始まるアミノ酸番号を記載し、第2欄はアミノ酸を1文字略語で記載し、第3欄は標準化溶媒露出指数を記載し、第4欄はこの位置における関連アミノ酸を有する既知配列のパーセンテージを記載する。

【0042】

【表3】

表3 : Ves v 5

NO	AA	Solv_exp	Cons%
16	K	1,000	100
185	K	0,989	100
11	K	0,978	100
44	K	0,978	100
210	K	0,962	100
63	R	0,956	100
13	K	0,951	100
6	F	0,868	100
149	K	0,868	100
128	K	0,857	100
184	E	0,841	100
112	K	0,824	100
202	K	0,824	50
157	F	0,819	100
3	E	0,802	100
29	K	0,797	100
203	N	0,797	100
34	N	0,775	100
78	K	0,775	100
151	K	0,753	100
15	L	0,714	100
158	L	0,714	100
102	Y	0,687	100
186	W	0,665	100
134	K	0,654	100
87	D	0,621	100
52	K	0,615	100
67	T	0,610	100
125	T	0,610	100
150	K	0,604	100
40	Y	0,593	100
48	Q	0,593	100
65	L	0,593	100
81	K	0,588	100
101	Q	0,577	100
208	Q	0,566	100
144	K	0,560	100

10

20

30

8	N	0,555	100
70	N	0,549	100
104	H	0,549	100
45	Q	0,538	100
137	K	0,538	100
159	K	0,533	100
205	E	0,511	100
82	N	0,500	100
111	A	0,500	100
131	D	0,495	100
24	K	0,489	100
36	V	0,489	100
7	N	0,484	100
138	M	0,473	100
209	T	0,473	100
84	V	0,462	100
172	K	0,451	100
19	V	0,445	100
56	D	0,445	100
73	P	0,440	100
33	G	0,429	100
106	T	0,429	100
170	N	0,429	100
28	L	0,423	100
43	T	0,423	100
114	Q	0,423	100
10	C	0,412	100
60	K	0,407	100
31	N	0,396	100
47	K	0,396	100
5	E	0,390	100
145	D	0,390	100
38	V	0,379	100
127	A	0,379	100
156	D	0,379	100
204	E	0,374	100
71	P	0,363	100
26	G	0,352	100
129	Y	0,352	100
141	D	0,341	100
201	F	0,341	100
68	R	0,335	100
200	N	0,308	100
49	D	0,302	100

10

20

30

40

153	S	0,302	100
35	K	0,297	100
39	S	0,291	100
25	Y	0,280	100
37	V	0,280	100
18	G	0,275	100
85	W	0,275	100
182	I	0,275	100
46	E	0,264	100
126	A	0,253	100
88	E	0,247	100
76	P	0,236	100
79	N	0,236	100
124	S	0,236	100
30	P	0,231	100
123	G	0,231	100
162	H	0,231	100
183	Q	0,231	100
12	I	0,225	100
197	P	0,225	100
130	D	0,220	100
148	P	0,214	100
180	K	0,214	100
23	C	0,209	100
75	P	0,209	100
113	Y	0,209	100
108	R	0,203	100
188	K	0,203	100
51	L	0,198	100
59	Q	0,198	100
121	L	0,198	100
122	T	0,198	100
154	G	0,192	100
53	E	0,170	100
72	G	0,170	100
41	G	0,165	100
86	N	0,165	100
147	N	0,165	100
173	E	0,165	100
27	S	0,159	100
94	Q	0,159	100
187	H	0,159	100
142	E	0,154	100
64	G	0,148	100

10

20

30

40

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

10

20

30

40

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

10

20

30

【0043】

実施例 4

40

この実施例は、本発明の組換え変異体 *Bet v 1* アレルゲン、すなわち少なくとも四つの第一変異を含み *IgE* 結合親和性を減少させたアレルゲンの調製及び特徴付けを記述する。

Bet v 1 の部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基の選択

Bet v 1 アミノ酸残基の溶媒接触性を、実施例 3 の表 1 に示す。アミノ酸保存の割合は、ExPASy 分子生物学サーバー (<http://www.expasy.ch/>) において、*Bet v 1*. 2801 野生型アミノ酸配列を入力配列として用いた BLAST 検索に ClustalW アルゴリズムを用いて行われた配列アラインメントに基づく。このアラインメントは、ファガレス目の範囲内の種 (*Bet v 1* : ベツラ・ベルルコサ ; *Car b 1* : カルピナス・ベツルス ; *Cor a 1* : コリルス・アベルラナ (ave 50

l l a n a) ; A l n g 1 : アルナス・グルチノサ) に由来する 67 アレルゲン配列 (39 の B e t v 1 配列、11 の C a r b 1 配列、6 の C o r a 1 配列及び 13 の A l n g 1 配列) を含む。実施例中に示された変異組換え B e t v 1 アレルゲンに関し、置換のための標的残基は 95 % 以上のアミノ酸同一性に基づいた。

実施例 1 に記述するように、高度な溶媒露出、及び、近縁種に由来する花粉アレルゲン間において高度な保存を有するアミノ酸残基を部位特異的変異誘発のために選択した。低度の溶媒露出 (20 % より低い) を有する残基は、三次構造を破壊する可能性又は抗体相互作用を失う可能性のため、変異誘発に適切であるとみなさなかった。

導入された残基は、病原関連 (P R - 10) タンパク質と呼ばれる植物タンパク質群のイソフォームにおいて対応する位置に全て存在した。分子モデリングは、ファガレスアレルゲン及び P R - 10 タンパク質の三次構造がほぼ同一であることを示唆する。B e t v 1 は、有意な配列同一性 (20 ~ 40 %) を P R - 10 タンパク質と共有する。しかしながら、これら P R - 10 タンパク質に対するアレルギー性交差反応性の報告は存在しない。このように、B e t v 1 由来の高度に保存及び溶媒露出されたアミノ酸を P R - 10 タンパク質の対応する位置のアミノ酸と交換することにより、未改変の α 炭素骨格三次構造を有するが減少した I g E 結合親和性を有する変異 B e t v 1 タンパク質が生じる。

【0044】

In v i t r o の変異誘発

B e t v 1 を挿入された組換え p M A L - c を鋳型として用いた P C R によって、i n v i t r o の変異誘発を行った。5 ~ 9 の第一変異を含む組換え変異体アレルゲンの調製は二つの P C R 工程 ; 工程 I 及び I I を含む。最初に、図 17 (I) で概略的に説明するように、各変異を提供するセンス及びアンチセンス変異特異的オリゴヌクレオチドプライマーに加えて、変異に隣接する上流若しくは下流又は B e t v 1 の N 末端 / C 末端のいずれかを提供するセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ用いて、各一つの変異 (又は、DNA 配列上で共に近接して位置する場合には複数の変異) を B e t v 1 . 2801 又は B e t v 1 . 2801 誘導体の一連の DNA 配列に導入した。第二に、図 17 (I I) で概略的に説明するように、P C R 反応 I による P C R 産物を精製し、混合し、追加 P C R 反応 (I I) のための鋳型として、B e t v 1 の N 末端及び C 末端を提供するオリゴヌクレオチドプライマーとともに用いた。この P C R 産物をアガロースゲル電気泳動及び P C R ゲル精製 (L i f e T e c h n o l o g i e s) に続くエタノール沈殿によって精製し、制限酵素 (S a c I / E c o R I) 又は (S a c I / X b a I) で切断し、同じ酵素で制限酵素切断した p M A L - c に方向性を持たせてライゲーションを行った。

図 18 は、合成したオリゴヌクレオチドプライマー、及び、5 ~ 9 の第一変異を有する B e t v 1 変異体の構築の概略的な説明を示す。変異アミノ酸は、好ましくは実施例 3 で記述したように高度に溶媒露出及び保存されたことによって特徴付けられるアミノ酸からなる群より選択した。B e t v 1 変異体は、括弧内に示された以下の第一及び第二変異である：

変異体 B e t v 1 (2628) : T y r 5 V a l , G l u 45 S e r , L y s 65 A s n , L y s 97 S e r , L y s 134 G l u

変異体 B e t v 1 (2637) : A l a 16 P r o , (A s n 28 T h r , L y s 32 G l n) , L y s 103 T h r , P r o 108 G l y , (L e u 152 L y s , A l a 153 G l y , S e r 155 P r o)

変異体 B e t v 1 (2733) : (T y r 5 V a l , L y s 134 G l u) , (A s n 28 T h r , L y s 32 G l n) , G l u 45 S e r , L y s 65 A s n , (A s n 78 L y s , L y s 103 V a l) , L y s 97 S e r , P r o 108 G l y , A r g 145 G l u , (A s p 156 H i s , +160 A s n)

変異体 B e t v 1 (2744) : (T y r 5 V a l , L y s 134 G l u) , (G l u 42 S e r , G l u 45 S e r) , (A s n 78 L y s , L y s 103 V a l) , L y s 123 I l e , (A s p 156 H i s , +160 A s n)

変異体 Bet v 1 (2753) : (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, (Glu96Leu, Lys97Ser), (Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser), Arg145Glu。

【0045】

ヌクレオチドのシーケンシング

サブクローニングの前及び後、*in vitro*の変異誘発後のそれぞれで、Bet v 1をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の決定を行った。

アンピシリン0.1 g/lを補充したLB培地で一晩飽和に達するまで増殖させた細菌培養液10 mlから、プラスミドDNAをQiagen-tip 20カラムで精製し、(Perkin Elmer)から入手したレディ(Ready)・リアクション・ダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシングキット及び蛍光シーケンサーAB PRISM 377を用い、供給元の推奨に従ってシーケンシングを行った。

組換えBet v 1及び変異体の発現及び精製

参考文献15に記述されるように、組換えBet v 1(Bet v 1.2801及び変異体)をマルトース結合タンパク質に融合した状態で大腸菌DH5αにおいて過剰発現させ、精製した。簡単に言うと、組換えE. coli細胞を600 nmにおける光学密度0.8に達するまで37℃で増殖させた後、IPTGの添加によってBet v 1融合タンパク質の発現を誘導した。細胞を3時間のインキュベーションの後、遠心分離によって収穫し、溶菌緩衝液中に再懸濁させ、超音波処理によって破碎した。超音波処理及びさらなる遠心分離の後、組換え融合タンパク質をアミロースアフィニティークロマトグラフィーによって単離し、その後Xa因子とともにインキュベーションすることにより切断した(参考文献15)。第Xa因子切断後、組換えBet v 1をゲル濾過によって単離し、微量のマルトース結合タンパク質を除去するためにもう一回アミロースアフィニティークロマトグラフィーで処理した。

精製組換えBet v 1を限外濾過によって約5 mg/mlまで濃縮し、4℃で保存した。精製組換えBet v 1調製品の最終的な収率は、E. coli細胞培養液1リットルあたり2~5 mgであった。

精製組換えBet v 1調製品は、銀染色SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後見かけ上の分子量17.5 kDaの単一バンドとして現れた。

我々は既に、組換えBet v 1ナンバー2801が天然に存在するBet v 1と免疫化学的に区別がつかないことを示している(参考文献15)。

【0046】

Bet v 1(2628)及びBet v 1(2637)変異体

図19は、Bet v 1(2628)及びBet v 1(2637)の分子表面に導入された点変異を示す。変異体Bet v 1(2628)では、五つの第一変異がBet v 1の半分に導入され、残り半分は不変のままであった。変異体Bet v 1(2637)では、五つの第一変異及び三つの第二変異が前記残り半分に導入され、もう半分は不変のままであった。このように、変異体Bet v 1(2628)及び変異体Bet v 1(2637)における変異は、それぞれBet v 1表面の異なる半分に影響する。

組換えBet v 1(2628)変異体タンパク質の結晶化及び構造決定

本質的には(Spangfort et al 1996b、参考文献21)に記述されるように、組換えBet v 1(2628)の結晶を25℃の蒸発拡散によって成長させた。濃度5 mg/mlのBet v 1(2628)を、等体積の2.2 M硫酸アンモニウム、0.1 Mクエン酸ナトリウム、1% (v/v)ジオキサン、pH 6.3と混合し、100倍の体積の2.2 M硫酸アンモニウム、0.1 Mクエン酸ナトリウム、1% (v/v)ジオキサン、pH 6.3に対して平衡化した。24時間の平衡化の後、組換え野生型Bet v 1の結晶を種のもととして用い、参考文献21に記述される播種技術を応用することによって、結晶の成長を誘導した。

約4ヶ月後に結晶を収穫し、参考文献21に記述されるようにRigaku回転アノード

10

20

30

40

50

から発生させたX線を用いて解析し、分子置換を用いて構造を明らかにした。

Bet v 1 (2628) 変異体の構造

回転アノードから発生させたX線によって、三次元のBet v 1 (2628) タンパク質結晶回析を2.0 Åの解像度で解析することによって、変異誘発の構造的効果に取り組んだ。Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Gluの置換はBet v 1 (2628) 構造電子密度マップによって検証され、全体的なα炭素骨格三次構造が保存されていることも示された。

【0047】

Bet v 1 (2637) 変異体の構造解析

精製Bet v 1 (2637) 変異体の構造上の完全性を、円二色性(CD)分光法により解析した。図20は、ほぼ等しい濃度で記録された組換えBet v 1.2801(野生型)及びBet v 1 (2637) 変異体のCDスペクトルを示す。二つの組換えタンパク質由来のCDスペクトルにおけるピークの振幅及び位置の重複は、この二つの調製品が等量の二次構造を含むことを示し、導入されたアミノ酸置換によってα炭素骨格三次構造が影響されないことを強く示唆する。 10

Bet v 1 (2628) 及びBet v 1 (2637) 変異体のIgE結合特性

カバノキアレルギー患者由来の血清IgEのプールを用いた流動相IgE阻害アッセイによって、Bet v 1 (2628) 及びBet v 1 (2637) のIgE結合特性、及び、Bet v 1 (2628) 及びBet v 1 (2637) の1:1混合物のIgE結合特性を、組換え野生型Bet v 1.2801と比較した。 20

実施例1で記述したように、組換えBet v 1.2801を1:5(Bet v 1 ナンバー2801:ビオチン)のモル比でビオチン化した。阻害アッセイは次のように行った: 血清サンプル(25 µl)を抗IgE固体相とインキュベートし、洗滌し、ビオチン化Bet v 1.2801及び得られた変異体の混合物、又は、二つの変異体の1:1混合物に再懸濁してさらにインキュベートし、固体相に結合したビオチン化Bet v 1.2801の量をアクリジニウムエステル標識ストレプトアビジンとインキュベーションした後に測定したRLUから推定した。阻害の程度は、緩衝液及び阻害剤として変異体を用いて得られたRLUの間の比として計算した。

図21は、非ビオチン化Bet v 1.2801、Bet v 1 (2628)、Bet v 1 (2637)、Bet v 1 (2628) 及びBet v 1 (2637) の1:1 30
混合物による、アレルギー患者のプール由来の血清IgEに対するビオチン化組換えBet v 1.2801の結合の阻害を示す。

血清プール中に存在する血清IgEに対する結合の50%阻害を達成するために必要である各組換えタンパク質の量には、明らかな差がある。組換えBet v 1.2801は約5 ngで50%阻害を達成する一方、Bet v 1 (2628) 変異体の対応する濃度は約15~20 ngである。このことは、Bet v 1 (2628) 変異体に導入された点変異が特異的血清IgEに対する親和性を約1/3~1/4に低下させることを示す。

【0048】

Bet v 1 (2628) 変異体タンパク質によって達成された阻害の最大値は、組換え 40
Bet v 1.2801と比べて明らかに低下している。このことは、血清プール中に存在する特異的IgEの幾らかは導入された点変異のためにBet v 1 (2628) 変異体タンパク質を認識できないことを示し得る。

Bet v 1 (2637) は約400~500 ngで50%阻害を達成し、Bet v 1 (2637) 変異体に導入された点変異が特異的血清IgEに対する親和性をBet v 1.2801に比べて1/80~1/100に低下させることを示す。IgE結合性における大きな差異は、Bet v 1.2801の阻害曲線と比較してBet v 1 (2637) 変異体タンパク質から得られた阻害曲線の傾きの明らかな相違によって、さらに支持される。この異なる傾きは、IgE結合性の減少はBet v 1.2801と比べて明確に異なる変異体のエピトープパターンによることの証拠を提供する。 50

単改変アレルゲンでの阻害アッセイに加えて、Bet v 1 (2628) 又は Bet v 1 (2637) の各サンプルそれぞれが Bet v 1 と同じモル濃度を有する Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) の 1:1 混合物を試験すると、組換え Bet v 1. 2801 に対して IgE 結合を阻害する完全な (100%) 能力を示した。この IgE 結合を完全に阻害する能力は、Bet v 1. 2801 上に存在する反応性エпитープ全部が前記 1:1 アレルゲン混合物中に存在したことを明確に示している。このことは Bet v 1. 2801 及び前記アレルゲン混合物による二つの阻害曲線の傾きの比較によって、さらに支持される。IgE 結合の 50% 阻害を得るために Bet v 1. 2801 と比べて四倍高濃度のアレルゲン混合物を必要とすることから、混合アレルゲンサンプルの減少した IgE 反応性が実証される。

10

【0049】

変異組換え Bet v 1 アレルゲンをを用いた T 細胞増殖アッセイ

この分析は参考文献 15 に記述されるように行った。Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) 変異体タンパク質は両方とも、組換え体及び天然に存在するアレルゲンと同様な刺激指数でカバノキ花粉アレルギー患者由来の T 細胞株の増殖を誘導することができた。このことは、Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) の両変異体タンパク質それぞれが、抗体産生のために必要な細胞性免疫応答を開始可能であることを示唆する。

ヒト好塩基球を用いたヒスタミン放出アッセイ

好塩基性白血球からのヒスタミン放出を次のように行った。各カバノキ花粉患者から採取したヘパリン添加血液 (20 ml) を室温で保存し 24 時間以内に用いた。ヘパリン添加全血 25 μ l をガラスファイバーコートしたマイクロタイターウェルに加え (関連研究室、コペンハーゲン、デンマーク)、25 μ l のアレルゲン又は抗 IgE と 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、前記プレートをリンスして妨害物質を除去した。最後にマイクロファイバーに結合したヒスタミンを蛍光分光分析的に測定した。

20

Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) 変異体タンパク質のヒスタミン放出特性

ヒスタミン放出データを図 22 及び図 23 に示す。Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) 変異体タンパク質が二つのカバノキ花粉アレルギー患者由来のヒト好塩基球におけるヒスタミン放出を誘導する作用強度を試験した。両方のケースにおいて、ヒスタミン放出を誘導する変異アレルゲンの放出曲線は Bet v 1. 2801 の放出曲線に比べ明らかに右にシフトしている。このシフトは、Bet v 1 (2628) 及び Bet v 1 (2637) の作用強度が 1/3 ~ 1/10 に減少されたことを示す。

30

【0050】

変異体 Bet v 1 (2744) 及び変異体 Bet v 1 (2753)

Bet v 1 (2744) 及び Bet v 1 (2753) を混合アレルゲンワクチンとしての使用のため同様に構築した。これらの変異アレルゲンの点変異は全体表面において図 24 及び図 25 に示されるような配置様式で分布し、ここでも図 26 に示されるように二分子それぞれにおいて異なる表面領域に影響するように設計した。しかしながら、これらの改変アレルゲンが個々に単一アレルゲンワクチンとしても用いることができるであろう。

40

Bet v 1 (2744) 変異体タンパク質の構造解析

精製 Bet v 1 (2744) 変異体の構造上の完全性を円二色性 (CD) 分光法によって解析した。図 27 は、ほぼ等しい濃度で記録された組換え Bet v 1. 2801 (野生型) 及び Bet v 1 (2744) 変異体の CD スペクトルを示す。二つの組換えタンパク質由来の CD スペクトルにおけるピークの振幅及び位置の重複は、この二つの調製品が二次構造を等量含むことを示し、導入されたアミノ酸置換によって α 炭素骨格三次構造が影響されないことを強く示唆している。

Bet v 1 (2744) のヒスタミン放出特性

五つの異なるカバノキ花粉アレルギー患者由来の好塩基性白血球を用いた五つの実施例か

50

らのヒスタミン放出データを、図28及び図29A-Dに示す。Bet v 1 (2744) 変異体タンパク質がヒト好塩基球におけるヒスタミン放出を誘導する作用強度を試験した。変異アレルゲンの放出曲線はBet v 1.2801の放出曲線と比べて明らかに右にシフトしており、Bet v 1 (2744) のヒスタミン放出する作用強度が1/3～1/5に減少されたことを示している。

変異体 Bet v 1 (2733)

九つの第一変異を有する変異体 Bet v 1 (2733) を構築し、組換え的に発現させた。Bet v 1 (2733) における点変異の分布は、構成要素となるそれぞれの表面領域を $400 \text{ \AA}^2$ より大きく変化させないままにする。図30は、Bet v 1 (2733) の分子表面に導入された点変異を示す。

10

【0051】

実施例5

この実施例は、デルマトファゴイデス・プテロニスシナス由来の Der p 2 をコードする遺伝子のクローニング、及び、IgE 結合親和性を減少した変異体の構築を記述する。デルマトファゴイデス・プロテニスシナス全RNAの第一鎖cDNA合成からPCR増幅した産物を、Dr. Wendy-Anne Smith 及び Dr. Wayne Thomas (TVW 児童健康調査テレソン研究所、100 Roberts Rd, Subiaco, Western Australia 6008) から入手した。第一鎖cDNAライブラリーの増幅の際に、Der p 2 特異的プライマーを用いて Der p 2 を選択的に増幅した。続いてPCRフラグメントをpUC19 (New England Biolabs) の BamHI 認識部位へクローニングした。Der p 2 のDNAサブクローニングを、ベクター特異的なセンス (5'-GGCGATTTAAGTTGGGTAAACGCCAGGG-3') プライマー及びアンチセンス (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-3') プライマーを用いて行った。

20

ALK-101、ALK-102、ALK-103、ALK-104、ALK-113、ALK-114 及び ALK-120 と命名した全部で七つのユニークな Der p 2 イソフォームを同定した。データベースのアクセッション番号1A9Vを有する Der p 2 のNMR構造と高い配列同一性を有することから、ALK-114 と題したクローンを低親和性 IgE 変異体生成のための出発点として選択した。ALK-114 と比べると、他の6つの天然に存在するイソフォームは以下の置換を含む：

30

ALK-101: M76V

ALK-102: V40L, T47S

ALK-103: M111L, D114N

ALK-104: T47S, M111I, D114N

ALK-113: T47S

ALK-120: V40L, T47S, D114N。

【0052】

Der p 2 の pGAPZα-A への挿入

酵母ピチア・パストリスにおける Der p 2 の分泌発現のため、続いて Der p 2 (ALK-114) をコードする遺伝子を pGAPZα-A ベクター (Invitrogen) に挿入した。この遺伝子を、Der p 2 ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端にそれぞれ対応するセンスプライマー OB27 (5'-GGAAATTCCTCGAGAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTTGTGCC-3') 及びアンチセンスプライマー OB28 (5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3') を用いて増幅した。これらプライマーは、制限酵素部位 XhoI 及び XbaI をそれぞれ提供するように 5' 末端を延長した。XhoI 制限酵素部位は、Der p 2 の第一コドン (LYS-ARG) をコードする核酸配列とイン・フレームに融合させる。PCR増幅の1ラウンドを、体積100 µl 中：0.1 mg の鋳型 ALK-114 DNA、1x 伸長ポリメラーゼ緩衝液 (Boehringer Mannheim より入手可能)、各四

40

50

つの d N T P を 0.2 mM ずつ、各 0.3 μM のセンスプライマー及びアンチセンスプライマー、2.5 ユニットの伸長ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim より入手可能) で行った。前記 DNA を 95 °C 15 秒、45 °C 30 秒、72 °C 1 分の 25 サイクルで増幅し、続いて 72 °C 7 分の 1 サイクルを行った。得られた 475 bp の A L K - 114 P C R フラグメントを、Q I A クイック・スピン・ピュアリフィケーション・プロシージャ (Q i a g e n より入手可能) を用いて精製した。この精製 DNA フラグメントを X h o I 及び X b a I で消化し、ゲル精製し、同様に消化した p G A P Z α - A ヘライゲーションさせた。このライゲーション反応物を E. c o l i 株 D H 5 α にトランスフォームして、プラスミド p C B o 06 が得られた。

クローニングの前及び後、i n v i t r o の変異誘発の後に、DNA シークエンシングによって D e r p 2 のヌクレオチド配列を確かめた (以下を参照)。

【0053】

D e r p 2 配列

配列番号 1 は、D e r p 2 (A L K - 114) の核酸配列に対応する：

```

1      gatcaagtcgaatgtcaaatgtgtccaatcatgaaatcaaaaagtitttggtaccagga
61     tgccatggttcagaaccaatgatcatcatcggtgtaaacattccaattggaagccgtt
121    ttcaagccaacaaaacacaaaaccgctaaaattgaaatcaaaagcctcaatcgatggt
181    ttagaagttagatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattacatgaaatgcccatig
241    gttaaaggacaacaatatgatattaaatatatcatggaatgttccgaaaatgacacaaaa
301    tctgaaaatgttgtcgctactgttaaagttatgggtgatgatgggtgttttggcctgtgct
361    attgctactcatgctaaaatccgcgattaa

```

配列番号 2 は、D e r p 2 (A L K - 114) の導き出されたアミノ酸配列に対応する：

```

1      dqdvdkdcanheikkvlvpchgsepciihrgkpfqlavfeanqntktakieikasidg
61     levdpvgidpnachymkcpvlkgqydykytwnvpkiapksenvvvtvkvmgddgvlaca
121    iathakird

```

p G A P Z α - A - D e r p 2 の P. パストリスへの挿入

A v r I I 制限酵素を用いてベクター p C B o 06 を線形にし、コンピテントな P. パストリス株 X - 33 へ I n v i t r o g e n のマニュアルに記述されるようにトランスフォームした。100 μg/ml のゼオシンに対して抵抗性を持つ組換え細胞を選択し、ゼオシン 100 μg/ml を含む新しい Y P D プレート上でコロニー精製した。

組換え D e r p 2 の発現及び精製

ゼオシン 100 μg/ml を含む Y P D 培地 250 ml (1% イーストエキストラクト、2% ペプトン、2% グルコース) に、D e r p 2 を発現する組換え酵母細胞の一夜培養液を植え付けた。この培養液を 30 °C で 72 時間、最適な D e r p 2 発現が得られるまで増殖させた。細胞を遠心分離によって収穫し、得られた培養上清を 50% 硫酸アンモニウムで飽和させた。3000 x g、30 分間の遠心分離に続いて、この上清を 80% 硫酸アンモニウムで飽和させた。遠心分離の後、ペレットを 150 mM N H₄ H C O₃ に再懸濁し、同じ緩衝液で平衡化した Superdex 75 ゲル濾過カラム上で分画した。D e r p 2 を、その予測された分子量に対応する主要なピークとして溶離した。D e r p 2 の溶離は、S D S - P A G E 電気泳動に続く銀染色、及び、S D S - P A G E 電気泳動に続く D e r p 2 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫ブロット分析の両方によってモニターした。

【0054】

部位特異的変異誘発のためのアミノ酸残基の選択

変異誘発のためのアミノ酸残基の選択は、イエダニ (D e r p 2 / f 2 及び E u r m 2) 及び倉庫ダニ (T y r p 2、L e p d 2、G l y d 2) 由来のアレルゲンのうちで高く溶媒露出され高く保存された残基の同定に基づいた。高く溶媒露出されたアミノ酸残基は、D e r p 2 N M R 構造 (# 1.9、1A9V. pdb) の分子表面解析によって視覚的に同定した。12 のアミノ酸残基を、変異誘発のために選択した：K 6 A

, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N及びR128Q。

部位特異的変異誘発

一つの第一変異及びそれら複数の組合せを有する組換え変異体アレルゲンの構築を、以下に記述する。

Der p 2 変異体をコードする発現プラスミドを、鋳型DNAとしてpCB006を用いて作製した。特定の変異を取り込んだセンス及びアンチセンスプライマーを用いて、PCR反応を行った。特定の変異を生成させるためにPCR反応に用いたプライマー対を、図31に列挙する。この図では、変異をボールド体で表し、その後続くクローニング工程に用いた制限酵素部位に下線を引いている。変異体K6A、K15E、H30N、H74N及びK82Nの構築のため、本質的には「Der p 2のpGAPZα-Aへのクローニング」の節で記述するようにPCR反応を行った。精製PCRフラグメントを表示の制限酵素部位（図31を参照）で消化し、ゲル精製し、同様に消化したpCB006にライゲーションし、E. coli DH5αへトランスフォームした。 10

実施例1においてBet v 1 変異体生成について記述した選択的PCR変異誘発方法論を用い、変異E62Sを生成させた。二つの変異特異的オリゴヌクレオチドプライマーを、特定の変異を網羅するように合成した（OB47及びOB48、図31に記載した）。第二増幅工程に対して用いた二つの追加プライマーは、「Der p 2のpGAPZα-Aへの挿入」の節で記述するOB27及びOB28であった。

作製した変異体アレルゲンは実施例4で記述する方法、例えば円二色性（CD）分光法、結晶化、IgE結合特性の測定、ヒスタミン放出、T細胞増殖刺激能力等と同じ方法を用いて特徴付ける。 20

【0055】

実施例6

特異的アレルギーワクチン接種のための改良された安全性を有する変異組換えダニアレルゲン（Der p 2）

この実施例において、イエダニアレルゲンにおける本発明の概念の応用を一つのアレルゲン、Der p 2によって例証する。他のイエダニアレルゲンの操作は、同等の手順によって行うことができる。

変異組換えDer p 2分子の設計

配列番号3は、野生型イソフォームであるDer p 2-A L K-Gクローンのヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列を示す。

配列番号3：Der p 2-A L K-Gのヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列 30

```

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

```

10

【0056】

図32は、ExPASy分子生物学サーバー (<http://www.expasy.ch/>) において、配列番号3に示すDerp2-ALK-Gアミノ酸配列を入力配列として用いたBLAST検索にClustalWアルゴリズムを用いて行った配列アラインメントを示す。このアラインメントは、イエダニ種すなわちDerp2、Derf2及びEur2由来の配列を含む。図32において、Derp2-ALK-Gタンパク質配列における同じ位置のアミノ酸と同一であるアミノ酸残基は、灰色背景上に黒色の文字を用いて強調する。同一でないアミノ酸は、白色背景上に黒色で印刷する。

表面構造像

イエダニグループ2アレルゲンを表すアミノ酸配列は85%より高い類似性を有し、分子表面の幾らかを保存する（灰色に着色したゾーン）（図33を参照）。

図33は、Derp2-ALK-Gタンパク質配列を公知のPDB:1A9V NMR構造（PDBファイルに含まれる10のうちの構造番号1）に重ね合わせた際の、四つの異なる角度から見た表面輪郭を示す。

全体表面にわたり25～30Åの距離範囲内に空間的に分布する保存され高く溶媒露出されたアミノ酸を、変異のために選択する。以下の節では、次の情報を与える：変異のために適切であると考えられるアミノ酸のリスト（A）、設計された変異体のリスト（B）及び前記設計された変異体を表すDNA配列（C）。図34は一例として、変異体番号1の表面輪郭を示す。灰色は保存されたアミノ酸残基を示す。黒色は、変異のために選択されたアミノ酸残基を示す。

【0057】

A. 変異のために選択されたアミノ酸のリスト

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

B. 設計された変異体のリスト

変異体1：

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

変異体2：

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

変異体3：

40

50

K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 G, K 4 8 A, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

変異体 4 :

K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 G, E 6 2 S, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

変異体 5 :

K 1 5 E, H 3 0 G, K 4 8 A, E 6 2 S, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

変異体 6 :

S 2 4 N, H 3 0 G, K 4 8 A, E 6 2 S, K 7 7 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N, 10
R 1 2 8 Q

変異体 7 :

K 1 5 E, S 2 4 N, R 3 1 S, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N, K
1 0 0 N

変異体 8 :

K 1 5 E, S 2 4 N, R 3 1 S, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N, R
1 2 8 Q

変異体 9 :

K 1 5 E, S 2 4 N, R 3 1 S, K 4 8 A, H 7 4 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N, 20
R 1 2 8 Q

変異体 10 :

K 1 5 E, S 2 4 N, R 3 1 S, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

変異体 11 :

K 1 5 E, R 3 1 S, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

変異体 12 :

S 2 4 N, R 3 1 S, K 4 8 A, E 6 2 S, H 7 4 N, K 8 2 N, K 1 0 0 N,
R 1 2 8 Q

【 0 0 5 8 】

C. 変異体のヌクレオチド配列

変異体 1 :

K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 G, K 4 8 A, E 6 2 S, K 7 7 N, K 8 2 N, K
1 0 0 N

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAagtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattGGCcggtggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgccattatatgAACtgtccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaaatccggat

【 0 0 5 9 】

変異体 2 :

K 1 5 E, S 2 4 N, H 3 0 G, K 4 8 A, E 6 2 S, K 7 7 N, K 8 2 N, R
1 2 8 Q

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAagtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattGGCcggtggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgccattatatgAACtgtccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcacccaaatctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaaatcAGgat

【0060】

変異体3：

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

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattGGCggtggttaaacattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgca
tgccattatatGAACgtgccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgct
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

10

【0061】

変異体4：

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

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattGGCggtggttaaacattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaaaa
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttAACGgttgatgttcccggtatcgatccaaatgca
tgccattatatGAACgtgccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgct
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

20

【0062】

変異体5：

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

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggttca
gaaccatgtatcattGGCggtggttaaacattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttAACGgttgatgttcccggtatcgatccaaatgca
tgccattatatGAACgtgccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgct
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

30

【0063】

変異体6：

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

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattGGCggtggttaaacattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttAACGgttgatgttcccggtatcgatccaaatgca
tgccattatatGAACgtgccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgct
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

40

【0064】

変異体7：

K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K
100N

GatcaagtcgaigtcaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattcatAGCggtaaacattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttAACGgttgatgttcccggtatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccatttggttAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaaaatgtgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgct
attgctactcatgctaaaatcccgat

50

【0065】

変異体8：

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

GatcaagtcgaigtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattcatAGCggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggtttaaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcacccaaaatctgaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

10

【0066】

変異体9：

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

GatcaagtcgaigtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattcatAGCggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

20

【0067】

変異体10：

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

GatcaagtcgaigtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattcatAGCggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

30

【0068】

変異体11：

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

GatcaagtcgaigtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtaccaggatgccatggttca
gaaccatgtatcattcatAGCggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggtttaaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

40

【0069】

変異体12：

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

GatcaagtcgaigtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagtttttggtaccaggatgccatggtAAC
gaaccatgtatcattcatAGCggttaaccattccaattggaagctttattcgaagccaatcaaaactcaGCG
acagctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggtttaaAGCgttgatgttcccggatcgatccaaatgca
tgcAACtatatgaaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccaaaa
attgcaccaAACtctgaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataatgggtgttttggccgtgtgt
attgctactcatgctaaaatcCAGgat

50

【0070】

実施例7

特異的アレルギーワクチン接種のための改良された安全性を有する変異組換えダニアレルゲン (Der p 1)

この実施例において、イエダニアレルゲンにおける本発明の概念の応用を一つのアレルゲン、Der p 1によって例証する。他のイエダニアレルゲンの操作は、同等な手順によって行うことができる。

変異組換えDer p 1分子の設計

配列番号4は、野生型イソフォームであるDer p 1-A L Kクローンのヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列を示す。

【0071】

配列番号4：Der p 1-A L Kのヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列

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 CTT 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 ATT 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 ATT GCC GTC ATT 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

【0072】

図35は、Ex Pa Sy分子生物学サーバー (<http://www.expasy.ch/>) において、配列番号4に示すDer p 1-A L Kアミノ酸配列を入力配列として用いたB L A S T検索にC l u s t a l Wアルゴリズムを用いて行った配列アラインメントを示す。このアラインメントは、イエダニ種すなわちDer p 1、Der f 1及びEur m 1由来の配列を含む。図35において、Der p 1-A L Kタンパク質配列における同じ位置のアミノ酸と同一であるアミノ酸残基を、灰色背景上に黒色の文字を用いて強調する。同一でないアミノ酸は白色背景上に黒色で印刷する。

表面構造像

イエダニグループ1アレルゲンを表すアミノ酸配列はある程度類似しており、分子表面の幾らかは保存されている（灰色に着色したゾーン）（図36を参照）。図36は、Der p 1-A L Kタンパク質配列をDer p 1分子構造モデルに重ね合わせた際の、四つの異なる角度から見た表面輪郭を示す。

全体表面にわたり25～30 Åの距離範囲内に空間的に分布する保存され高く溶媒露出されたアミノ酸を、変異のために選択する。以下の節で、次の情報を与える：変異のために適切であると考えられるアミノ酸のリスト（A）、設計された変異体のリスト（B）及び前記設計された変異体を表すDNA配列（C）。図37は、一例として変異体番号11の表面輪郭を示す。灰色は、保存されたアミノ酸残基を示す。黒色は、変異のために選択されたアミノ酸残基を示す。

10

【0073】A. 変異のために選択されたアミノ酸のリスト

E 1 3, P 2 4, R 2 0, Y 5 0, S 6 7, R 7 8, R 9 9, Q 1 0 9, R 1 2 8, R 1 5 6, R 1 6 1, P 1 6 7, W 1 9 2

B. 設計された変異体のリスト

変異体1：

P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 Q, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

変異体2：

P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 E, R 1 5 6 E, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T 20

変異体3：

R 2 0 E, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 Q, R 1 5 6 E, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

変異体4：

R 2 0 Q, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T

変異体5：

P 2 4 T, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T

変異体6：

R 2 0 E, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

変異体7：

R 2 0 Q, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 Q, R 1 5 6 E, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T 30

変異体8：

E 1 3 S, P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 Q, Q 1 0 9 D, R 1 2 8 E,
R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

変異体9：

E 1 3 S, P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 E, Q 1 0 9 D, R 1 2 8 Q,
R 1 5 6 E, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T

変異体10：

E 1 3 S, P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 Q, Q 1 0 9 D, R 1 2 8 E,
R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T, W 1 9 2 F

変異体11：

E 1 3 S, P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 E, Q 1 0 9 D, R 1 2 8 Q,
R 1 5 6 E, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T, W 1 9 2 F

40

【0074】C. 変異体のヌクレオチド配列

変異体1：

P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 Q, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

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

10

【0075】

変異体2：

P 2 4 T, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 E, R 1 5 6 E, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T

20

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

30

【0076】

変異体3：

R 2 0 E, Y 5 0 V, R 7 8 Q, R 9 9 Q, R 1 5 6 E, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

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 666

10

【0077】

変異体4：

R 2 0 Q, Y 5 0 V, R 7 8 E, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T 20

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 666

30

【0078】

変異体5：

P 2 4 T, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 Q, P 1 6 7 T

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 666

10

【0079】

変異体6：

R 2 0 E, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 E, R 1 5 6 Q, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

20

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 666

30

【0080】

変異体7：

R 2 0 Q, Y 5 0 V, S 6 7 N, R 9 9 Q, R 1 5 6 E, R 1 6 1 E, P 1 6 7 T

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 666

10

【0081】

変異体8：

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

20

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 666

30

【0082】

変異体9：

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, 40
 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 666

10

【0083】

変異体10:

E13S, P24T, Y50V, R78E, R99Q, Q109D, R128E, 20
 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 666

30

【0084】

変異体11:

E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, 40
 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 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 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 666

10

【0085】

実施例 8

特異的アレルギーワクチン接種のための改良された安全性を有する変異組換え草本アレル
ゲン (Phl p 5)

20

この実施例において、草本花粉アレルゲンにおける本発明の概念の応用を一つのアレルゲン、Phl p 5によって例証する。他の草本花粉アレルゲンの操作は、同等な手順によって行うことができる。

変異組換え Phl p 5 分子の設計

配列番号 5 は、野生型イソフォームである Phl p 5. 0103 クローンのヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列を示す。

配列番号 5 : Phl p 5. 0103 のヌクレオチド配列及び導き出されたアミノ酸配列


```

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcggcgtacacccccgcc 60
A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A 20
acccccccgccccggcggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
T P A A P A G A E P A G K A T T E E Q K 40
ctgatcgagaagatcaacgcccggcttcaaggcggccttggccgctgcccggcgctcccg 180
L I E K I N A G F K A A L A A A A G V P 60
ccagcggacaagtacaggagcttcgtcgcaaccttcggcggcctccaacaaggccttc 240
P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F 80
gcggaggccctctcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctc 300
A E G L S G E P K G A A E S S S K A A L 100
acctccaagctcgacgccctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgcct 360
T S K L D A A Y K L A Y K T A E G A T P 120
gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcatcatcgccggc 420
E A K Y D A Y V A T V S E A L R I I A G 140
accctcgaggctccacgccgtcaagcccgccgagggaggtcaaggctatccccgccggc 480
T L E V H A V K P A A E E V K V I P A G 160
gagctgcaggctcatcgagaaggctcgacgccgcttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
E L Q V I E K V D A A F K V A A T A A N 180
gccgcccccccaacgacaagttaccgcttcgaggccgcttcaacgacgccatcaag 600
A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K 200
gcgagcacggcgccgcttacgagagctacaagttatccccgcccctggaggccgcgctc 660
A S T G G A Y E S Y K F I P A L E A A V 220
aagcaggcctacgccgccaccgctcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag 720
K Q A Y A A T V A T A P E V K Y T V F E 240
accgcactgaaaaaggccatcaccgcatgttcggaagcacagaaggctgccaaagccgcc 780
T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A 260
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcccgttggcggccaccggcgccgccaccgcc 840
A A A T A T A T A A V G A A T G A A T A 280
gctactgggtggctacaaagtc 861

```

10

20

30

40

50

A T G G Y K V

【0086】

図38は、ExPasy分子生物学サーバー (<http://www.expasy.ch/>) において、配列番号5に示すPhlp5.0103のアミノ酸配列を入力配列として用いたBLAST検索にClustalWアルゴリズムを用いて行われた配列アラインメントを示す。このアラインメントは、草本種すなわちPhlp5、Poap5、Lolp5、Hol15、Phaa5、Horv9及びHorv5由来のグループ5アレルゲン配列を含む。図38において、Phlp5.0103タンパク質配列における同じ位置のアミノ酸と同一であるアミノ酸残基を、灰色背景上に黒色の文字を用いて強調する。同一でないアミノ酸は、白色背景上に黒色で印刷する。

表面構造像

草本花粉グループ5アレルゲンを表すアミノ酸配列はある程度類似しており、分子表面の幾らかは保存されている（灰色に着色したゾーン）（図39を参照）。図39は、Phlp5.0103タンパク質配列をPhlp5分子構造モデルに重ね合わせた際の、四つの異なる角度から見た表面輪郭を示す。この構造モデルは二分割した形で分子を含み、モデルA（アミノ酸34～142）を図39Aに示し、モデルB（アミノ酸149～259）を図39Bに示す。

全体表面にわたり25～30Åの距離範囲内に空間的に分布する高く溶媒露出されたアミノ酸を、変異のために選択する。以下の節において、次の情報を与える：変異のために適切であると考えられるアミノ酸のリスト（A）、設計された変異体のリスト（B）及び前記設計された変異体を表すDNA配列（C）。図40A及びBはそれぞれ、一例として変

異体番号1のモデルA及びモデルBの表面輪郭を示す。灰色は、保存されたアミノ酸残基を示す。黒色は、変異のために選択されたアミノ酸残基を示す。

【0087】

A. 変異のために選択されたアミノ酸のリスト

I 4 5, R 6 6, E 1 3 3, R 1 3 6, I 1 3 7, D 1 8 6, F 1 8 8, K 2 1 1, P 2 1 4, Q 2 2 2, P 2 3 2, L 2 4 3, Q 2 5 4

B. 設計された変異体のリスト

変異体1:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体2:

R 6 6 N, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体3:

I 4 5 K, R 1 3 6 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体4:

I 4 5 K, I 1 3 7 K, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体5:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, D 1 8 6 H, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体6:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, Q 2 2 2 K, P 2 3 2 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体7:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, P 2 1 4 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体8:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, K 2 1 1 N, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体9:

R 6 6 N, R 1 3 6 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体10:

R 6 6 N, I 1 3 7 K, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体11:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, D 1 8 6 H, P 2 1 4 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体12:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, D 1 8 6 H, K 2 1 1 N, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体13:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, P 2 1 4 G, P 2 3 2 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

変異体14:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, K 2 1 1 N, P 2 3 2 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

【0088】

C. 変異体のヌクレオチド配列

変異体1:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

10

20

30

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacacccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcggtcccg 180
 ccaggcgacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggccttcggcgagcccaaggcgcccgccgaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggcccttacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccggcgaggaggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccggcccaac 540
 gccgccccccccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcttc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccggcgccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccggc 780
 gccgctgccaccggccaccgaaccggcgccgttggcgcgccaccggcgccgaccggc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

【0089】

変異体 2 :

R 6 6 N, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacacccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagatcaacggcgcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcggtcccg 180
 ccaggcgacaagtacAACaggttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggccttcggcgagcccaaggcgcccgccgaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggcccttacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccggcgaggaggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccggcccaac 540
 gccgccccccccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcttc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccggcgccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccggc 780
 gccgctgccaccggccaccgaaccggcgccgttggcgcgccaccggcgccgaccggc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

20

30

【0090】

変異体 3 :

I 4 5 K, R 1 3 6 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacacccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctcccg 180
 ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgtc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcgaggcgctcAGCaticgcccggc 420
 accctcgaggctcacgccgtcaagcccgccgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtatcgagaaggctcgacgcccttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
 gccgccccgcccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcccgtc 660
 aagAAAgcttacgccgccaccgtcgccaccgcccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcacgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

【0091】

変異体4：

I 4 5 K, I 1 3 7 K, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacacccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctcccg 180
 ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgtc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcAAAatcgcccggc 420
 accctcgaggctcacgccgtcaagcccgccgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtatcgagaaggctcgacgcccttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
 gccgccccgcccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcccgtc 660
 aagAAAgcttacgccgccaccgtcgccaccgcccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcacgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

20

30

【0092】

変異体5：

I 4 5 K, E 1 3 3 S, D 1 8 6 H, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 acccccgccggccggcgagcgagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccagcgacaaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggccctacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccgagggaggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccgcccgaac 540
 gccgcccccgccaacCATaagttaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcttc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccgcccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgcccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgcccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

【0093】

変異体 6 :

I 4 5 K, E 1 3 3 S, Q 2 2 2 K, P 2 3 2 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K
 gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 acccccgccggccggcgagcgagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccagcgacaaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggccctacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccgagggaggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccgcccgaac 540
 gccgcccccgccaacgacaagttaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttggaggccgcttc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccgcccGGCgaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgcccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgcccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

20

30

【0094】

変異体 7 :

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, P 2 1 4 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 acccccgccggccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccaggcgacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggccctacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gaggctcagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccgcccac 540
 gccgcccccgccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatcGGCgcccggaggccgcttc 660
 aagcaggcttacggccaccgtcgccaccgcccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgcccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgcccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

【0095】

変異体 8 :

I 4 5 K, E 1 3 3 S, F 1 8 8 I, K 2 1 1 N, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 acccccgccggccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccaggcgacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggccctacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgccgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gaggctcagggtcatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccgcccac 540
 gccgcccccgccaacgacaagATTacgcttctgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacAACttatccccgcccggaggccgcttc 660
 aagcaggcttacggccaccgtcgccaccgcccggaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgcccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgcccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

20

30

【0096】

変異体 9 :

R 6 6 N, R 1 3 6 S, F 1 8 8 I, Q 2 2 2 K, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagatcaacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccaggcgacaagtacAACacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggcccttacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcgaggcgctcAGCaticgcccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgggcgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgaggctatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccggcccaac 540
 gccgcccccgccaacgacaagATTacgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttgaggccgcccgtc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccggcgaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccggc 780
 gccgctgccaccggccaccgaaccggcgccgttggcgcgccaccggcgccgaccggc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

【0097】

変異体10:

R66N, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
 accccccggccccggcgaggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagatcaacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcgctccg 180
 ccaggcgacaagtacAACacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggccgcttc 300
 acctccaagctcgacggcccttacaagctcgcttacaagacagccgaggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcAAAatcgcccggc 420
 accctcgaggctcacggctcaagcccgggcgaggaggtaaggctatccccggcgcc 480
 gagctgaggctatcgagaaggctcgacggcccttcaaggctcgctgccaccggcccaac 540
 gccgcccccgccaacgacaagATTacgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatccccgcttgaggccgcccgtc 660
 aagAAAgcctacggcgccaccgtcgccaccggcgaggtaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccggc 780
 gccgctgccaccggccaccgaaccggcgccgttggcgcgccaccggcgccgaccggc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

20

30

【0098】

変異体11:

I45K, E133S, D186H, P214G, L243E, Q254K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
 accccccggccccggccggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcggtcccg 180
 ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgtc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggtcacgccgtcaagcccgccggcggagggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gaggctcagggtcatcgagaaggctcgacgccgcttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
 gccgccccgcccaacCATaagttaccgcttcgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatcGGCgcccggaggccgcccgtc 660
 aagcaggcctacgccgccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

10

20

30

50

【0099】

変異体12:

I45K, E133S, D186H, K211N, L243E, Q254K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
 accccccggccccggccggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcggtcccg 180
 ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgtc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggtcacgccgtcaagcccgccggcggagggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gaggctcagggtcatcgagaaggctcgacgccgcttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
 gccgccccgcccaacCATaagttaccgcttcgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacAACttatccccgcccggaggccgcccgtc 660
 aagcaggcctacgccgccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
 gctactgggtggctacaaagtc 861

【0100】

変異体13:

I45K, E133S, P214G, P232G, L243E, Q254K

gccgaticgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
 accccccggccccggccggagcggagccagcaggtaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
 ctgaticgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgcccggcggtcccg 180
 ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
 gcgaggggcccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggccgcgtc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgcttacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcttacgtcgccaccgtaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggtcacgccgtcaagcccgccggcggagggtcaaggctatccccggcgcc 480
 gaggctcagggtcatcgagaaggctcgacgccgcttcaaggctcgctgccaccgccccaac 540
 gccgccccgcccaacgacaagttaccgcttcgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccgttacgagagctacaagttcatcGGCgcccggaggccgcccgtc 660
 aagcaggcctacgccgccaccgtcgccaccgcccGGCgagggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgccaatgtccgaagcaAAAaggctgccaaagccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840

【0101】

変異体14:

I 4 5 K, E 1 3 3 S, K 2 1 1 N, P 2 3 2 G, L 2 4 3 E, Q 2 5 4 K

gccgatctcgggttacggccccccacccagctgccccggcgccggctacacccccgcc 60
 accccccccgccccggcgagcggagccagcaggtaaggcgacgaccaggagcagaag 120
 ctgatcgagaagAAAacgccggcttcaaggcgcccttggccgctgccggcgctcccg 180
 ccaggcgacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccccaacaaggccttc 240
 gcggaggcccttcggcgagcccaaggcgccgccgaatccagctccaaggcgcgctc 300
 acctccaagctcgacgcccttacaagctcgccacaagacagccgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggctccagccgtcaagcccgccggcgaggaggtcaaggtcatcccccgccg 480
 gagctgcaggctcatcgagaaggctcgacgcgcttcaaggctgctgccaccgccgccaac 540
 gccgcccccccaacgacaagttcacgcttctgaggccgcttcaacgacgccaatcaag 600
 gcgagcacggcgccctacgagagctacAACttatccccgcccctggaggccgctc 660
 aagcaggccctacgccccaccgtcgccaccgCGGcagggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaggccatcaccgcatgtccgaagcaAAAaggctgccaagcccgcc 780
 gccgctgccaccgccaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
 gctactgggtgctacaaagtc 861

10

【0102】

実施例9

20

組換えBet v 1及び変異体Bet v 1のT細胞反応性

目的:

変異アレルゲンに対する *in vitro* のT細胞応答を、増殖及びサイトカイン産生に関して調査すること。

方法:

アレルギー患者由来のPBL（末梢血リンパ球）を以下の調査に用いた。

既刊のプロトコル（26）に記述されるように、T細胞に提示されるbet v 1イソフォームの多様性を維持する目的で、PBL及び天然な精製bet v 1から八つのbet v 1特異的T細胞株を樹立した。

十のPBL及び八つのT細胞株を、カバノキ抽出物（Bet v）、天然な精製bet v 1（nBet v 1）、組換えBet v 1（rBet v 1又はwt；27）及びrBet v 1の四つの異なる変異型（他の箇所に記述する）：2595、2628、2637、2744、2773で刺激した。2637変異体は部分的に折り畳まれないことが後に見出され、以後議論しないことにする。

30

簡単に言うと：丸底の96ウェルプレートに、PBLを1ウェルあたり 2×10^5 加えた。異なるカバノキサンプルを3つの異なる濃度で四つ組で加え、6日間増殖させた。6日目に、最も高濃度のカバノキを加えた各ウェルから、半分の体積（100 μ l）の細胞をサイトカイン産生のために収集した。放射性標識したチミジンを前記ウェルに加えた。翌日（7日目）、この細胞をフィルター上に収集した。シンチレーション液をフィルターに加え、シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

40

同様に丸底の96ウェルプレートにT細胞を1ウェルあたり 3×10^4 加え、照射した自家PBL（ 1×10^5 細胞数/ウェル）及び、異なるカバノキサンプルの3つの異なる濃度で刺激した。1日後、最も高濃度のカバノキを加えた各ウェルから、サイトカイン産生のために細胞を収集した。放射性標識したチミジンを前記ウェルに加えた。2日後、細胞をフィルター上に収集し、PBLに対して記述したようにカウントした。

四つ組のプレートから上清をプールし、Becton Dickinsonから入手したCBA（サイトカインビーズアレイ）キットを用いてサイトカインを測定した。

【0103】

結果:

十のPBL培養物は、カバノキに対し特異的な刺激を示した。一般的に、異なるカバノキ

50

サンプルに対する P B L の増殖は類似していたが、多様性が見られた。3 つの P B L において、n B e t v 1 が r B e t v 1 及びこの変異体よりも増殖をより刺激した。前記変異体カバノキサンプルは r B e t v 1 とほぼ同じに P B L を刺激した (図 4 1)。図 4 1 は、上述の B e t v 1 調製品に対する刺激指数を示す。刺激指数 (S I) は、刺激されたサンプル (最も高濃度) の増殖 (c p m: 1 分あたりのカウント) をコントロールである培地の増殖 (c p m) で割って計算する。P P D は、ポジティブコントロールとして役立つミコバクテリウム結核菌由来の精製タンパク質を指し示す。

サイトカイン産生は I F N- γ によって支配され、P B L 増殖に比例して増加した。T h 1 / T h 2 シフトの徴候は現れなかった (図 4 2 ~ 4 4)。図 4 2 は、T h 0 プロフィールを有する患者を示し、図 4 3 は T h 1 プロフィール、図 4 4 は T h 2 プロフィールを有する患者を示す。サイトカイン産生は p g / m l で測定してバーとして表示し、I L-5 / I F N- γ 間の比は下方の点線である (右側の Y 軸)。増殖を c p m で測定し、右側の Y 軸において c p m で測定した実線として示す。培地及び M B P (マルトース結合タンパク質) をバックグラウンドコントロールとして含む。

n B e t v 1 に対して八つの T 細胞株が樹立され、一つを除き、その全てが全カバノキサンプルに対し等しく十分に増殖した。四つの T 細胞株は、I L-5 及び I F N- γ 比に基づけば (T h 2 > 5、5 > T h 0 > 0.2、0.2 > T h 1) T h 0 様サイトカインを分泌していた。三つの T 細胞株は T h 1 サイトカインを分泌しており、一つの T 細胞株は T h 2 サイトカインを分泌していた。I L-5 / I F N- γ 比は、カバノキサンプルの違いによって影響されなかった。

結論:

n B e t v 1 に対して特異的興奮を示した全 P B L 培養物及び 7 / 8 の T 細胞株は、r B e t v 1 及びその変異体に対しても応答した。これらのデータは、T 細胞刺激に関して B e t v 1 の一つのイソフォーム又はその 4 つの変異体が、天然アレルゲン調製品に見出される個々のイソフォームの混合物を代用できることを示唆する。このように組換えアレルゲン又はその 4 つの変異体に基づくワクチンが、既存の B e t v 1 特異的 T 細胞集団に対処するであろう。

【0104】

実施例 10

組換え体及び変異体 B e t v 1 タンパク質を用いた免疫に続く B e t v 1 特異的 I g G 抗体及び遮断抗体の誘導:

この節において「遮断抗体」という用語は、ヒト I g E 抗体と異なり、抗原に結合可能であって抗原に対するヒト I g E 抗体の結合を妨害することができる抗体を定義する。

組換え B e t v 1 2227 野生型タンパク質 (r B e t v 1) 及び B e t v 1 2595、2628、2744 及び 2773 変異体タンパク質が B e t v 1 特異的 I g G 抗体及び遮断抗体を誘導する能力を、マウスでの免疫実験において試験した。

B A L B / c A マウス (各群 8 匹ずつ) を、腹腔注射によって組換え B e t v 1 2227 野生型タンパク質又は四つの変異体タンパク質で免疫した。このマウスを、14 日間の間隔で 1 用量を四回免疫した。前記異なるタンパク質を、1.25 mg / m l アルヒドロゲル (A l h y d r o g e l) (水酸化アルミニウムゲル、1.3% pH 8.0 ~ 8.4、S u p e r f o s B i o s e c t o r) と複合化させた。前記マウスを、1 μ g タンパク質 / 1 用量又は 10 μ g タンパク質 / 1 用量のいずれかで免疫した。血液サンプルは、0、14、35、21、49 及び 63 日目に眼窩採血によって採取した。

特異的 I g G 抗体レベルを、r B e t v 1 でコートしたマイクロタイタープレート及び検出抗体としてのビオチン化ウサギ抗マウス I g G 抗体 (J a c k s o n) を用いた直接的 E L I S A によって分析した。組換え B e t v 1 2227 野生型タンパク質又はその四つの変異体タンパク質を用いた免疫は、強い r B e t v 1 特異的 I g G 応答を誘導した。この知見は、前記四つの変異タンパク質が B e t v 1 2227 野生型タンパク質に対して高く交差反応性である抗体を誘導することが可能であることを実証する。

【0105】

10

20

30

40

50

遮断抗体の誘導を評価するため、カバノキ花粉アレルギー患者由来の血清サンプルをモノクローナルマウス抗ヒトIgE抗体でコートした常磁性ビーズと共にインキュベートした。インキュベーション後、このビーズを洗滌し、緩衝液中、又は、免疫していないマウス（コントロール）若しくは上述のように免疫したマウス由来のマウス血清の希釈サンプル（1：100）中に再懸濁させた。それから、このビーズ及びマウス血清抗体の混合物にビオチン化rBet v 1を加えた。インキュベーション後、このビーズを洗滌し、アクリジニウム標識ストレプトアビジンを用いて結合したビオチン化rBet v 1を検出した。免疫していないマウス由来の血清とビーズのインキュベーションは、ビーズに対するrBet v 1の結合性を変化させなかった。反対に、組換えBet v 1 2227野生型タンパク質又はその四つの変異体タンパク質で免疫したマウス由来の血清とビーズのインキュベーションは、ビーズに対するBet v 1の結合性を著しく減少させ、血清サンプル中のBet v 1特異的遮断抗体の存在を実証する。このように、63日目には全高用量（10 µg / 1用量）免疫群由来の一つ以上の血清サンプルが、ビーズに対するrBet v 1の結合性を80%より大きく減少させることができた。これらの知見は、前記四つの変異タンパク質がBet v 1特異的遮断抗体として作用可能な抗体を誘導することが可能であることを実証する。

10

【0106】

（参考文献）

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) 10
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). 20
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). 30
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). 40

8. Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon 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, Bannon 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

10. Ferreira F, Rohlfis 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).

20

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 hypoallergenic variants for immunotherapy", *FASEB Journal for Experimental Biology* Vol. 12, No. 2, February 1998, 231-242 (1998).

12. Wiedemann 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).

30

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

40

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, Løwnstein 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).

10

20

30

40

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, Struct Func Genet 26, 358-360 (1996b).

10

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).

20

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.

30

26. P.A. Würtzen, M. Wissenbach, H. Ipsen, A. Bufe, J. Arned, 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.

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

変異体番号 1 の Bet v 1 に対して用いた変異体特異的オリゴヌクレオチドプライマーを示す。変異させたヌクレオチドは下線を引いてある。

【図 2】

合成し、全ての変異体に対して用いた二つの一般的に適用可能なプライマー（「全センス」及び「全非センス」と表示）を示す。

【図 3】

50

天然に存在するアレルゲン *Bet v 1* の DNA および アミノ酸配列、及び、*Bet v 1* 変異の番号を示す。

【図 4】

非ビオチン化 *Bet v 1* 及び *Bet v 1 Glu 45 Ser* 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Bet v 1* の結合の阻害を示す。

【図 5】

非ビオチン化 *Bet v 1* 及び *Bet v 1* 変異体 *Asn 28 Thr + Lys 32 Gln* による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Bet v 1* の結合の阻害を示す。

10

【図 6】

非ビオチン化 *Bet v 1* 及び *Bet v 1 Pro 108 Gly* 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Bet v 1* の結合の阻害を示す。

【図 7】

非ビオチン化 *Bet v 1* 及び *Bet v 1 Glu 60 Ser* 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Bet v 1* の結合の阻害を示す。

【図 8】

ほぼ等しい濃度で記録された、組換え変異体及び三つのパッチ変異体の CD スペクトルを示す。

20

【図 9】

非ビオチン化 *Bet v 1* 及び *Bet v 1* 三つのパッチ変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Bet v 1* の結合の阻害を示す。

【図 10】

個々に整列させた抗原 5 の残基の溶媒接触性及びベスプラ抗原 5 配列アラインメントを示す（左パネル）。図 10 の右パネルは、ベスプラ抗原 5 : s の中で保存された面積の抗原 5 の分子表面を示す。

【図 11】

センス鎖に由来する *Ves v 5* のアミノ末端に対応するプライマー配列を示す。
下流プライマー配列は非センス鎖に由来する。

30

【図 12】

合成し、全変異体に対して用いた二つの一般的に適用可能なプライマー（「全センス」及び「全非センス」と表示）を表す。

【図 13】

天然に存在するアレルゲン *Ves v 5* 及び二つの *Ves v 5* 変異体の DNA 及びアミノ酸配列を示す。

【図 14】

非ビオチン化 *Ves v 5* 及び *Ves v 5 Lys 72 Ala* 変異体による、アレルギー患者のプール由来の血清 *IgE* に対するビオチン化組換え *Ves v 5* の結合の阻害を示す。

40

【図 15】

IgE 架橋結合によるアレルゲン及び肥満細胞間の反応の理論的モデルを示す。

【図 16】

天然に存在するアレルゲン *Der p 2* の DNA 及びアミノ酸配列を示す。

【図 17】

変異体を作製するために用いたプライマーを模式的に示す。（I）はセンス及びアンチセンスプライマーを示す。（II）は、指示した位置に変異を含む最終的な組換えタンパク質を示す。

【図 18】

50

B e t v 1 変異体の構築の説明図、及び、用いたプライマーの一覧表を示す。変異体は5～9のアミノ酸を含む。

【図19】

B e t v 1 (2628) 及び B e t v 1 (2637) の表面に導入された点変異を示す。B e t v 1 (2628) 変異体では五つの第一変異が B e t v 1 の半分を導入され、残り半分は変わらないままであった。B e t v 1 (2637) 変異体では、五つの第一変異及び三つの第二変異が前記残り半分に導入され、前記半分は変わらないままであった。

【図20】

ほぼ同一の濃度で記録された、組換え B e t v 1 . 2801 (野生型) 及び B e t v 1 (2637) 変異体の円二色性 (CD) スペクトルを示す。 10

【図21】

非ビオチン化 B e t v 1 . 2801 及び B e t v 1 (2628)、B e t v 1 (2637)、及び、1:1 混合比の B e t v 1 (2628) 及び B e t v 1 (2637) による、アレルギー患者のプール由来の血清 I g E に対するビオチン化組換え B e t v 1 . 2801 (野生型) の結合の阻害を示す。

【図22】

B e t v 1 . 2801 (野生型)、B e t v 1 (2628) 及び B e t v 1 (2637) のヒト好塩基球細胞でのヒスタミン放出を示す。

【図23】

B e t v 1 . 2801 (野生型)、B e t v 1 (2628) 及び B e t v 1 (2637) のヒト好塩基球細胞でのヒスタミン放出を示す。 20

【図24】

B e t v 1 (2744) の表面での点変異を示す。

【図25】

B e t v 1 (2753) の表面での点変異を示す。

【図26】

B e t v 1 (2744) 及び B e t v 1 (2753) の表面での点変異を示す。

【図27】

ほぼ等しい濃度で記録された B e t v 1 (2744) (野生型) 及び B e t v 1 (2744) の円二色性 (CD) スペクトルを示す。 30

【図28】

B e t v 1 . 2801 (野生型) 及び変異体 B e t v 1 (2744) のヒト好塩基球細胞でのヒスタミン放出を示す。

【図29】

図29A～Dは、B e t v 1 . 2801 (野生型) 及び変異体 B e t v 1 (2744) のヒト好塩基球細胞でのヒスタミン放出を示す。

【図30】

B e t v 1 (2733) の表面での点変異を示す。

【図31】

D e r p 2 の部位特異的変異誘発のために用いたプライマーを示す。 40

【図32】

他のグループ2のイエダニアレルゲンと共に D e r p 2 の配列一覧表を示す。

【図33】

四つの異なる角度からの D e r p 2 の表面輪郭を示す。

【図34】

四つの異なる角度からの D e r p 2 変異体の表面輪郭を示す。

【図35】

図35A及びBは、他のグループ1のイエダニアレルゲンと共に D e r p 1 の配列一覧表を示す。

【図 36】

四つの異なる角度からの Der p 1 の表面輪郭を示す。

【図 37】

四つの異なる角度からの Der p 1 変異体の表面輪郭を示す。

【図 38】

図 38 A～D は、他のグループ 5 の草本アレルゲンと共に Phl p 5 の配列一覧表を示す。

【図 39】

図 39 A 及び B はそれぞれ、Phl p 5 モデル A 及びモデル B の四つの異なる角度からの表面輪郭を示す。

【図 40】

図 40 A 及び B はそれぞれ、Phl p 5 変異体モデル A 及びモデル B の四つの異なる角度からの表面輪郭を示す。

【図 41】

種々の Bet v 1 調製品に対する刺激指標 (S I) として表された末梢血リンパ球の増殖を示す。

【図 42】

種々の Bet v 1 調製品で刺激された Th 0 プロフィールを有する患者の T 細胞のサイトカイン特性を示す。

【図 43】

種々の Bet v 1 調製品で刺激された Th 1 プロフィールを有する患者の T 細胞のサイトカイン特性を示す。

【図 44】

種々の Bet v 1 調製品で刺激された Th 2 プロフィールを有する患者の T 細胞のサイトカイン特性を示す。

【図 1】

Fig. 1

変異体番号 1 に対して用いた変異特異的オリゴヌクレオチドプライマー。
変異させたヌクレオチドに下線を引いた。

Bet v 1 センス	5'- AATATGAGACTGAGACCCCTCTGTTATCCGACGAGCTCG -3'
Bet v 1 非センス	3'- TTAATACCTGACTCTGGTGGAGACAATAAGGTCGTCGASC -5'
センスプライマー	5'- TGAGACCCCTCTGTTATCCGAG -3'
非センスプライマー	3'- ATACTCTGACTCTGGGAGAGACA -5'

【図 2】

Fig. 2

Bet v 1 (No.2801) の部位特異的変異誘発のためのオリゴヌクレオチドプライマー

全センス	1: 183Bv, 15-mer 5'-GTGCCAAGATCAG
1 センス	2: 184Bv, 23-mer 5'-TGAGACCCCTCTGTTATCCGAG
1 非センス	3: 185Bv, 23-mer 5'-ACAGAGGGGCTCTCACTCTCATA
2 センス	4: 186Bv, 31-mer 5'-GATACCCCTCTTCCACAGGTTGCACCCCAAG
2 非センス	5: 187Bv, 31-mer 5'-ACCTGTGAAAGAGGGTATCGCCATCAAGGA
3 センス	6: 188Bv, 23-mer 5'-AACATTTGAGGAAATGGAGGGCC
3 非センス	7: 189Bv, 23-mer 5'-TTTCCTGAAATGTTTCAACACT
4 センス	8: 190Bv, 23-mer 5'-TTAAGAACATCAGCTTTCGGAA
4 非センス	9: 191Bv, 23-mer 5'-AGCTGATGTTCTTAATGGTTCCA
5 センス	10: 192Bv, 23-mer 5'-GGACCATGCAAACTTCAATATACA
5 非センス	11: 193Bv, 23-mer 5'-AGTTTGATGTTGTCACCTCATCA
6 センス	12: 194Bv, 23-mer 5'-TTTCCTCAGGCTCCCTTCAA
6 非センス	13: 195Bv, 23-mer 5'-AGGCTGAGGGAAGCTGATCTT
7 センス	14: 196Bv, 24-mer 5'-TGAAGGATCTGGAGGGCTGGAAAC
7 非センス	15: 197Bv, 24-mer 5'-CCCTCCAGATCCCTTCAATGTTTC
8 センス	16: 198Bv, 24-mer 5'-GGCAACTGCTGATGAGGATCCAT
8 非センス	17: 199Bv, 24-mer 5'-CCATCAGAGTTGCCATATCTTT
全非センス	18: 200Bv, 15-mer 5'-CATGCCATCCGTAAG

【図 3】

Fig. 3

全 Bet v 1 変異の概観

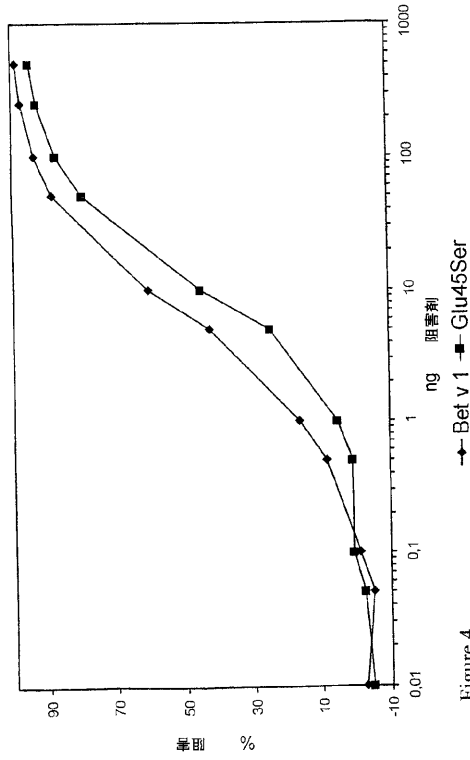
1 (A-C)		
GGTGTTGTTTAAITATGAGACTGAGACCCCTCTGTTATCCGACGAGCTCGACTGTTCAAG	60	
G V F N Y E T E T T-P S V I P A A R L F K	20	
9 (A-G) 2 (A-C) 2 (A-C)		
GCCTTTATCCTTGATGGCGATACTCTCTTCCAAAGTTSCACCCCAAGCCATTAGCAGT	120	
A F I L D-G G D N-T L F P K-Q V A P Q A I S S	40	
3 (GA-TC) 7 (AA-TC) 4 (G-C) 6 (GA-TC)		
GTTGAAACATTGAGGAATGGAGGGGCTGGAACCATTAAGAAATCAGCTTCCCGAA	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)		
GGCCTCCCTTTCAAGTACGTGAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCAACCAACTTCAAA	240	
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K	80	
TACAATTACAGCTGATCGAGGGGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAAGATCTCCAAC		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)		
GAGATAAAGATAGTGGCAACCTTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAGTAC	360	
E I K I V A T P-G D G G S I L K I S N K Y	120	
CACACCAAGGTGACCATGAGGTGAAGGACAGACAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATGGGC		420
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G	140	
GAGACACTTTGAGGGGCTTGAGAGCTACCTCTTGACACACTCCGATGCCCTACAATAA		480
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N	159	

10

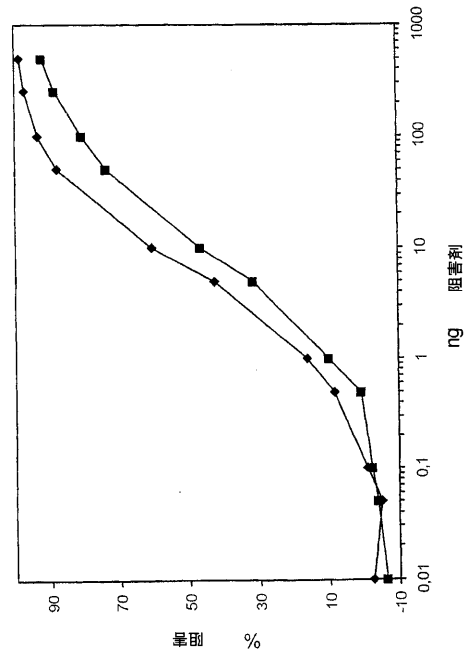
20

ストップ

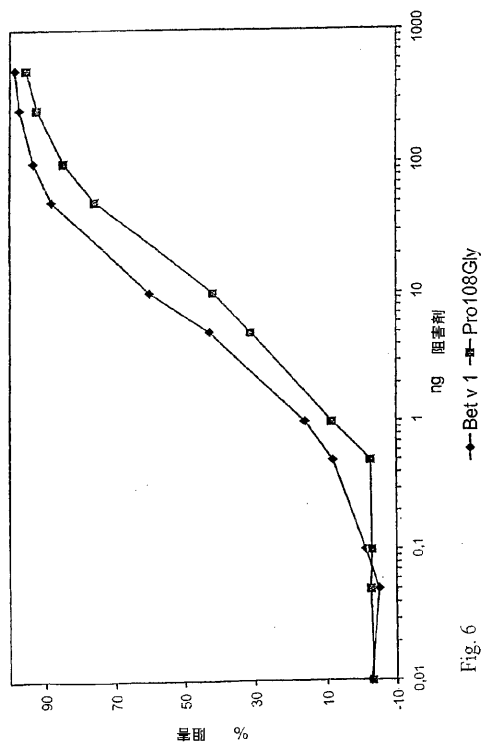
【図 4】



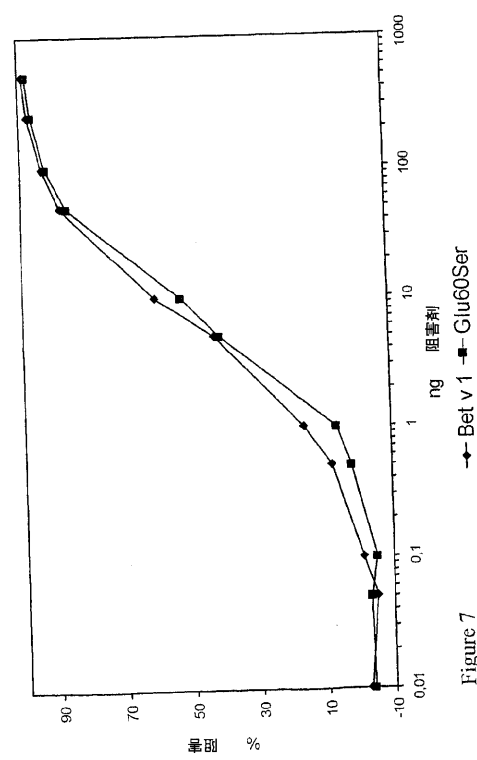
【図 5】



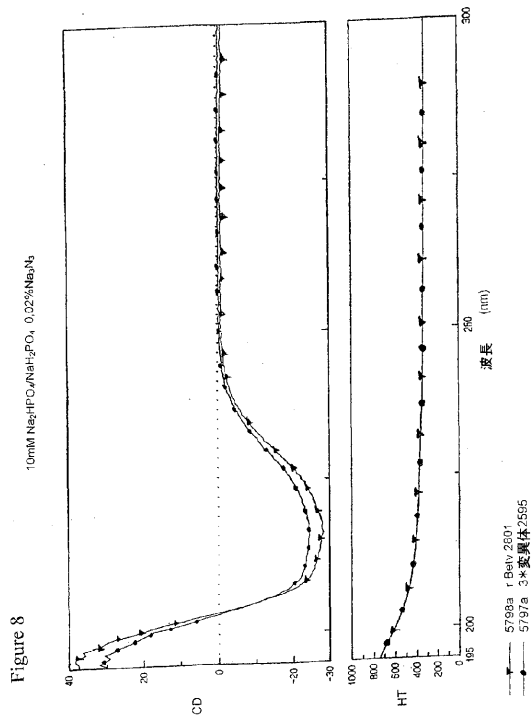
【図 6】



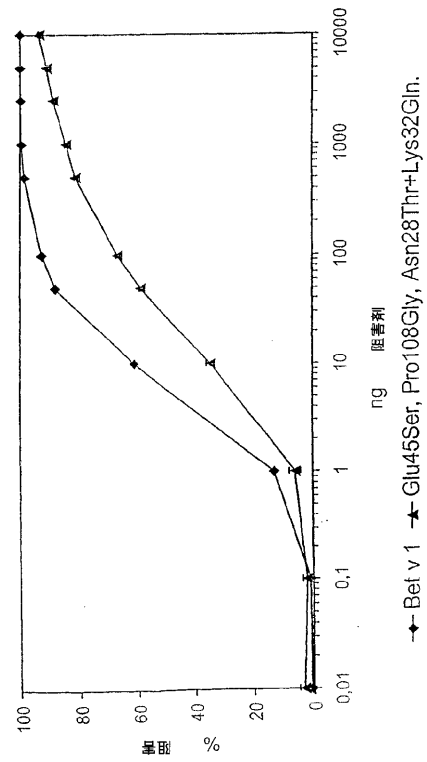
【図 7】



【図 8】



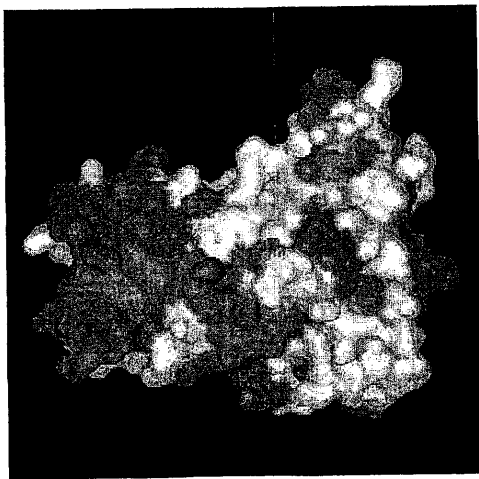
【図 9】



【図 10 - 1】

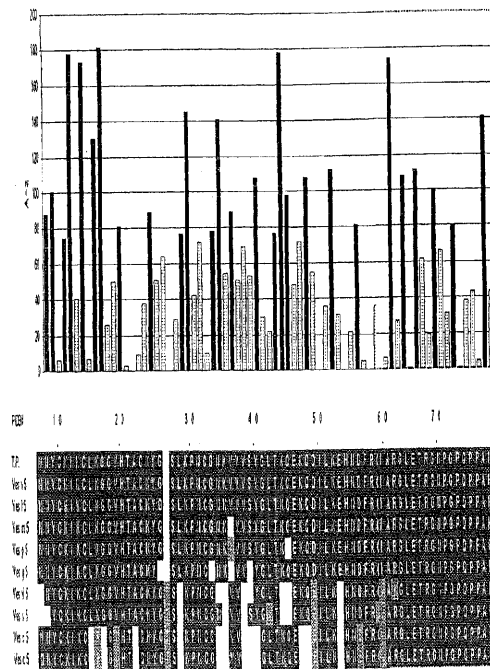
Figure 10

ベスプラ抗原5の中の保存された残基



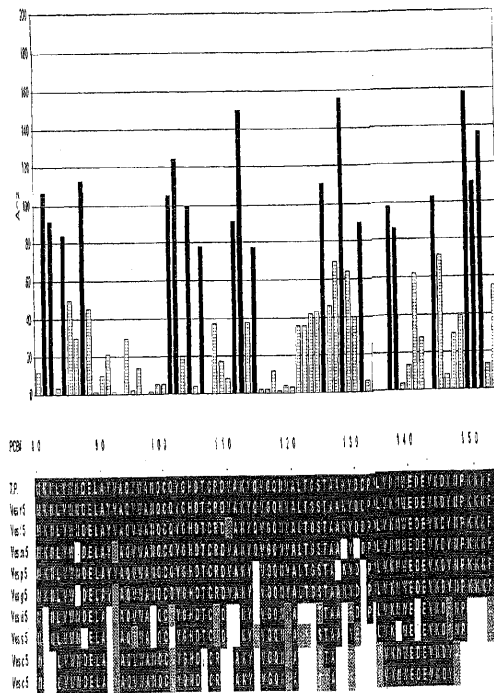
【図 10 - 2】

Figure 10 (続き)



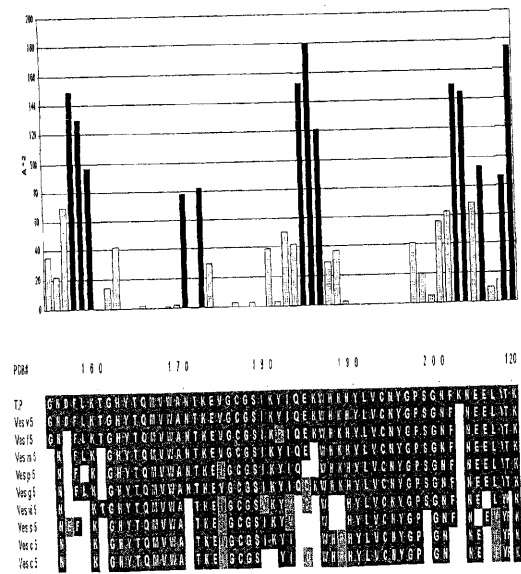
【図 10-3】

Figure 10 (続き)



【図 10-4】

Figure 10 (続き)



【図 11】

Fig. 11

Ves v 5変異体に対して用いた変異特異的オリゴヌクレオチドプライマー。
変異させたヌクレオチドに下線を引いた。

Ves v 5 変異体 1 (K72A)

Ves v 5 センス 5'- ACCACAGCTCCAGCGAAGAAATGAAATTTGGTATGGA -3'
Ves v 5 非センス 3'- TGSTGTGCGAGGTGCGCTTCTTATACCTTTTAAACCATACCT -5'
センスプライマー 5'- CCGCGGCTAATATGAAAAAT -3'
非センスプライマー 3'- GTCCGAGGTGCGCGTTATAC -5'

Ves v 5 変異体 2 (Y96A)

Ves v 5 センス 5'- GGCTAATCAATGTCAATGTGTCAGGAGATG -3'
Ves v 5 非センス 3'- CCGATTAGTTAGATTATACCGATGCTATGAAGTCCCTAC -5'
センスプライマー 5'- TGTCAAGCTGGTCAGGATAC -3'
非センスプライマー 3'- TTAGTTAGAGTTGACAGAGT -5'

【図 12】

Fig. 12

Ves v 5の部位特異的変異誘発のためのオリゴヌクレオチドプライマー

全センス 1: Kxo開始点, 38-mer

5'-CCGCTCGAGAAAGAAACAATTATGTAAATAAATG
L E V R N H Y C A L K
Kex 2 切断部位 Ves v 5のアミノ末端

1 センス 1: K72As 21-mer 5'-CCAGCGGCTAATATGAAAAAT
非センス 2: K72As 21-mer 5'-CATATTAGCGCTGAGGCTG
2 センス 3: Y96As 21-mer 5'-TGTCAAGTGGTCAGGATAC
非センス 4: Y96As 21-mer 5'-GTGACGAGCTTGACATTGATT
全非センス 7: CT-pPIC2αA, 21-mer 5'-ATTCATCAGTGGGAGATAGG

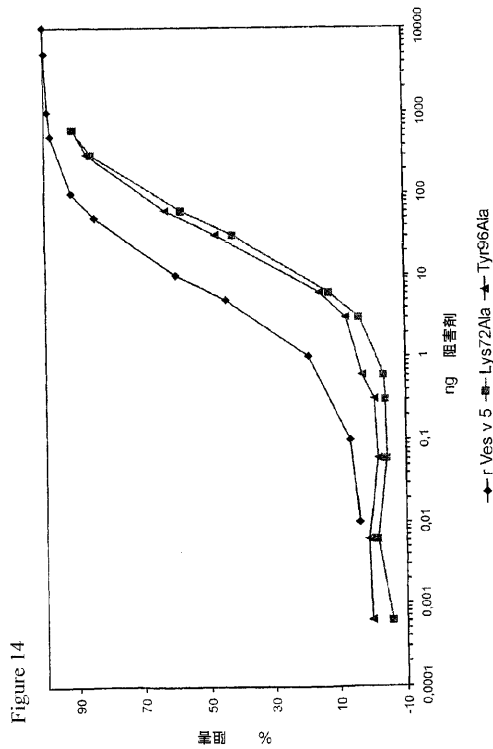
【図 13】

Fig. 13

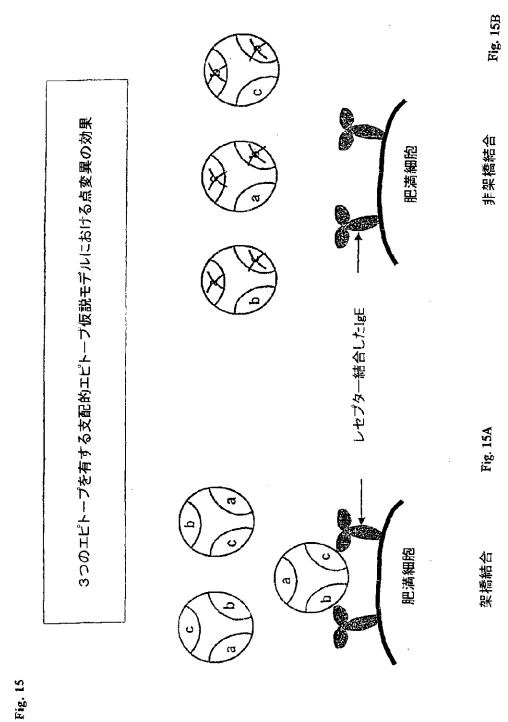
Ves v 5変異の概観

1 AACCAATTATTTAAATAAAATGTTTAAAGGAGGTGCTCACTACTGCTCGCAATATGGA 60
1 N N Y C K I K C L K G G V H T A C K Y G 20
61 AGCTTTAAGCGAATTGCGGTAAAGGTAGTGGTATCTATGCTTACGAAACAAAG 120
21 S L K P N C G N K V V V S Y G L T K Q E 40
121 AAACAAGACATCTTAAGGAGCAATGACTTTAGACAAAATTTGACGAGAGTGGAG 180
41 K Q D I L K E H N D F R Q K I A R G L E 60
181 ACTAGAGGTAACTCTGACACACGCTCCAGCGAGATATGAAATTTGATGGAAC 240
61 T R G N P G E Q E P A K N M K N L V W N 80
241 GACGAGTTAGCTTATGTGCGCAAGTGGGCTAATCAATGTCAATATGCTGAGTACT 300
91 D E L A Y V A Q V W A N Q C Q Y G H D T 100
301 TGCAAGGATAGCAAAATATCAGGTGGACAAACGTAGGCTTAACAGGTAGCAGCGGT 360
101 C R D V A K Y Q V G Q N V A L T G S T A 120
361 GCTAAATACGATGATCCAGTTAACTAGTTAAATGTGGGAAGATGAAGTGAATGATT 420
121 A K Y D D E V K L V K M W E L E V K D Y 140
421 AATCTAAGAAAGATTTTGGGAAGACGCTTTCTGAAAACGGGCAATTACACTCAATG 480
141 N P K K K F S G N D F L K T G H Y T Q M 160
481 GTTGGGCTAACCAAGGAGTGGTGTGGAGTATAAAATACATCAAGAAATGG 540
161 V W A N T K E V S C G S I K Y I Q E K W 180
541 CAGAAACATTACCTTATGTAATATGAGCCAGCGGAACTTAAAGATCAGGAAGTT 600
181 H K H Y L V C N Y G P S G N F K N D E L 200
601 TATCAAAACAAAGTAA 612
201 Y Q T K ストップ 204

【図 14】



【図 15】



【図 16】

Fig. 16

DNA 配列

Der p 2 (アクセッションNo.P49278SWISSPROTの情報を参照したDNA配列)

起源

```

1   cacaaattct ttttttcc ttactactga tcattaatct gaaaacaaaa ccaaacaaac
61  cattcaaaat gatgtaacaa attttgtgtc ttcaattgtt ggtgcagacc gttgctgtg
121 atcaagtcga tgcataagat tggccaatc atgaaatcaa aaaagtgttg gtaccaggat
181 gccatggttc agaaccatgt atcattcatc gggtaaacaa attccaattg gaagccgttt
241 tgaagccaa ccaaacacaa aaacgggcta aaattgaatc caaagccctc atcgatggtt
301 tagaatttga tgttcocggt etogatccaa alcatgcca ttacatgaac tgcacattgg
361 ttaaaggaca acaatatgat attaatata catggaatgt tccgaaatc gccacaaat
421 ctgaaatgt tgtgtcact gttaaagita tgggtgata tgggtgtttg gccgtgcta
481 ttgctactca tgcataaac cgcgatgaac tcaaacaaaa ttattgatt ttglaatac
541 aaatgatgga ttctcttcc aaaaaaaas taataaaat ttgggaatt c

```

アミノ酸配列

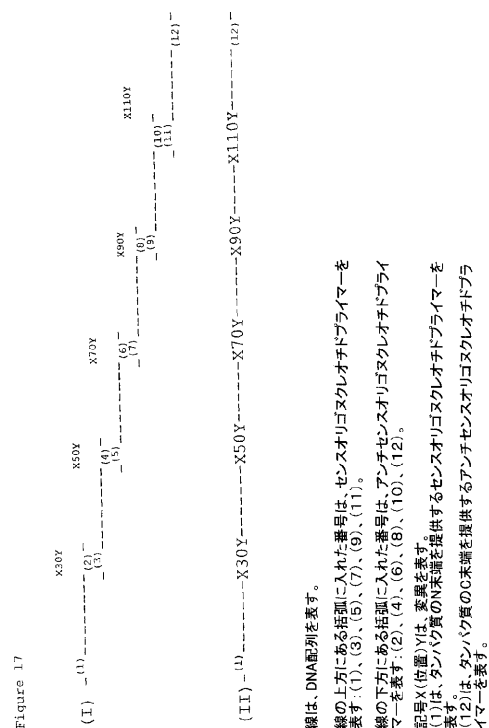
Der p 2 (アクセッションNo.P49278SWISSPROT:シグナルペプチド1-17を含む)

```

1   mmvklclsl lvaavardqv dykdcnhei kvvlypgchg spcllhrkg pfleavfea
61  nqnlktakie ikasidglev dyvgidgnac hymicplvkg qqydkytwv vpklapksen
121 vvvtkvmgd dglvacaia hakird

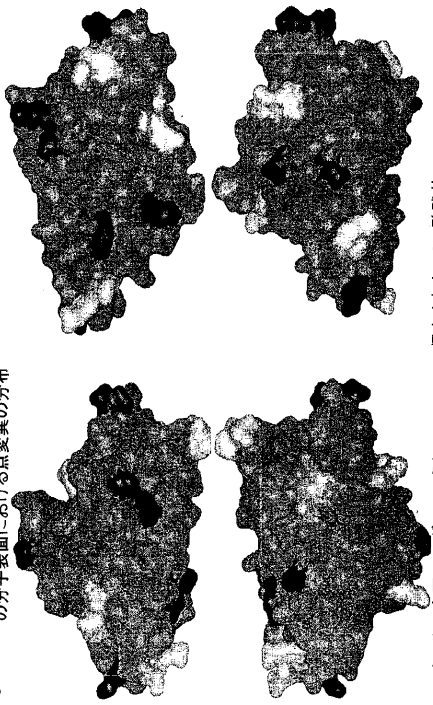
```

【図 17】



【図 26】

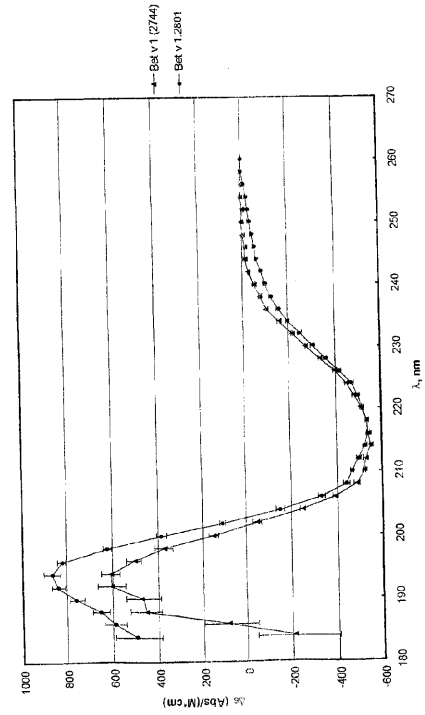
Figure 26 Bet v1(2744)[白色]、Bet v1(2753)[黒色]の分子表面における点変異の分布



灰色: 分子表面: フアラレスのうちで95~100%保存されたアミノ酸残基
 黒色: 変異 (Y5V, K134E) (E42S, E45S), (N78K, K103V), K123 I, (D156H, +160N)
 白色: 変異 (N28T, K32Q), K65N, (E96L, K97S), (P108G, D109N), (D125Y, E127S), R145E

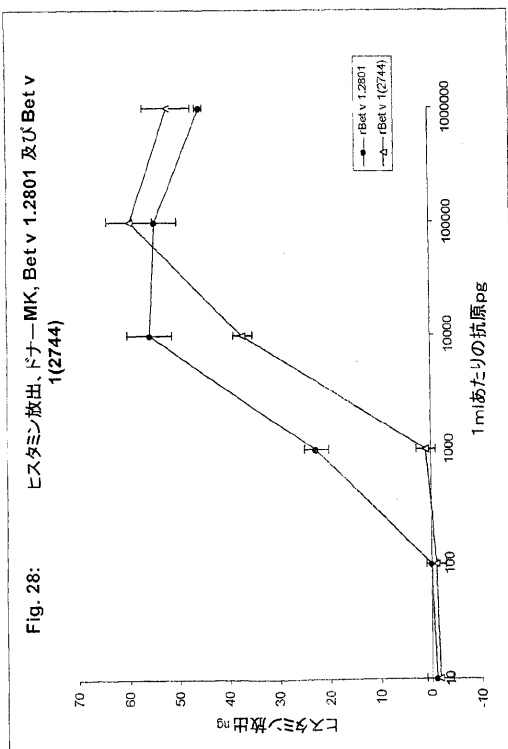
【図 27】

Figure 27 Bet v1.2801及び変異体Bet v1(2744)の円二色性スペクトル pH7.13, T20C.



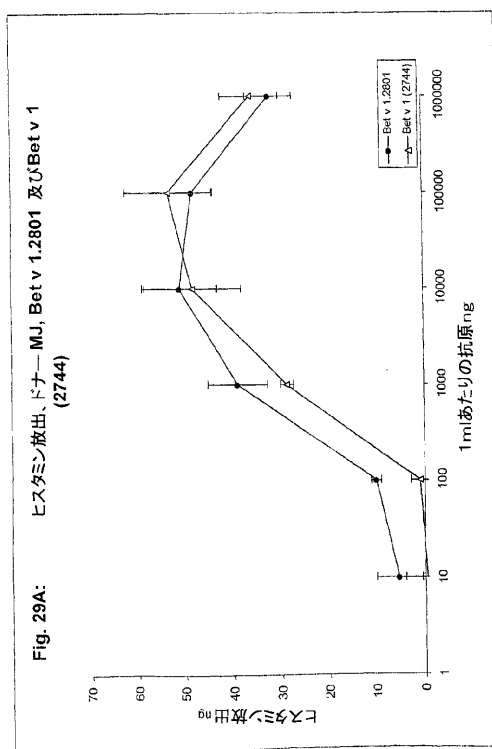
【図 28】

Fig. 28: ヒスタミン放出、ドナー-MK, Bet v 1.2801 及び Bet v 1(2744)

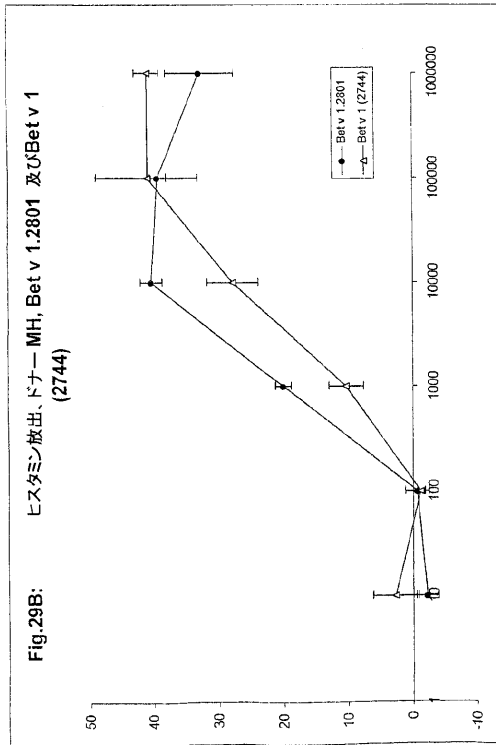


【図 29 A】

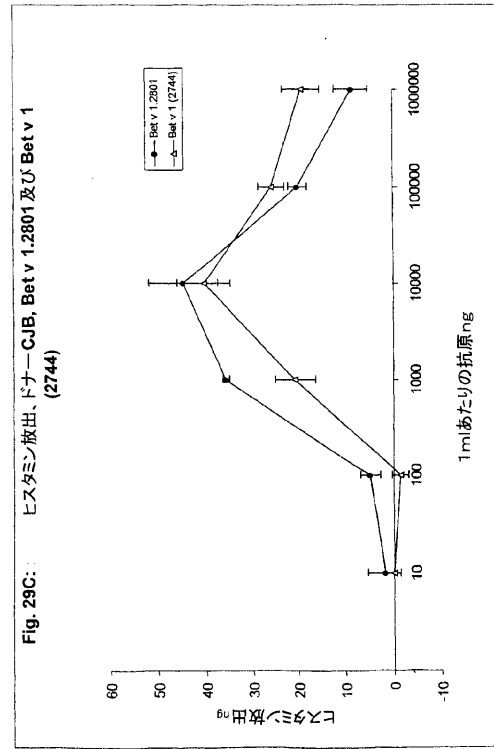
Fig. 29A: ヒスタミン放出、ドナー-MJ, Bet v 1.2801 及び Bet v 1(2744)



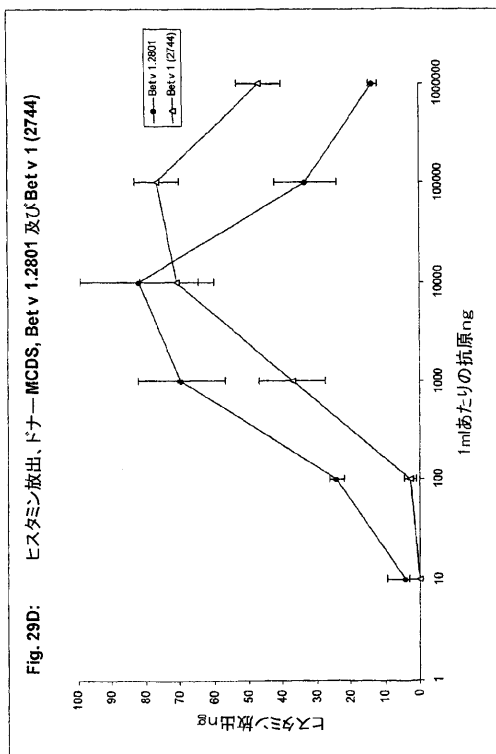
【図 29 B】



【図 29 C】



【図 29 D】



【図 30】

Bet v 1(2733)分子表面における点変異

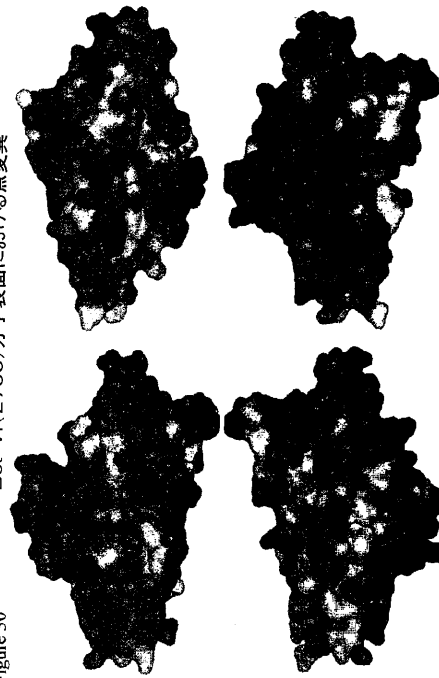


Figure 30

灰色: 骨格+フラガリシスのうちで95~100%保存されたアミノ酸残基
 黒色: 点変異 Y5V, N28T, K32Q, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K134E, R145E, D156H, +150N

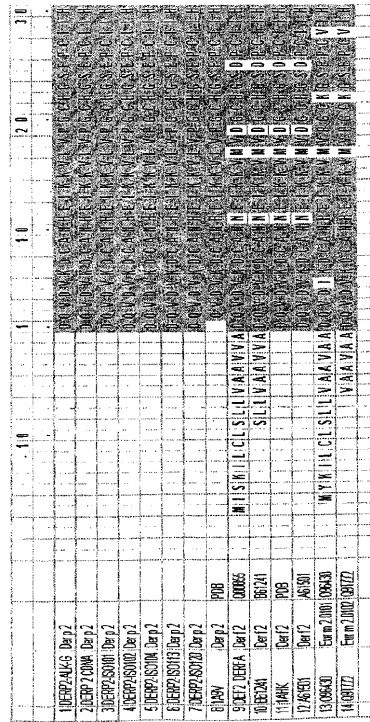
【 図 3 1 】

Figure 31 Der p2の部位特異的変異誘発のためのオリゴヌクレオチドプライマー

K6A	センス OB43	42-mer	5'-CCGCTCGAGAGAAAGAGATCAAGTCGATGTTCGCGAGTTGTGCC-3' <i>3bp /</i>
	アンチセンス OB28	39-mer	5'-CGTTCCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3' <i>3bp /</i>
K13E	センス OB44	67-mer	5'-CCGCTCGAGAGAAAGAGATCAAGTCGATGTTCGCGAGTTGTGCC AACCATGAAATCAAGAGAGTTTGTGG-3' <i>3bp /</i>
	アンチセンス OB28	39-mer	5'-CGTTCCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3' <i>3bp /</i>
HEON	センス OB46	54-mer	5'-CGGCGGATCAAGAGATGTGATGTTTCAGAGACCATGATATCAATAA CCGTGCTAAACC-3' <i>3bp /</i>
	アンチセンス OB28	39-mer	5'-CGTTCCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3' <i>3bp /</i>
B62S	センス OB47	33-mer	5'-GCCCTCAATCGATGCTTATATCAAGTGTGATGTTC-3'
	アンチセンス OB48	33-mer	5'-GCGACATCAACTGATTAACCATGATGAGGCC-3'
H74N	センス OB49	32-mer	5'-CATGGCATGCAATACATGAATGCCCATTTGG-3' <i>3bp /</i>
	アンチセンス OB28	39-mer	5'-CGTTCCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3' <i>3bp /</i>
K82N	センス OB50	50-mer	5'-CTACGCGATGCCATTCATGATGAAATGCCCATTTGGTTAATGACAA CAATATG-3' <i>3bp /</i>
	アンチセンス OB28	36-mer	5'-CGTTCCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3' <i>3bp /</i>

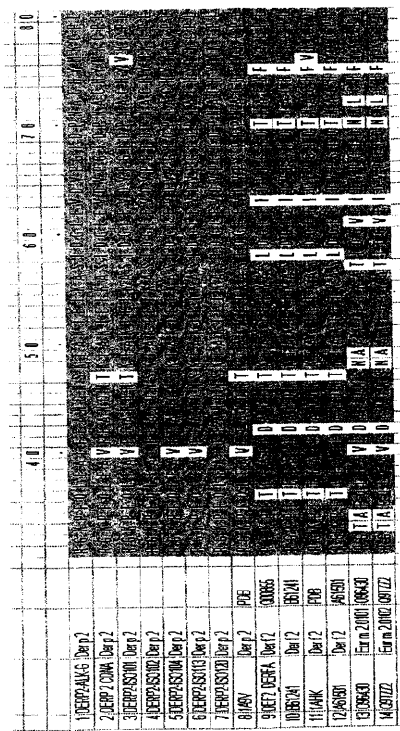
【 図 3 2 - 1 】

Figure 32 (Der p 2)



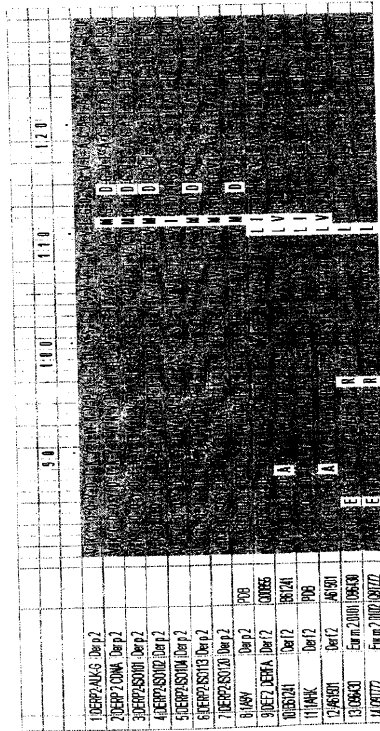
【 図 3 2 - 2 】

Figure 32 (Der p 2) (続き)



【 図 3 2 - 3 】

Figure 32 (Der p 2) (続き)



【 図 3 3 】

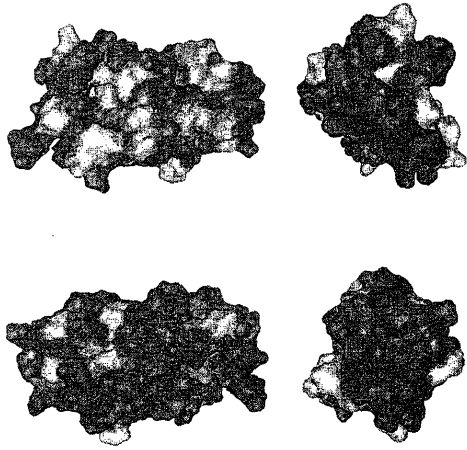


FIG. 33: Der p 2

【 図 3 4 】

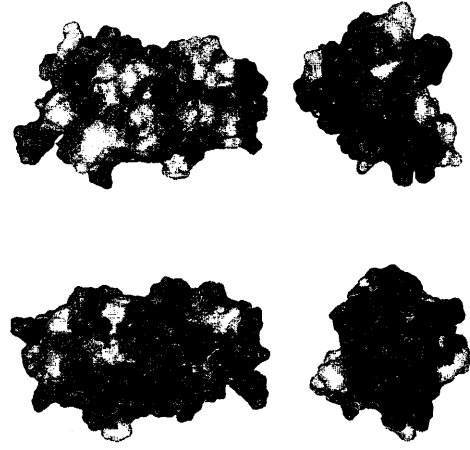


FIG. 34: Der p 2 変異体

【図 3 5 A - 1】

[illegible]

Figure 35A (Der p 1)

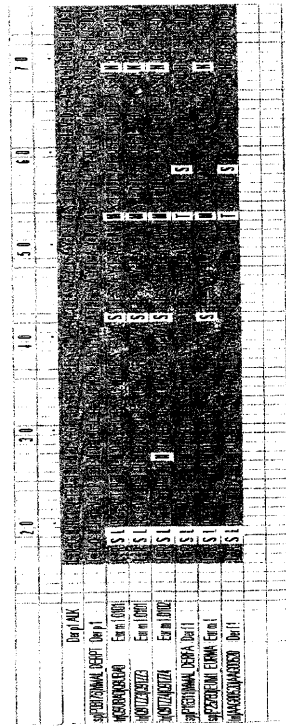
【図 3 5 A - 2】

Day/Week	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21	Day 22	Day 23	Day 24	Day 25	Day 26	Day 27	Day 28	Day 29	Day 30	Day 31	Day 32	Day 33	Day 34	Day 35	Day 36	Day 37	Day 38	Day 39	Day 40	Day 41	Day 42	Day 43	Day 44	Day 45	Day 46	Day 47	Day 48	Day 49	Day 50	Day 51	Day 52	Day 53	Day 54	Day 55	Day 56	Day 57	Day 58	Day 59	Day 60	Day 61	Day 62	Day 63	Day 64	Day 65	Day 66	Day 67	Day 68	Day 69	Day 70	Day 71	Day 72	Day 73	Day 74	Day 75	Day 76	Day 77	Day 78	Day 79	Day 80	Day 81	Day 82	Day 83	Day 84	Day 85	Day 86	Day 87	Day 88	Day 89	Day 90	Day 91	Day 92	Day 93	Day 94	Day 95	Day 96	Day 97	Day 98	Day 99	Day 100	Day 101	Day 102	Day 103	Day 104	Day 105	Day 106	Day 107	Day 108	Day 109	Day 110	Day 111	Day 112	Day 113	Day 114	Day 115	Day 116	Day 117	Day 118	Day 119	Day 120	Day 121	Day 122	Day 123	Day 124	Day 125	Day 126	Day 127	Day 128	Day 129	Day 130	Day 131	Day 132	Day 133	Day 134	Day 135	Day 136	Day 137	Day 138	Day 139	Day 140	Day 141	Day 142	Day 143	Day 144	Day 145	Day 146	Day 147	Day 148	Day 149	Day 150	Day 151	Day 152	Day 153	Day 154	Day 155	Day 156	Day 157	Day 158	Day 159	Day 160	Day 161	Day 162	Day 163	Day 164	Day 165	Day 166	Day 167	Day 168	Day 169	Day 170	Day 171	Day 172	Day 173	Day 174	Day 175	Day 176	Day 177	Day 178	Day 179	Day 180	Day 181	Day 182	Day 183	Day 184	Day 185	Day 186	Day 187	Day 188	Day 189	Day 190	Day 191	Day 192	Day 193	Day 194	Day 195	Day 196	Day 197	Day 198	Day 199	Day 200	Day 201	Day 202	Day 203	Day 204	Day 205	Day 206	Day 207	Day 208	Day 209	Day 210	Day 211	Day 212	Day 213	Day 214	Day 215	Day 216	Day 217	Day 218	Day 219	Day 220	Day 221	Day 222	Day 223	Day 224	Day 225	Day 226	Day 227	Day 228	Day 229	Day 230	Day 231	Day 232	Day 233	Day 234	Day 235	Day 236	Day 237	Day 238	Day 239	Day 240	Day 241	Day 242	Day 243	Day 244	Day 245	Day 246	Day 247	Day 248	Day 249	Day 250	Day 251	Day 252	Day 253	Day 254	Day 255	Day 256	Day 257	Day 258	Day 259	Day 260	Day 261	Day 262	Day 263	Day 264	Day 265	Day 266	Day 267	Day 268	Day 269	Day 270	Day 271	Day 272	Day 273	Day 274	Day 275	Day 276	Day 277	Day 278	Day 279	Day 280	Day 281	Day 282	Day 283	Day 284	Day 285	Day 286	Day 287	Day 288	Day 289	Day 290	Day 291	Day 292	Day 293	Day 294	Day 295	Day 296	Day 297	Day 298	Day 299	Day 300	Day 301	Day 302	Day 303	Day 304	Day 305	Day 306	Day 307	Day 308	Day 309	Day 310	Day 311	Day 312	Day 313	Day 314	Day 315	Day 316	Day 317	Day 318	Day 319	Day 320	Day 321	Day 322	Day 323	Day 324	Day 325	Day 326	Day 327	Day 328	Day 329	Day 330	Day 331	Day 332	Day 333	Day 334	Day 335	Day 336	Day 337	Day 338	Day 339	Day 340	Day 341	Day 342	Day 343	Day 344	Day 345	Day 346	Day 347	Day 348	Day 349	Day 350	Day 351	Day 352	Day 353	Day 354	Day 355	Day 356	Day 357	Day 358	Day 359	Day 360	Day 361	Day 362	Day 363	Day 364	Day 365	Day 366	Day 367	Day 368	Day 369	Day 370	Day 371	Day 372	Day 373	Day 374	Day 375	Day 376	Day 377	Day 378	Day 379	Day 380	Day 381	Day 382	Day 383	Day 384	Day 385	Day 386	Day 387	Day 388	Day 389	Day 390	Day 391	Day 392	Day 393	Day 394	Day 395	Day 396	Day 397	Day 398	Day 399	Day 400	Day 401	Day 402	Day 403	Day 404	Day 405	Day 406	Day 407	Day 408	Day 409	Day 410	Day 411	Day 412	Day 413	Day 414	Day 415	Day 416	Day 417	Day 418	Day 419	Day 420	Day 421	Day 422	Day 423	Day 424	Day 425	Day 426	Day 427	Day 428	Day 429	Day 430	Day 431	Day 432	Day 433	Day 434	Day 435	Day 436	Day 437	Day 438	Day 439	Day 440	Day 441	Day 442	Day 443	Day 444	Day 445	Day 446	Day 447	Day 448	Day 449	Day 450	Day 451	Day 452	Day 453	Day 454	Day 455	Day 456	Day 457	Day 458	Day 459	Day 460	Day 461	Day 462	Day 463	Day 464	Day 465	Day 466	Day 467	Day 468	Day 469	Day 470	Day 471	Day 472	Day 473	Day 474	Day 475	Day 476	Day 477	Day 478	Day 479	Day 480	Day 481	Day 482	Day 483	Day 484	Day 485	Day 486	Day 487	Day 488	Day 489	Day 490	Day 491	Day 492	Day 493	Day 494	Day 495	Day 496	Day 497	Day 498	Day 499	Day 500	Day 501	Day 502	Day 503	Day 504	Day 505	Day 506	Day 507	Day 508	Day 509	Day 510	Day 511	Day 512	Day 513	Day 514	Day 515	Day 516	Day 517	Day 518	Day 519	Day 520	Day 521	Day 522	Day 523	Day 524	Day 525	Day 526	Day 527	Day 528	Day 529	Day 530	Day 531	Day 532	Day 533	Day 534	Day 535	Day 536	Day 537	Day 538	Day 539	Day 540	Day 541	Day 542	Day 543	Day 544	Day 545	Day 546	Day 547	Day 548	Day 549	Day 550	Day 551	Day 552	Day 553	Day 554	Day 555	Day 556	Day 557	Day 558	Day 559	Day 560	Day 561	Day 562	Day 563	Day 564	Day 565	Day 566	Day 567	Day 568	Day 569	Day 570	Day 571	Day 572	Day 573	Day 574	Day 575	Day 576	Day 577	Day 578	Day 579	Day 580	Day 581	Day 582	Day 583	Day 584	Day 585	Day 586	Day 587	Day 588	Day 589	Day 590	Day 591	Day 592	Day 593	Day 594	Day 595	Day 596	Day 597	Day 598	Day 599	Day 600	Day 601	Day 602	Day 603	Day 604	Day 605	Day 606	Day 607	Day 608	Day 609	Day 610	Day 611	Day 612	Day 613	Day 614	Day 615	Day 616	Day 617	Day 618	Day 619	Day 620	Day 621	Day 622	Day 623	Day 624	Day 625	Day 626	Day 627	Day 628	Day 629	Day 630	Day 631	Day 632	Day 633	Day 634	Day 635	Day 636	Day 637	Day 638	Day 639	Day 640	Day 641	Day 642	Day 643	Day 644	Day 645	Day 646	Day 647	Day 648	Day 649	Day 650	Day 651	Day 652	Day 653	Day 654	Day 655	Day 656	Day 657	Day 658	Day 659	Day 660	Day 661	Day 662	Day 663	Day 664	Day 665	Day 666	Day 667	Day 668	Day 669	Day 670	Day 671	Day 672	Day 673	Day 674	Day 675	Day 676	Day 677	Day 678	Day 679	Day 680	Day 681	Day 682	Day 683	Day 684	Day 685	Day 686	Day 687	Day 688	Day 689	Day 690	Day 691	Day 692	Day 693	Day 694	Day 695	Day 696	Day 697	Day 698	Day 699	Day 700	Day 701	Day 702	Day 703	Day 704	Day 705	Day 706	Day 707	Day 708	Day 709	Day 710	Day 711	Day 712	Day 713	Day 714	Day 715	Day 716	Day 717	Day 718	Day 719	Day 720	Day 721	Day 722	Day 723	Day 724	Day 725	Day 726	Day 727	Day 728	Day 729	Day 730	Day 731	Day 732	Day 733	Day 734	Day 735	Day 736	Day 737	Day 738	Day 739	Day 740	Day 741	Day 742	Day 743	Day 744	Day 745	Day 746	Day 747	Day 748	Day 749	Day 750	Day 751	Day 752	Day 753	Day 754	Day 755	Day 756	Day 757	Day 758	Day 759	Day 760	Day 761	Day 762	Day 763	Day 764	Day 765	Day 766	Day 767	Day 768	Day 769	Day 770	Day 771	Day 772	Day 773	Day 774	Day 775	Day 776	Day 777	Day 778	Day 779	Day 780	Day 781	Day 782	Day 783	Day 784	Day 785	Day 786	Day 787	Day 788	Day 789	Day 790	Day 791	Day 792	Day 793	Day 794	Day 795	Day 796	Day 797	Day 798	Day 799	Day 800	Day 801	Day 802	Day 803	Day 804	Day 805	Day 806	Day 807	Day 808	Day 809	Day 810	Day 811	Day 812	Day 813	Day 814	Day 815	Day 816	Day 817	Day 818	Day 819	Day 820	Day 821	Day 822	Day 823	Day 824	Day 825	Day 826	Day 827	Day 828	Day 829	Day 830	Day 831	Day 832	Day 833	Day 834	Day 835	Day 836	Day 837	Day 838	Day 839	Day 840	Day 841	Day 842	Day 843	Day 844	Day 845	Day 846	Day 847	Day 848	Day 849	Day 850	Day 851	Day 852	Day 853	Day 854	Day 855	Day 856	Day 857	Day 858	Day 859	Day 860	Day 861	Day 862	Day 863	Day 864	Day 865	Day 866	Day 867	Day 868	Day 869	Day 870	Day 871	Day 872	Day 873	Day 874	Day 875	Day 876	Day 877	Day 878	Day 879	Day 880	Day 881	Day 882	Day 883	Day 884	Day 885	Day 886	Day 887	Day 888	Day 889	Day 890	Day 891	Day 892	Day 893	Day 894	Day 895	Day 896	Day 897	Day 898	Day 899	Day 900	Day 901	Day 902	Day 903	Day 904	Day 905	Day 906	Day 907	Day 908	Day 909	Day 910	Day 911	Day 912	Day 913	Day 914	Day 915	Day 916	Day 917	Day 918	Day 919	Day 920	Day 921	Day 922	Day 923	Day 924	Day 925	Day 926	Day 927	Day 928	Day 929	Day 930	Day 931	Day 932	Day 933	Day 934	Day 935	Day 936	Day 937	Day 938	Day 939	Day 940	Day 941	Day 942	Day 943	Day 944	Day 945	Day 946	Day 947	Day 948	Day 949	Day 950	Day 951	Day 952	Day 953	Day 954	Day 955	Day 956	Day 957	Day 958	Day 959	Day 960	Day 961	Day 962	Day 963	Day 964	Day 965	Day 966	Day 967	Day 968	Day 969	Day 970	Day 971	Day 972	Day 973	Day 974	Day 975	Day 976	Day 977	Day 978	Day 979	Day 980	Day 981	Day 982	Day 983	Day 984	Day 985	Day 986	Day 987	Day 988	Day 989	Day 990	Day 991	Day 992	Day 993	Day 994	Day 995	Day 996	Day 997	Day 998	Day 999	Day 1000

Figure 35A (Der p 1) (続き)

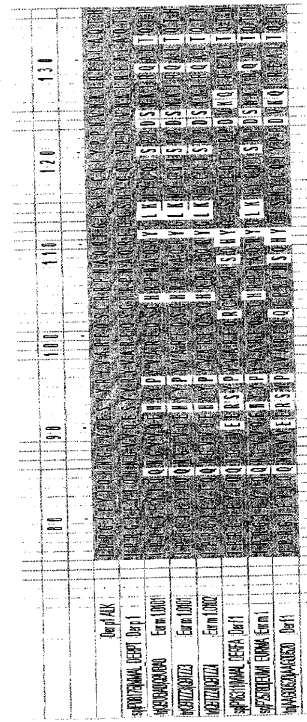
【図 3 5 A - 3】

Figure 35A (Der p 1) (続き)



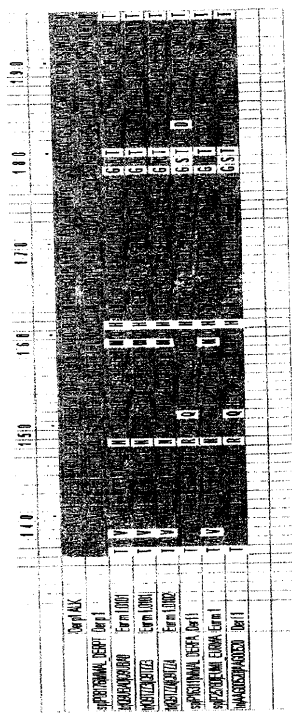
【図 3 5 B - 1】

Figure 35B (Der p 1)



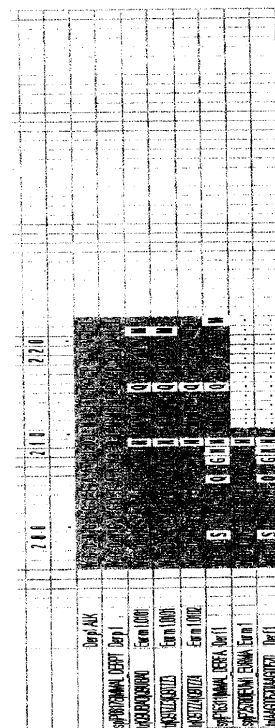
【図 3 5 B - 2】

Figure 35B (Der p 1) (続き)



【図 3 5 B - 3】

Figure 35B (Der p 1) (続き)



【图 3 7】

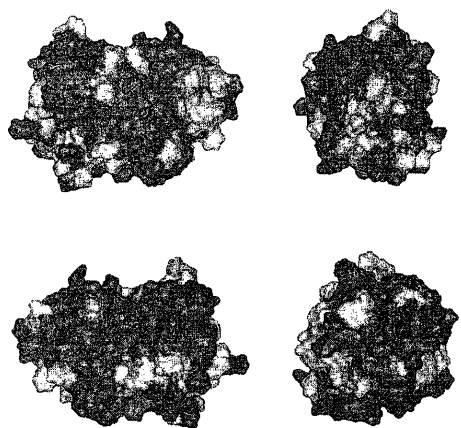


FIG. 36: Der p 1

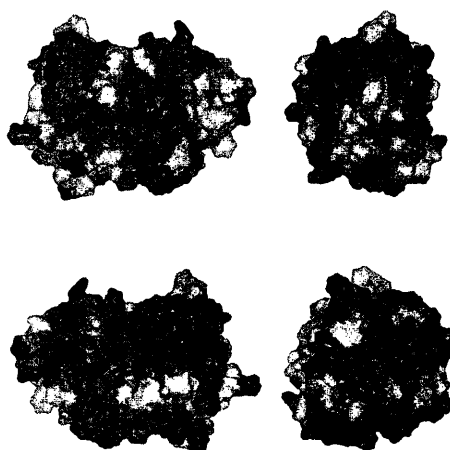


FIG. 37: Der p 1変異体

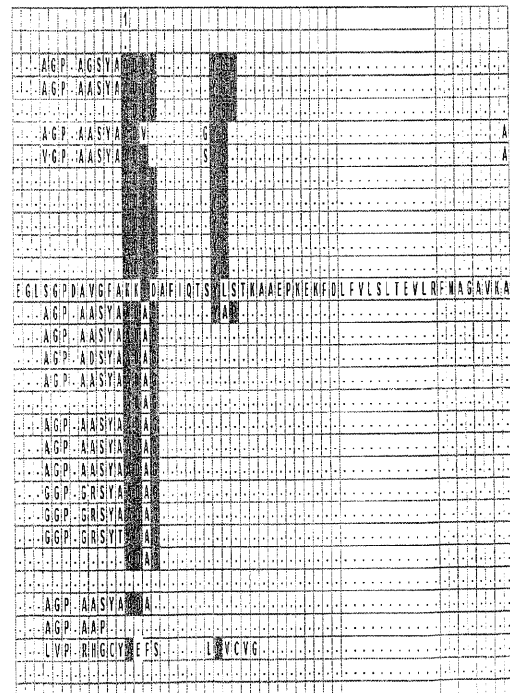
【図 3 8 A - 2】

FIG. 38A (Phil p 5) (続き)

[illegible][illegible]

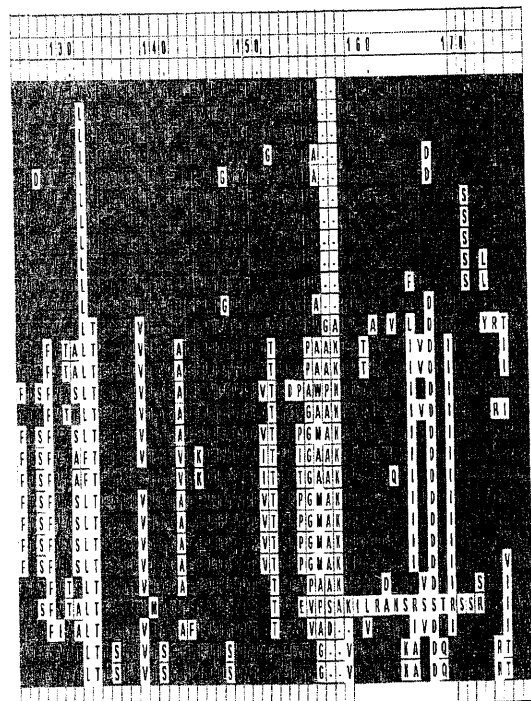
【図 3 8 B - 1】

FIG. 38B (Phl p 5)



【図 3 8 B - 3】

FIG. 38B (Phl p 5)(続き)



【図 39 A】

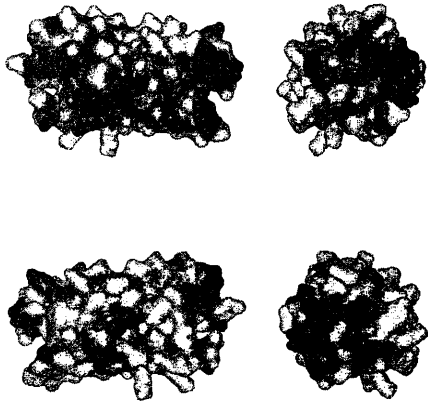


FIG. 39A: Phl p 5, モデル A

【図 39 B】

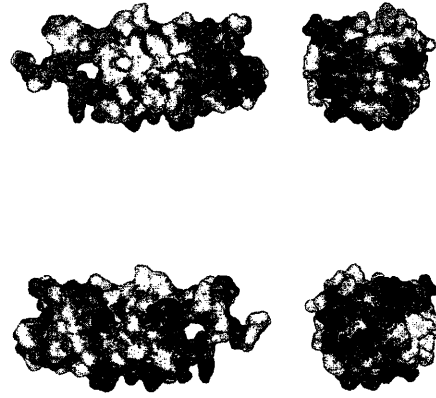


FIG. 39B: Phl p 5, モデル B

【図 40 A】

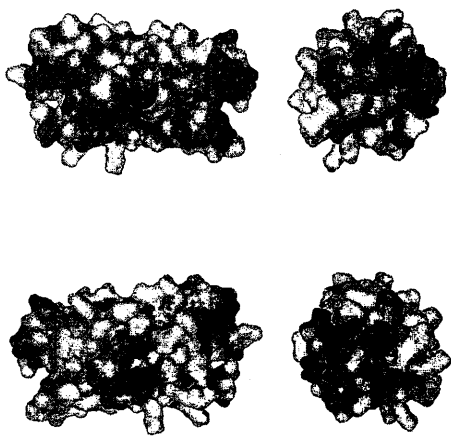


FIG. 40A: Phl p 5 変異体, モデル A

【図 40 B】

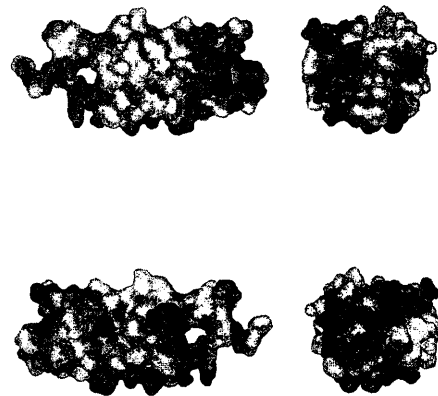
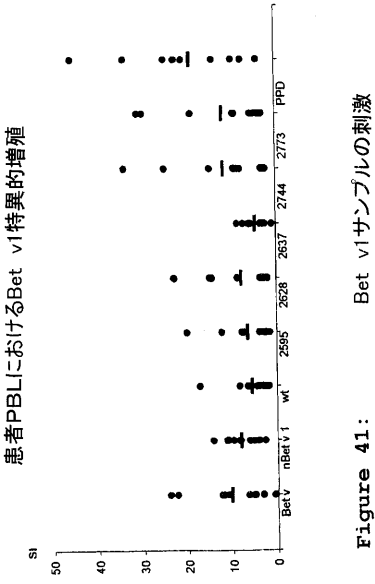
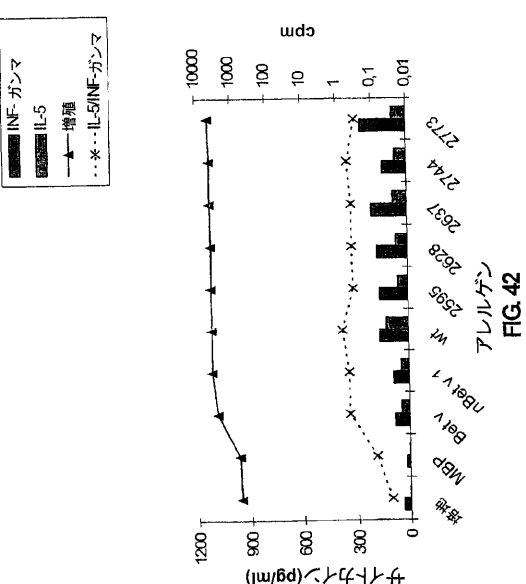


FIG. 40B: Phl p 5 変異体, モデル B

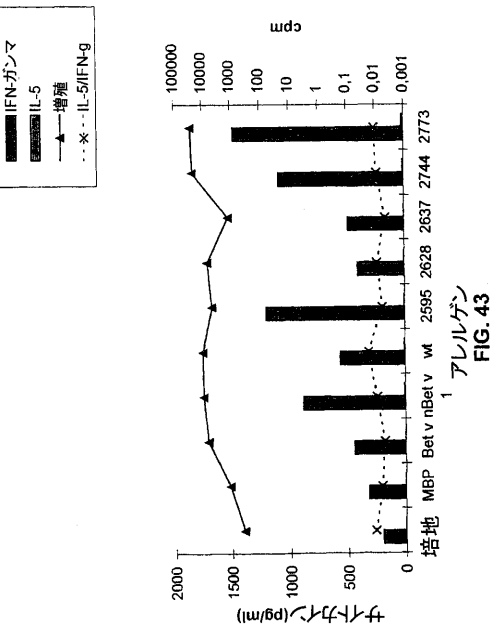
【図 4 1】



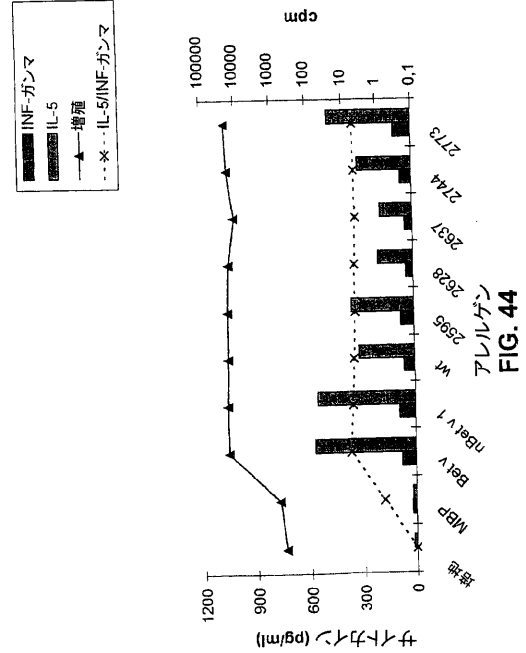
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/40676 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/29,
15/12, C07K 14/415, 14/435, A61K 39/35, 39/36, C12N
5/10 // A61P 37/08(74) Agent: HOFMAN-BANG ZACCO A/S, Hans
Bekkevolds Allé 7, DK-2900 Hellerup (DK).

(21) International Application Number: PCT/DK01/00764

(22) International Filing Date:
16 November 2001 (16.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2000 01718 16 November 2000 (16.11.2000) DK
60/249,361 16 November 2000 (16.11.2000) US
60/298,170 14 June 2001 (14.06.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): ALK-
ABELLO A/S [DK/DK]; Bøge Allé 6-8, DK-2970 Her-
sholm (DK).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOLM, Jens
[NO/NO]; Noddehegnet 30, DK-3480 Fredensborg (NO).
IPSEN, Henrik [DK/DK]; Egevej 16, DK-3400 Hillerød
(DK). NEDERGAARD LARSEN, Jørgen [DK/DK];
Nyvej 11, DK-3230 Græsted (DK). SPANGFORT,
Michael, Dbo [DK/SE]; Høvimansgatan 14, S-237 54
Helsingborg (SE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/40676 A2

(54) Title: NOVEL MUTANT ALLERGENS

(57) Abstract: Novel recombinant allergens with multiple mutations and reduced IgE binding affinity are disclosed. The allergens are non-naturally occurring mutants of naturally-occurring allergens. The overall α -carbon backbone tertiary structure is essentially preserved. Also disclosed is a method for preparing such recombinant allergens as well as uses thereof.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

1

NOVEL MUTANT ALLERGENS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to novel recombinant allergens, which are mutants of naturally occurring allergens. Also, the invention relates to a composition comprising a mixture of the novel recombinant mutant allergens. Further, the invention relates to a method of
10 preparing such recombinant mutant allergens as well as to pharmaceutical compositions, including vaccines, comprising the recombinant mutant allergens. In further embodiments, the present invention relates to methods of generating immune responses in a subject, vaccination or
15 treatment of a subject as well as processes for preparing the compositions of the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 Genetically predisposed individuals become sensitised (allergic) to antigens originating from a variety of environmental sources, to the allergens of which the individuals are exposed. The allergic reaction occurs when a previously sensitised individual is re-exposed to
25 the same or a homologous allergen. Allergic responses range from hay fever, rhinoconjunctivitis, rhinitis and asthma to systemic anaphylaxis and death in response to e.g. bee or hornet sting or insect bite. The reaction is immediate and can be caused by a variety of atopic
30 allergens such as compounds originating from grasses, trees, weeds, insects, food, drugs, chemicals and perfumes.

However, the responses do not occur when an individual is
35 exposed to an allergen for the first time. The initial adaptive response takes time and does usually not cause

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

2

any symptoms. But when antibodies and T cells capable of reacting with the allergen have been produced, any subsequent exposure may provoke symptoms. Thus, allergic responses demonstrate that the immune response itself can
5 cause significant pathological states, which may be life threatening.

The antibodies involved in atopic allergy belong primarily to immunoglobulins of the IgE class. IgE binds
10 to specific receptors on the surface of mast cells and basophils. Following complex formation of a specific allergen with IgE bound to mast cells, receptor cross-linking on the cell surface results in signalling through the receptors and the physiological response of the
15 target cells. Degranulation results in the release of i.a. histamine, heparin, a chemotactic factor for eosinophilic leukocytes, leukotrienes C4, D4 and E4, which cause prolonged constriction of the bronchial smooth muscle cells. The resulting effects may be
20 systemic or local in nature.

The antibody-mediated hypersensitivity reactions can be divided into four classes, namely type I, type II, type III and type IV. Type I allergic reactions is the classic
25 immediate hypersensitivity reaction occurring within seconds or minutes following antigen exposure. These symptoms are mediated by allergen specific IgE.

Commonly, allergic reactions are observed as a response
30 to protein allergens present e.g. in pollens, house dust mites, animal hair and dandruff, venoms, and food products.

In order to reduce or eliminate allergic reactions,
35 carefully controlled and repeated administration of allergy vaccines is commonly used. Allergy vaccination is

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

3

traditionally performed by parenteral, intranasal, or sublingual administration in increasing doses over a fairly long period of time, and results in desensitisation of the patient. The exact immunological
5 mechanism is not known, but induced differences in the phenotype of allergen specific T cells is thought to be of particular importance.

Allergy vaccination

10

The concept of vaccination is based on two fundamental characteristics of the immune system, namely specificity and memory. Vaccination will prime the immune system of the recipient, and upon repeated exposure to similar
15 proteins the immune system will be in a position to respond more rigorously to the challenge of for example a microbial infection. Vaccines are mixtures of proteins intended to be used in vaccination for the purpose of generating such a protective immune response in the
20 recipient. The protection will comprise only components present in the vaccine and homologous antigens.

Compared to other types of vaccination allergy vaccination is complicated by the existence of an ongoing
25 immune response in allergic patients. This immune response is characterised by the presence of allergen specific IgE mediating the release of allergic symptoms upon exposure to allergens. Thus, allergy vaccination using allergens from natural sources has an inherent risk
30 of side effects being in the utmost consequence life threatening to the patient.

Approaches to circumvent this problem may be divided in three categories. In practise measures from more than one
35 category are often combined. First category of measures includes the administration of several small doses over

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

4

prolonged time to reach a substantial accumulated dose. Second category of measures includes physical modification of the allergens by incorporation of the allergens into gel substances such as aluminium hydroxide. Aluminium hydroxide formulation has an adjuvant effect and a depot effect of slow allergen release reducing the tissue concentration of active allergen components. Third category of measures include chemical modification of the allergens for the purpose of reducing allergenicity, i.e. IgE binding.

The detailed mechanism behind successful allergy vaccination remains controversial. It is, however, agreed that T cells play a key role in the overall regulation of immune responses. According to current consensus the relation between two extremes of T cell phenotypes, Th1 and Th2, determine the allergic status of an individual. Upon stimulation with allergen Th1 cells secrete interleukines dominated by interferon- γ leading to protective immunity and the individual is healthy. Th2 cells on the other hand secrete predominantly interleukin 4 and 5 leading to IgE synthesis and eosinophilia and the individual is allergic. *In vitro* studies have indicated the possibility of altering the responses of allergen specific T cells by challenge with allergen derived peptides containing relevant T cell epitopes. Current approaches to new allergy vaccines are therefore largely based on addressing the T cells, the aim being to silence the T cells (anergy induction) or to shift the response from the Th2 phenotype to the Th1 phenotype.

Antibody-binding epitopes (B-cell epitopes)

X-ray crystallographic analyses of F_{ab}-antigen complexes has increased the understanding of antibody-binding epitopes. According to this type of analysis antibody-

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

5

binding epitopes can be defined as a section of the surface of the antigen comprising atoms from 15-25 amino acid residues, which are within a distance from the atoms of the antibody enabling direct interaction. The affinity of the antigen-antibody interaction can not be predicted from the enthalpy contributed by van der Waals interactions, hydrogen bonds or ionic bonds, alone. The entropy associated with the almost complete expulsion of water molecules from the interface represent an energy contribution similar in size. This means that perfect fit between the contours of the interacting molecules is a principal factor underlying antigen-antibody high affinity interactions.

15 In WO 97/30150 (ref. 1), a population of protein molecules is claimed, which protein molecules have a distribution of specific mutations in the amino acid sequence as compared to a parent protein. From the description, it appears that the invention is concerned with producing analogues which are modified as compared to the parent protein, but which are taken up, digested and presented to T cells in the same manner as the parent protein (naturally occurring allergens). Thereby, a modified T cell response is obtained. Libraries of modified proteins are prepared using a technique denoted PM (Parsimonious Mutagenesis).

In WO 92/02621 (ref. 2), recombinant DNA molecules are described, which molecules comprise a DNA coding for a polypeptide having at least one epitope of an allergen of trees of the order *Fagales*, the allergen being selected from *Aln g 1*, *Cor a 1* and *Bet v 1*. The recombinant molecules described herein do all have an amino acid sequence or part of an amino acid sequence that corresponds to the sequence of a naturally occurring allergen.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

6

WO 90/11293 (ref. 3) relates i.a. to isolated allergenic peptides of ragweed pollen and to modified ragweed pollen peptides. The peptides disclosed therein have an amino acid sequence corresponding either to the sequence of the naturally occurring allergen or to naturally occurring isoforms thereof.

Chemical modification of allergens

Several approaches to chemical modification of allergens have been taken. Approaches of the early seventies include chemical coupling of allergens to polymers, and chemical cross-linking of allergens using formaldehyde, etc., producing the so-called 'allergoids'. The rationale behind these approaches was random destruction of IgE binding epitopes by attachment of the chemical ligand thereby reducing IgE-binding while retaining immunogenicity by the increased molecular weight of the complexes. Inherent disadvantages of 'allergoid' production are linked to difficulties in controlling the process of chemical cross-linking and difficulties in analysis and standardisation of the resulting high molecular weight complexes. 'Allergoids' are currently in clinical use and due to the random destruction of IgE binding epitopes higher doses can be administered as compared to conventional vaccines, but the safety and efficacy parameters are not improved over use of conventional vaccines.

More recent approaches to chemical modification of allergens aim at a total disruption of the tertiary structure of the allergen thus eliminating IgE binding assuming that the essential therapeutic target is the allergen specific T cell. Such vaccines contain allergen sequence derived synthetic peptides representing minimal

T cells epitopes, longer peptides representing linked T cells epitopes, longer allergen sequence derived synthetic peptides representing regions of immunodominant T cell epitopes, or allergen molecules cut in two halves
5 by recombinant technique. Another approach based on this rationale has been the proposal of the use of "low IgE binding" recombinant isoforms. In recent years it has become clear that natural allergens are heterogeneous containing isoallergens and variants having up to
10 approximately 25% of their amino acids substituted. Some recombinant isoallergens have been found to be less efficient in IgE binding possibly due to irreversible denaturation and hence total disruption of tertiary structure.

15

In vitro mutagenesis and allergy vaccination

Attempts to reduce allergenicity by *in vitro* site directed mutagenesis have been performed using several
20 allergens including Der f 2 (Takai et al, ref. 4), Der p 2 (Smith et al, ref. 5), a 39 kDa *Dermatophagoides farinae* allergen (Aki et al, ref. 6), bee venom phospholipase A2 (Förster et al, ref. 7), Ara h 1 (Burks et al, ref. 8), Ara h 2 (Stanley et al, ref. 9), Bet v 1
25 (Ferreira et al, ref. 10 and 11), birch profilin (Wiedemann et al, ref. 12), and Ory s 1 (Alvarez et al, ref. 13).

The rationale behind these approaches, again, is
30 addressing allergen specific T cells while at the same time reducing the risk of IgE mediated side effects by reduction or elimination of IgE binding by disruption of the tertiary structure of the recombinant mutant allergen. The rationale behind these approaches does not
35 include the concept of dominant IgE binding epitopes and it does not include the concept of initiating a new

protective immune response which also involves B-cells and antibody generation.

5 The article by Ferreira *et al* (ref. 11) describes the use of site directed mutagenesis for the purpose of reducing IgE binding. Although the three-dimensional structure of Bet v 1 is mentioned in the article the authors do not use the structure for prediction of solvent exposed amino acid residues for mutation, half of which have a low
10 degree of solvent exposure. Rather they use a method developed for prediction of functional residues in proteins different from the concept of structure based identification of conserved surface areas described here. Although the authors do discuss conservation of α -carbon
15 backbone tertiary structure this concept is not a part of the therapeutic strategy but merely included to assess *in vitro* IgE binding. Furthermore, the evidence presented is not adequate since normalisation of CD-spectra prevents the evaluation of denaturation of a proportion of the
20 sample, which is a common problem. The therapeutic strategy described aim at inducing tolerance in allergen specific T cells and initiation of a new immune response is not mentioned.

25 The article by Wiedemann *et al.* (ref. 12) describes the use of site directed mutagenesis and peptide synthesis for the purpose of monoclonal antibody epitope characterisation. The authors have knowledge of the tertiary structure of the antigen and they use this
30 knowledge to select a surface exposed amino acid for mutation. The algorithm used can be said to be opposite to the one described by the present inventors since an amino acid differing from homologous sequences is selected. The study demonstrates that substitution of a
35 surface exposed amino acid has the capacity to modify the binding characteristics of a monoclonal antibody, which

is not surprising considering common knowledge. The experiments described are not designed to assess modulation in the binding of polyclonal antibodies such as allergic patients' serum IgE. One of the experiments
5 contained do apply serum IgE and although this experiment is not suitable for quantitative assessment, IgE binding does not seem to be affected by the mutations performed.

The article by Smith *et al.* (ref. 5) describes the use of
10 site directed mutagenesis for the purpose of monoclonal antibody epitope mapping and reduction of IgE binding. The authors have no knowledge of the tertiary structure and make no attempt to assess the conservation of α -carbon backbone tertiary structure. The algorithm used
15 does not ensure that amino acids selected for mutation are actually exposed to the molecular surface. Only one of the mutants described lead to a substantial reduction in IgE binding. This mutant is deficient in binding of all antibodies tested indicating that the tertiary
20 structure is disrupted. The authors do not define a therapeutic strategy and initiation of a new immune response is not mentioned.

The article by Colombo *et al.* (ref. 14) describes the
25 study of an IgE binding epitope by use of site directed mutagenesis and peptide synthesis. The authors use a three dimensional computer model structure based on the crystal structure of a homologous protein to illustrate the presence of the epitope on the molecular surface. The
30 further presence of an epitope on a different allergen showing primary structure homology is addressed using synthetic peptides representing the epitope. The therapeutic strategy is based on treatment using this synthetic peptide representing a monovalent IgE binding
35 epitope. Conserved surface areas between homologous allergens as well as the therapeutic concept of

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

10

initiating a new protective immune response are not mentioned.

5 The article by Spangfort et al. (ref. 15) describes the three-dimensional structure and conserved surface exposed patches of the major birch allergen. The article does not mention major IgE binding epitopes nor site directed mutagenesis, neither is therapeutic application addressed.

10 In none of the studies described above is IgE binding reduced by substitution of surface exposed amino acids while conserving α -carbon backbone tertiary structure. The rationale behind above-mentioned approaches does not include the concept of dominant IgE binding epitopes and it does not include the therapeutic concept of initiating a new protective immune response.

20 WO 99/47680 discloses the introduction of artificial amino acid substitutions into defined critical positions while retaining the α -carbon backbone tertiary structure of the allergen. In particular, WO 99/47680 discloses a recombinant allergen, which is a non-naturally occurring mutant derived from a naturally occurring allergen, wherein at least one surface-exposed, conserved amino acid residue of a B cell epitope is substituted by another residue which does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic order from which said naturally occurring allergen originates, said mutant allergen having essentially the same α -carbon backbone tertiary structure as said naturally occurring allergen, and the specific IgE binding to the mutated allergen being reduced as compared to the binding to said naturally occurring allergen.

The recombinant allergen disclosed in WO 99/47680 is obtainable by a) identifying amino acid residues in a naturally occurring allergen which are conserved with more than 70% identity in all known homologous proteins within the taxonomic order from which said naturally occurring allergen originates, b) defining at least one patch of conserved amino acid residues being coherently connected over at least 400 Å² of the surface of the three-dimensional of the allergen molecule as defined by having a solvent accessibility of at least 20%, said at least one patch comprising at least one B cell epitope, and c) substituting at least one amino acid residue in said at least one patch by another amino acid being non-conservative in the particular position while essentially preserving the overall α-carbon backbone tertiary structure of the allergen molecule.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows mutant-specific oligonucleotide primers used for *Bet v 1* mutant number 1. Mutated nucleotides are underlined.

Figure 2 shows two generally applicable primers (denoted "all-sense" and "all non-sense"), which were synthesised and used for all mutants.

Figure 3 shows the DNA and amino acid sequence of the naturally occurring allergen *Bet v 1* as well as a number of *Bet v 1* mutations.

Figure 4 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Glu45Ser mutant.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

12

- Figure 5 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* mutant Asn28Thr+Lys32Gln.
- 5 Figure 6 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Pro108Gly mutant.
- 10 Figure 7 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Glu60Ser mutant.
- 15 Figure 8 shows the CD spectra of recombinant and Triple-patch mutant, recorded at close to equal concentrations.
- 20 Figure 9 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Triple-patch mutant.
- 25 Figure 10 shows solvent accessibility of individually aligned antigen 5 residues and alignment of *Vespula* antigen 5 sequences (left panel). On the right panel of Figure 10 is shown the molecular surface of antigen 5 with conserved areas among *Vespula* antigen 5:s.
- 30 Figure 11 shows the sequence of the primer corresponding to the amino terminus of *Ves v 5* derived from the sense strand. The sequence of the downstream primer is derived from the non-sense strand.
- 35 Figure 12 shows two generally applicable primers (denoted

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

13

"all sense" and "all non-sense", which were synthesised and used for all mutants.

Figure 13 shows the DNA and amino acid sequence of the naturally occurring allergen *Ves v 5* as well as two *Ves v 5* mutations.

Figure 14 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Ves v 5* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Ves v 5* and by *Ves v 5* Lys72Ala mutant.

Figure 15 shows a theoretical model of the reaction between an allergen and mast cells by IgE cross-linking.

Figure 16 shows the DNA and amino acid sequence of the naturally occurring allergen *Der p 2*.

Figure 17 shows schematically the primers used to create the mutations. (I) shows the sense and antisense primers. (II) shows the final recombinant protein harbouring mutations at the indicated positions.

Figure 18 shows an illustration of the construction of *Bet v 1* mutants and a listing of the primers used. The mutants contain from five to nine amino acids.

Figure 19 shows introduced point mutations at the surface of *Bet v 1* (2628) and *Bet v 1* (2637). In mutant *Bet v 1* (2628), five primary mutations were introduced in one half of *Bet v 1* leaving the other half unaltered. In mutant *Bet v 1* (2637), five primary and three secondary mutations were introduced in the other half, leaving the first half unaltered.

Figure 20 shows the circular dichroism (CD) spectra of

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

14

recombinant Bet v 1.2801 (wild type) and the Bet v 1 (2637) mutant recorded at nearly identical concentrations.

5 Figure 21 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant Bet v 1.2801 (wild type) to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated Bet v 1.2801 and by Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637), and a 1:1 mix of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637).

Figure 22 shows histamine release in human basophil cells of Bet v 1.2801 (wild type), Bet v 1 (2628), and Bet v 1 (2637).

15 Figure 23 shows histamine release in human basophil cells of Bet v 1.2801 (wild type), Bet v 1 (2628), and Bet v 1 (2637).

20 Figure 24 shows point mutations at the surface of Bet v 1 (2744).

Figure 25 shows point mutations at the surface of Bet v 1 (2753).

25 Figure 26 shows point mutations at the surface of Bet v 1 (2744) and Bet v 1 (2753).

30 Figur 27 shows circular dichroism (CD) spectra of Bet v 1.2801 (wild type) and Bet v 1 (2744), recorded at nearly equal concentrations.

Figur 28 shows histamine release in human basophil cells of Bet v 1.2801 (wild type), and mutant Bet v 1 (2744).

35 Figur 29 shows histamine release in human basophil cells

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

15

of Bet v 1.2801 (wild type), and mutant Bet v 1 (2744).

Figur 30 shows point mutations at the surface of Bet v 1 (2733).

5

Figure 31 shows primers used for site-directed mutagenesis of Der p 2.

Figure 32 shows a sequence alignment of Der p 2 with other group 2 house dust mite allergens.

10

Figure 33 shows surface contours of Der p 2 from four different angles.

Figure 34 shows surface contours of a Der p 2 mutant from four different angles.

15

Figure 35A and B shows a sequence alignment of Der p 1 with other group 1 house dust mite allergens.

20

Figure 36 shows surface contours of Der p 1 from four different angles.

Figure 37 shows surface contours of a Der p 1 mutant from four different angles.

25

Figure 38A-D shows a sequence alignment of Phl p 5 with other group 5 grass allergens.

Figure 39A and B shows surface contours of Phl p 5 Model A and Model B, respectively, from four different angles.

30

Figure 40A and B shows surface contours of a Phl p 5 mutant Model A and B, respectively, from four different angles.

35

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

16

Figure 41 shows the proliferation of Peripheral Blood Lymphocytes expressed as Stimulation Index (SI) for various Bet v 1 preparations.

5 Figure 42-44 show the cytokine profile of T cells stimulated with various Bet v preparations. Figure 42 shows a patient with a Th0 profile, Figure 43 a Th1 profile and Figure 44 a Th2 profile.

10 OBJECT OF THE INVENTION

Rationale behind the present invention

The current invention is based on a unique rationale.

15 According to this rationale the mechanism of successful allergy vaccination is not an alteration of the ongoing Th2-type immune response, but rather a parallel initiation of a new immune response involving tertiary epitope recognition by B-cells and antibody formation. It

20 is believed that this new immune response is partly a Th1-type immune response. This model is supported by the observation that levels of specific IgE are unaffected by successful vaccination treatment, and that successful treatment is often accompanied by a substantial rise in

25 allergen specific IgG4. In addition, studies of nasal biopsies before and after allergen challenge do not show a reduction in T cells with the Th2-like phenotype, but rather an increase in Th1-like T cells are observed. When the vaccine (or pharmaceutical compositions) is

30 administered through another route than the airways, it is hypothesised, that the new immune response evolves in a location physically separated from the ongoing Th2 response thereby enabling the two responses to exist in parallel.

35 Another important aspect of the immunological system is

the assertion of the existence of so-called dominant IgE binding epitopes. It is proposed that these dominant IgE binding epitopes are constituted by tertiary structure dependent coherent surface areas large enough to
5 accommodate antibody binding and conserved among isoallergens, variants, and/or homologous allergens from related species. The existence of cross-reactive IgE capable of binding similar epitopes on homologous allergens is supported by the clinical observation that
10 allergic patients often react to several closely related species, e.g. alder, birch, and hazel, multiple grass species, or several species of the house dust mite genus *Dermatophagoides*. It is furthermore supported by laboratory experiments demonstrating IgE cross-reactivity
15 between homologous allergens from related species and the capacity of one allergen to inhibit the binding of IgE to homologous allergens (Ipsen et al. 1992, ref. 16). It is well known that exposure and immune responses are related in a dose dependent fashion. Based on the combination of
20 these observations it is hypothesised that conserved surface areas are exposed to the immune system in higher doses than non-conserved surface areas resulting in the generation of IgE antibodies with higher affinities, hence the term 'dominant IgE binding epitopes'.
25
According to this rationale it is essential that the allergen has an α -carbon backbone tertiary structure which essentially is the same as that of the natural allergen, thus ensuring conservation of the surface
30 topology of areas surrounding conserved patches representing targets for mutagenesis aimed at reducing IgE binding. By fulfilling these criteria the allergen has the potential to be administered in relatively higher doses improving its efficacy in generating a protective
35 immune response without compromising safety.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

18

Furthermore, the invention is based on the finding that allergic symptoms are triggered by the cross-linking of allergen with two specific IgE's bound to the surface of effector cells, i.e. mast cells and basophils, via the high affinity IgE receptor, FcεRI. For illustration, we refer to Fig. 15, which depicts a theoretical model of an allergen with IgE binding epitopes. Induction of mediator release from the mast cell and hence allergic symptoms is effected by allergen-mediated cross-linking of IgE bound to the surface of the mast cell, cf. Fig 15A. In the situation shown in Fig. 15B two of the epitopes have been mutated so as to reduce their IgE binding ability, and hence the allergen-mediated cross-linking is prevented. In this connection it should be noted that allergens usually comprise more than three B cell epitopes. However, from the theoretical situation depicted in Fig. 15 it may be assumed that the more epitopes, which have been mutated so as to eliminate or reduce their IgE binding ability, the lower the risk of allergen-mediated cross-linking and resulting allergic symptoms.

However, in order for a mutated allergen to be able to raise the new immune response, including the IgG response, the allergen must comprise at least one intact epitope. Preferably, the intact epitope is a dominant epitope, since such a mutated allergen will provide an improved protection when used for vaccination.

In conclusion, the inventive idea of the present invention is based on the recognition that a mutated allergen having IgE binding reducing mutations in multiple B cell epitopes, and at least one intact epitope, would on the one hand reduce the allergen-mediated cross-linking and on the other hand allow the raising of an IgG response with a binding ability competitive with that of IgE. Thus, the said mutated

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

19

allergen would constitute a highly advantageous allergen in that the risk of anaphylactic reactions would be strongly reduced.

- 5 Also, the present invention is based on the recognition that a vaccine comprising a mixture of different such mutated allergens, wherein ideally many or all epitopes are represented as intact, would be equally efficient in its ability to induce protection against allergic
10 symptoms as the natural occurring allergen from which the mutated allergens are derived.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 15 The present invention relates to the introduction of artificial amino acid substitutions into a number of defined critical positions, i.e. IgE binding epitopes, with the object of reducing the specific IgE binding capability of each mutated epitope.

- 20 The invention provides a recombinant allergen, characterised in that it is a mutant of a naturally occurring allergen, wherein the mutant allergen has at least four primary mutations, which each reduce the
25 specific IgE binding capability of the mutated allergen as compared to the IgE binding capability of the said naturally occurring allergen, wherein each primary mutation is a substitution of one surface-exposed amino acid residue with another residue, which does not occur
30 in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates, wherein each primary mutation is spaced from each other primary mutation by at least 15 Å, and wherein the
35 primary mutations are placed in such a manner that at least one circular surface region with a area of 800 Å²

comprises no mutation.

Without being bound by theory it is believed that the B cell epitopes can be distributed over almost the entire surface of the allergen. Furthermore, there is experimental evidence that at least some epitopes constitute a part of a cluster of epitopes comprising a large number of overlapping epitopes. Therefore, the theoretical basis for the present invention is that any surface-exposed amino acid constitutes a potential site of mutation, which may result in a reduced capability to bind specific IgE.

Accordingly, the primary mutations are defined by their location in respect to each other, i.e. they are spaced apart, to ensure that they are mutations in separate clusters of epitopes.

The present invention also provides a composition comprising two or more recombinant mutant allergen variants according to claim 1, wherein each variant is defined by having at least one principal mutation, which is absent in at least one of the other variants, wherein for each variant no secondary mutation is present within a radius of 15 Å from each absent primary mutation. The composition preferably comprises 2-12, more preferably 3-10, more preferably 4-8 and most preferably 5-7 variants.

The present invention also provides a method of preparing the recombinant allergen according to claim 1, characterised in

a) identifying a number of amino acid residues in a naturally occurring allergen, which has a solvent accessibility of at least 20 %;

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

21

b) selecting at least four of the identified amino acid residues in such a manner that each selected amino acid is spaced from each other selected amino acid by at least 15 Å, and that the selected amino acids are placed in
5 such a manner that at least one circular surface region with a area of 800 Å² comprises no selected amino acid;
and

c) effecting for each of the selected amino acids a
10 primary mutation, which reduce the specific IgE binding capability of the mutated allergen as compared to the binding capability of the said naturally occurring allergen, wherein each primary mutation is a substitution of a selected amino acid residue with another amino acid,
15 which does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates.

20 In an alternative aspect the invention relates to a method of preparing a recombinant allergen according to the invention, characterised in that the allergen is produced from a DNA sequence obtained by DNA shuffling (molecular breeding) of the DNA encoding the
25 corresponding naturally occurring.

Furthermore, the invention relates to a recombinant allergen according to claim 1 for use as a
30 pharmaceutical.

Also, the invention relates to use of the recombinant allergen according to claim 1 for preparing a pharmaceutical for preventing and/or treating allergy.

35 Furthermore, the invention relates to the composition according to claim 37 for use as a pharmaceutical.

Also, the invention relates to the use of a composition according to claim 37 for preparing a pharmaceutical for preventing and/or treating allergy.

5 Further, the invention relates to a pharmaceutical composition, characterised in that it comprises a recombinant allergen according to claim 1 or a composition according to claim 37, optionally in
10 combination with a pharmaceutically acceptable carrier and/or excipient, and optionally an adjuvant. The pharmaceutical composition according to the invention may be in the form of a vaccine against allergic reactions elicited by a naturally occurring allergen in patients
15 suffering from allergy.

Also, the invention relates to a method of generating an immune response in a subject comprising administering to the subject a recombinant allergen according to claim 1,
20 a composition according to claim 37 or a pharmaceutical composition according to claim 41-42 or 46.

Further, the invention relates to vaccination or treatment of a subject comprising administering to the
25 subject a recombinant allergen according to claim 1, a composition according to claim 37 or a pharmaceutical composition according to claim 41-42 or 46.

Also, the invention relates to a process for preparing a
30 pharmaceutical composition according to claim 41 or 42 comprising mixing a recombinant allergen according to claim 1 or a composition according to claim 37 with pharmaceutically acceptable substances and/or excipients.

35 Further, the invention relates to a pharmaceutical composition obtainable by the process according to claim

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

23

45.

Also, the invention relates to a method for the treatment, prevention or alleviation of allergic reactions in a subject comprising administering to a subject a recombinant allergen according to claim 1, a composition according to claim 37 or a pharmaceutical composition according to claims 41-42 or 46.

10 Further, the invention relates to a DNA sequence encoding an allergen according to invention, a derivative thereof, a partial sequence thereof, a degenerated sequence thereof or a sequence, which hybridises thereto under stringent conditions, wherein said derivative, partial
15 sequence, degenerated sequence or hybridising sequence encodes a peptide having at least one B cell epitope.

Also, the invention relates to an expression vector comprising the DNA according to the invention.

20 Furthermore, the invention relates to a host cell comprising the expression vector according to the invention.

25 Additionally, the invention relates to a method of producing a recombinant mutant allergen comprising the step of cultivating the host cell according to the invention.

30 Finally, the invention relates to a recombinant allergen according to the invention or encoded by the DNA sequence according to the invention comprising at least one T cell epitope capable of stimulating a T cell clone or T cell line specific for the naturally occurring allergen.

35 The mutants according to invent should preferable be able to stimulate allergen specific T-cell lines in a similar

manner/degree as measured by the T-cell stimulation index.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5

In a preferred embodiment of the invention, the primary mutations are spaced 20 Å, preferably 25 Å and most preferably 30 Å.

10 It is believed that an allergen comprises a number of potential binding regions for specific IgE's, wherein each region approximately has a size of 800 Å², each surface region comprising a large number of overlapping epitopes. Thus, an allergen has a number of potential
15 primary mutations of the surface area divided by 800 Å².

Preferably, the recombinant allergen according to the invention comprises from 5 to 20, preferably from 6 to 15, more preferably from 7 to 12, and most preferably
20 from 8 to 10 primary mutations.

In a preferred embodiment of the invention, the surface region comprising no mutation has an area of 700 Å², preferably 600 Å², more preferably 500 Å² and most
25 preferably 400 Å².

In a preferred embodiment of the invention, the recombinant allergen comprises a number of secondary mutations, which each reduce the specific IgE binding
30 capability of the mutated allergen as compared to the binding capability of the said naturally occurring allergen, wherein each secondary mutation is a substitution of one surface-exposed amino acid residue with another residue, which does not occur in the same
35 position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

25

which said naturally occurring allergen originates, wherein the secondary mutations are placed outside the said circular region.

5 The secondary mutations may be located close to a primary mutation, i.e. a secondary mutation may well be an additional mutation for the same epitope, which is mutated by the primary mutation.

10 In a preferred embodiment of the invention, at least one of the surface-exposed amino acids to be substituted in the naturally occurring allergen has a solvent accessibility of above 20 %, preferably above 30 %, more preferably above 40 % and most preferably above 50 %.

15 In another preferred embodiment of the invention, at least one of the surface-exposed amino acids to be substituted in the naturally occurring allergen is conserved with more than 70 %, preferably 80 % and most preferably 90 % identity in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates.

20 Preferably, the recombinant allergen according to invention essentially has the same α -carbon backbone tertiary structure as said naturally occurring allergen.

When comparing the α -carbon backbone tertiary structures of the mutant and the naturally occurring allergen molecules, the average root mean square deviation of the atomic coordinates is preferably below 2Å.

35 In a preferred embodiment of the recombinant allergen of the invention, each amino acid residue to be incorporated into the mutant allergen does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

26

homologous protein within the taxonomic genus, preferably the subfamily, more preferably the family, more preferably the superfamily, more preferably the legion, more preferably the suborder and most preferably the order from which said naturally occurring allergen originates.

In a preferred embodiment of the invention the recombinant mutant allergen according to the invention is a non-naturally occurring allergen.

Specific IgE binding to the mutated allergen is preferably reduced by at least 5%, preferably at least 10% in comparison to naturally-occurring isoallergens or similar recombinant proteins in an immuno assay with sera from source-specific IgE reactive allergic patients or pools thereof.

Another way of assessing the reduced IgE binding and the reduced ability of mediating cross-linking of the mutant are the capability of the mutant to initiate Histamine Release (HR). The release of Histamine can be measured in several Histamine releasing assays. The reduced Histamine release of the mutants originates from reduced affinity toward the specific IgE bound to the cell surface as well as their reduced ability to facilitate cross-linking. HR is preferably reduced by 5-100%, more preferably 25-100%, more preferably 50-100% and most preferably 75-100% for the mutants of the invention in comparison to the naturally occurring allergens.

Typically, the circular surface region with an area of 800 Å² comprising no mutation comprises atoms of 15-25 amino acid residues.

A preferred recombinant allergen according to the

invention is characterised in that the surface-exposed amino acid residues are ranked with respect to solvent accessibility, and that one or more amino acids among the more solvent accessible ones are substituted.

5

A further preferred recombinant allergen according to the invention is characterised in that the surface-exposed amino acid residues are ranked with respect to degree of conservation in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates, and that one or more amino acids among the more conserved ones are substituted.

Preferably, the recombinant allergen according to the invention comprises from 1 to 4 secondary mutations per primary mutation.

A preferred embodiment of the invention is characterised in that one or more of the substitutions is carried out by site-directed mutagenesis.

20

Another preferred embodiment of the invention is characterised in that one or more of the substitutions is carried out by random mutagenesis.

25

A further preferred embodiment of the invention is characterised in that one or more of the substitutions is carried out by DNA shuffling.

Recombinant allergens according to the invention may suitably be a mutant of an inhalation allergen originating i.a. from trees, grasses, herbs, fungi, house dust mites, cockroaches and animal hair and dandruff. Important pollen allergens from trees, grasses and herbs are such originating from the taxonomic orders of *Fagales*, *Oleales* and *Pinales* including i.a. birch

30
35

(*Betula*), alder (*Alnus*), hazel (*Corylus*), hornbeam (*Carpinus*) and olive (*Olea*), the order of *Poales* including i.a. grasses of the genera *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis* and *Secale*, the orders of *Asterales* and

5 *Urticales* including i.a. herbs of the genera *Ambrosia* and *Artemisia*. Important inhalation allergens from fungi are i.a. such originating from the genera *Alternaria* and *Cladosporium*. Other important inhalation allergens are those from house dust mites of the genus

10 *Dermatophagoides*, those from cockroaches and those from mammals such as cat, dog and horse. Further, recombinant allergens according to the invention may be mutants of venom allergens including such originating from stinging or biting insects such as those from the taxonomic order

15 of *Hymenoptera* including bees (superfamily *Apidae*), wasps (superfamily *Vespidae*), and ants (superfamily *Formicoidae*).

Specific allergen components include e.g. *Bet v 1* (*B. verrucosa*, birch), *Aln g 1* (*Alnus glutinosa*, alder), *Cor a 1* (*Corylus avelana*, hazel) and *Car b 1* (*Carpinus betulus*, hornbeam) of the *Fagales* order. Others are *Cry j 1* (*Pinales*), *Amb a 1* and 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* and 5, *Pas n 1*, *Phl p 1* and 5, *Poa p 1*, 2 and 5, *Sec c 1* and 5, and *Sor h 1* (various grass pollens), *Alt a 1* and *Cla h 1* (fungi), *Der f 1* and 2, *Der p 1* and 2 (house dust mites, *D. farinae* and *D. pteronyssinus*, respectively), *Lep d 1* and 2

30 (*Lepidoglyphus destructor*; storage mite), *Bla g 1* and 2, *Per a 1* (cockroaches, *Blattella germanica* and *Periplaneta americana*, respectively), *Fel d 1* (cat), *Can f 1* (dog), *Equ c 1*, 2 and 3 (horse), *Apis m 1* and 2 (honeybee), *Ves v 1*, 2 and 5, *Pol a 1*, 2 and 5 (all wasps) and *Sol i 1*, 2, 3 and 4 (fire ant).

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

29

In one embodiment, the recombinant allergen is a mutant of *Bet v 1*. Amino acids potentially suitable for substitution comprise amino acids V2, D72, E87, K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, D-125, 5 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-10 137, E-141, E-87 and E-73. One or more of the primary and secondary substitutions may be selected from the group consisting of 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, 15 K103V, P108G, D109N, K123I, D125Y, K129N, K134E, R145E, S149R, S149T, D156H and +160N, wherein + means that an additional amino acid is incorporated.

Examples of *Bet v 1* mutants according to the present invention are as follows (parentheses, when used, indicate primary and secondary mutations):

Mutant A:
(Asn28Thr, Lys32Gln), (Asn78Lys, Lys103Val), Arg145Glu, 25 (Asp156His, +160Asn).

Mutant B:
Tyr5Val, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, 30 Lys123Ile, Lys134Glu, Asp156His.

Mutant 2595 (Example 2):
N28T, K32Q, E45S, P108G

Mutant 2628 (Example 4):
35 Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

30

Mutant 2637 (Example 4):

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

5 Mutant 2724:

N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H, +160N.

Mutant 2733 (Example 4):

(Tyr5Val, Lys134Glu), (Asn28Thr, Lys32Gln), Glu45Ser,
10 Lys65Asn, (Asn78Lys, Lys103Val), Lys97Ser, Pro108Gly,
Arg145Glu, (Asp156His, +160Asn)

Mutant 2744: (Tyr5Val, Lys134Glu), (Glu42Ser, Glu45Ser),
(Asn78Lys, Lys103Val), Lys123Ile, (Asp156His, +160Asn).

15

Mutant 2753 (Example 4):

(Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, (Glu96Leu, Lys97Ser),
(Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser),
Arg145Glu.

20

Mutant 2744 + 2595:

Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V, P108G, K123I,
K134E, D156H, +160N.

25 Mutant 2744 + 2628:

Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, K123I, K134E,
D156H, +160N.

Mutant 2744 + 2595 + 2628:

30 Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V,
P108G, K123I, K134E, D156H, +160N.

Furthermore, all of the above mutants comprising one or
more of the following substitutions: V2F, V2L, V2I, V2M,

35 T10A, K20N, Q36A or Q36K, D72H, D72Q, D72N, E87G, K129N
and S149R or S149T.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

31

In another embodiment, the recombinant allergen is derived from a venom allergen from the taxonomic order of Vespidae, Apidae and Formicoidae.

5

In a further embodiment, the recombinant allergen is derived from Ves v 5. Amino acids potentially suitable for substitution comprise amino acids Amino acids potentially suitable for substitution comprise amino acids 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. One or more of the primary and secondary substitutions may be selected from the group consisting of K29A, T67A, K78A, V84S, Y102A, K112S, K144A, K202M and N203G.

25

In a further embodiment, the recombinant allergen is derived from Der p 2. Amino acids potentially suitable for substitution comprise amino acids 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-

35

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

32

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. One or more of the primary and secondary substitutions may be selected from the group consisting of K6A, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N and R128Q.

Examples of Bet v 1 mutants according to the present invention are as follows:

10

Mutant A:

K6A, K15E, H30N, E62S.

Mutant B:

15

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

Mutant C:

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

20

Vaccines

Preparation of vaccines is generally well known in the art. Vaccines are typically prepared as injectables either as liquid solutions or suspensions. Such vaccine may also be emulsified or formulated so as to enable nasal administration as well as oral, including buccal and sublingual, administration. The immunogenic component in question (the recombinant allergen as defined herein) may suitably be mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and further compatible with the active ingredient. Examples of suitable excipients are water, saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like as well as combinations thereof. The vaccine may additionally contain other substances such as wetting agents, emulsifying agents, buffering agents or adjuvants enhancing the effectiveness of the vaccine.

Vaccines are most frequently administered parenterally by subcutaneous or intramuscular injection. Formulations which are suitable for administration by another route include oral formulations and suppositories. Vaccines for oral administration may suitably be formulated with excipients normally employed for such formulations, e.g. pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate and the like. The composition can be formulated as solutions, suspensions, emulsions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations, aerosols, powders, or granulates.

The vaccines are administered in a way so as to be compatible with the dosage formulation and in such amount as will be therapeutically effective and immunogenic. The quantity of active component contained within the vaccine depends on the subject to be treated, i.e. the capability of the subject's immune system to respond to the treatment, the route of administration and the age and weight of the subject. Suitable dosage ranges can vary within the range from about 0.0001 µg to 1000 µg.

As mentioned above, an increased effect may be obtained by adding adjuvants to the formulation. Examples of such adjuvants are aluminum hydroxide and phosphate (alum) or calcium phosphate as a 0.05 to 0.1 percent solution in phosphate buffered saline, synthetic polymers of sugars or polylactid glycolid (PLG) used as 0.25 percent solution. Mixture with bacterial cells such as *C. parvum*, endotoxins or lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria, emulsion in physiologically acceptable oil vehicles such as mannide monooleate (Aracel A) or emulsion with 20 percent solution of a perfluorocarbon (e.g. Fluosol-DA) used as a block substitute may also be

employed. Oil emulsions, such as MF-59 may also be used. Other adjuvants such as Freund's complete and incomplete adjuvants as well as saponins, such as QuilA, Qs-21 and ISCOM, and RIBI may also be used.

5 Most often, multiple administrations of the vaccine will be necessary to ensure an effect. Frequently, the vaccine is administered as an initial administration followed by subsequent inoculations or other administrations. The
10 number of vaccinations will typically be in the range of from 1 to 50, usually not exceeding 35 vaccinations. Vaccination will normally be performed from biweekly to bimonthly for a period of 3 months to 5 years. This is contemplated to give desired level of prophylactic or
15 therapeutic effect.

The recombinant allergen may be used as a pharmaceutical preparation, which is suitable for providing a certain protection against allergic responses during the period
20 of the year where symptoms occur (prophylaxis). Usually, the treatment will have to be repeated every year to maintain the protective effect. Preparations formulated for nasal, oral and sublingual application are particular suited for this purpose.

25 Method of preparing a recombinant allergen according to the invention

As mentioned above, the present invention also relates to
30 a method of preparing the recombinant mutant allergen of the invention, cf. claim 48.

The surface-exposed amino acids suitable for substitution in accordance with the present invention may be
35 identified on the basis of information of their solvent (water) accessibility, which expresses the extent of

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

35

surface exposure. A preferred embodiment of the method of the invention is characterised in ranking the said identified amino acid residues with respect to solvent accessibility and substituting one or more amino acids among the more solvent accessible ones.

A second parameter, which may contribute to the identification of surface-exposed amino acids suitable for substitution in accordance with the present invention is the extent in which an amino acid is conserved in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates. Alternatively, the extent in which in all known homologous proteins within the taxonomic genus, subfamily, family, superfamily, legion suborder or order from which said naturally occurring allergen originates is used as such a second parameter.

Accordingly, a preferred embodiment of the method of the invention is characterised in selecting identified amino acid residues, which are conserved with more than 70 %, preferably more than 80 % and most preferably more than 90 % identity in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates.

Furthermore, a particularly preferred embodiment of the method of the invention is characterised in ranking the said identified amino acid residues with respect to degree of conservation in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates and substituting one or more amino acids among the more conserved ones.

A further preferred embodiment of the method of the invention comprises selecting the identified amino acids

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

36

so as to form a mutant allergen, which has essentially the same α -carbon backbone tertiary structure as said naturally occurring allergen.

- 5 Another preferred embodiment of the method of the invention is characterised in that the substitution of amino acid residues is carried out by site-directed mutagenesis.
- 10 An alternative preferred embodiment of the method of the invention is characterised in that the substitution of amino acid residues is carried out by DNA shuffling.

Criteria for substitution

- 15 For molecules for which the tertiary structure has been determined (e.g. by x-ray crystallography, or NMR electron microscopy), the mutant carrying the substituted amino acid(s) should preferably fulfil the following
- 20 criteria:
1. The overall α -carbon backbone tertiary structure of the molecule is preferably conserved. Conserved is defined as an average root mean square deviation of the
- 25 atomic coordinates comparing the structures below 2Å. This is important for two reasons: a) It is anticipated that the entire surface of the natural allergen constitutes an overlapping continuum of potential antibody-binding epitopes. The majority of the surface of
- 30 the molecule is not affected by the substitution(s), and thus retain its antibody-binding inducing properties, which is important for the generation of new protective antibody specificities being directed at epitopes present
- 35 also on the natural allergen. b) Stability, both concerning shelf-life and upon injection into body fluids.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

37

2. The amino acids to be substituted are preferably located at the surface, and thus accessible for antibody-binding. Amino acids located on the surface in the three-dimensional structure usually have a solvent (water) accessibility of at least 20%, suitably 20-80%, more suitably 30-80%. Solvent accessibility is defined as the area of the molecule accessible to a sphere with a radius comparable to a solvent (water, $r = 1.4 \text{ \AA}$) molecule.
3. Each of the substituted amino acids is preferably located in conserved patches having an area larger than $400 \text{ \AA}^2$. Conserved patches are defined as coherently connected areas of surface-exposed conserved amino acid residues and backbone. Conserved amino acid residues are defined by sequence alignment of all known (deduced) amino acid sequences of homologues proteins within the same taxonomic species, genus, subfamily, family, superfamily, legion, suborder or order. Amino acid positions having identical amino acid residues in more than 70% of the sequences are considered conserved. Conserved patches are expected to contain epitopes to which the IgE of the majority of patients is directed.
- Conservation of α -carbon backbone tertiary structure is best determined by obtaining identical structures by x-ray crystallography or NMR before and after mutagenesis. In absence of structural data describing the mutant indistinguishable CD-spectra or immunochemical data, e.g. antibody reactivity, may render conservation of α -carbon backbone tertiary structure probable, if compared to the data obtained by analysis of a structurally determined molecule.
4. Within the conserved patches amino acids for mutagenesis should preferentially be selected among the

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

38

most solvent (water) accessible ones located preferably near the centre of the conserved patch.

5 Preferentially, a polar amino acid residue is substituted by another polar residue, and a non-polar amino acid residue is substituted by another non-polar residue.

10 With an object of essentially retaining the three-dimensional structure of the allergen, the amino acid to be incorporated may be selected on the basis of a comparison with a protein, which is a structural homologue to the allergen, e.g. a protein, which belongs to the same taxonomic order as the allergen, and which
15 does not have any cross-reactivity with the allergen.

DNA according to the invention

20 In a preferred embodiment, the DNA sequence of the invention is a derivative of the DNA sequence encoding the naturally occurring allergen.

Preferably, the DNA derivative is obtained by site-directed or random mutagenesis of the DNA encoding the
25 naturally occurring allergen.

In a first particularly preferred embodiment, the DNA sequence is a derivative of the sequence shown in Fig. 3, wherein the DNA sequence is mutated so as to encode an
30 allergen having at least four mutations selected from the group consisting of 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,
35 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.

In a second particularly preferred embodiment, the DNA sequence is a derivative of the sequence shown in Fig. 13, wherein the DNA sequence is mutated so as to encode an allergen having at least four mutations selected from the group consisting of 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.

In a third particularly preferred embodiment, the DNA sequence is a derivative of the sequence shown in Fig. 16, wherein the DNA sequence is mutated so as to encode an allergen having at least four mutations selected from the group consisting of 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.

DNA shuffling

The recombinant mutant allergen according to the present invention may be produced using a DNA sequence obtained by DNA shuffling (molecular breeding) of the
5 corresponding naturally DNA. DNA shuffling may be carried out according to the procedures disclosed in the article by Punnonen et al. (ref. 25) as well as the procedures disclosed in the articles mentioned therein, which are all included herein by this reference.

10

Diagnostic assay

Furthermore, the recombinant mutant allergens according to the invention have diagnostic possibilities and
15 advantages. Prior art allergy vaccines are based on extracts of the naturally occurring allergen source, and thus represent a wide variety of isoforms. The allergic individual has initially been sensitised and has IgE to one or some of the isoforms present. Some of the isoforms
20 may be relevant with respect to the allergic reactions of the allergic individual due to homology and subsequent cross-reactivity with the isoform to which the individual is allergic, whereas other isoforms may be irrelevant as they do not harbour any of the IgE binding epitopes to
25 which the allergic individual has specific IgE. Due to this heterogeneity of the specificities of the IgE population, some isoforms may therefore be safe to administer, i.e. they do not result in an allergic response via IgE, whereas other isoforms may be harmful
30 causing undesirable side-effects.

Thus, the mutants of the invention and the compositions of the invention intended to be administered therapeutically may also be used for an in vivo or in
35 vitro diagnostic assay to monitor the relevance, safety or outcome of a treatment with such mutants or

compositions. Diagnostic samples to be applied include body samples, such as sera.

Thus, the invention also relates to a diagnostic assay
5 for assessing relevance, safety or outcome of therapy of a subject using a recombinant mutant allergen according to the invention or a composition according to the invention, wherein an IgE containing sample of the subject is mixed with said mutant or said composition and
10 assessed for the level of reactivity between the IgE in said sample and said mutant. The assessing of the level of reactivity between the IgE in the sample and the mutant may be carried out using any known immunoassay.

15 Definitions

In connection with the present invention the expression "reduce the specific IgE binding capability as compared to the IgE binding capability of the said natural-
20 occurring allergen" means that the reduction is measurable in a statistically significant manner ($p < 0.05$) in at least one immunoassay using serum from a subject allergic to the natural-occurring allergen. Preferably, the IgE binding capability is reduced by at
25 least 5 %, more preferably at least 10 %.

The expression "surface-exposed amino acid" means that the amino acid residue is located at the surface of the three-dimensional structure in such a manner that when
30 the allergen is in solution at least a part of at least one atom of the amino acid residue is accessible for contact with the surrounding solvent. Preferably, the amino acid residue in the three-dimensional structure has a solvent (water) accessibility of at least 20%, suitably
35 at least 30 %, more suitably at least 40 % and most preferably at least 50 %.

The expression "solvent accessibility" is defined as the area of the molecule accessible to a sphere with a radius comparable to a solvent (water, $r = 1.4 \text{ \AA}$) molecule.

5

The expressions "surface-exposed" and "solvent-exposed" are used interchangeably.

The expression "the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates" means species in the taxonomic system.

Furthermore, the expression "said mutant allergen having essentially the same α -carbon backbone tertiary structure as said naturally occurring allergen" means that when comparing the structures, the average root mean square deviation of the atomic coordinates is below 2 $\text{\AA}$.

In connection with the present invention the expression "substitution" means the deletion, substitution or addition of an amino acid in comparison to the amino acid sequence of the naturally occurring allergen.

The present invention is further illustrated by the following non-limiting examples.

25

EXAMPLES

EXAMPLE 1

30

Example 1 describes the preparation of recombinant mutant allergens with one and three primary mutations. Recombinant mutant allergens according to the invention, i.e. allergens comprising at least four primary mutations, may be prepared using the same procedures.

35

Identification of common epitopes within Fagales pollen allergens

The major birch pollen allergen *Bet v 1* shows about 90% amino acid sequence identity with major allergens from pollens of taxonomically related trees, i.e. *Fagales* (for instance hazel and hornbeam) and birch pollen allergic patients often show clinical symptoms of allergic cross-reactivity towards these *Bet v 1* homologous proteins.

Bet v 1 also shows about 50-60% sequence identity with allergic proteins present in certain fruits (for instance apple and cherry) and vegetables (for instance celery and carrot) and there are clinical evidence for allergic cross-reactivity between *Bet v 1* and these food related proteins.

In addition, *Bet v 1* shares significant sequence identity (20-40%) with a group of plant proteins called pathogenesis-related proteins (PR-10), however there are no reports of allergic cross-reactivity towards these PR-10 proteins.

Molecular modelling suggests that the structures of *Fagales* and food allergens and PR-10 proteins are close to being identical with the *Bet v 1* structure.

The structural basis for allergic *Bet v 1* cross-reactivity was reported in (Gajhede et al 1996, ref. 17) where three patches on the molecular surface of *Bet v 1* could be identified to be common for the known major tree pollen allergens. Thus, any IgE recognising these patches on *Bet v 1* would be able to cross-react and bind to other *Fagales* major pollen allergens and give rise to allergic symptoms. The identification of these common patches was performed after alignment of all known amino acid

sequences of the major tree pollen allergens in combination with an analysis of the molecular surface of *Bet v 1* revealed by the α -carbon backbone tertiary structure reported in ref. 17. In addition, the patches
5 were defined to have a certain minimum size ($>400 \text{ \AA}^2$) based on the area covered by an antibody upon binding.

Selection of amino acid residues for site-directed mutagenesis

10 Amino acid residues for site-directed mutagenesis were selected among residues present in *Bet v 1* specific areas and the common patches since modifications of these is expected to affect the binding of serum IgE from the
15 majority of patients showing clinical tree pollen allergic cross-reactivity.

The relative orientation and percentage of solvent-exposure of each amino acid residue within respective
20 patch was calculated based on their atomic coordinates. Residues having a low degree of solvent exposure ($<20\%$) were not regarded relevant for mutagenesis due to the possible disruption of the structure or lack of antibody interaction. The remaining residues were ranked according
25 to their degree of solvent-exposure.

Sequence alignment

Sequences homologous to the query sequence (*Bet v 1* No. 2801, WHO IUIS Nomenclature Subcommittee on Allergens)
30 were derived from GenBank and EMBL sequence databases by a BLAST search (Altschul et al., ref. 18). All sequences with BLAST reported probabilities less than 0.1 were taken into consideration and one list were constructed
35 containing a non-redundant list of homologous sequences. These were aligned by CLUSTAL W (Higgins et al., ref. 19)

and the percentage identity were calculated for each position in the sequence considering the complete list or taxonomically related species only. A total of 122 sequences were homologous to *Bet v 1* No. 2801 of which 57 sequences originates from taxonomically related species.

Cloning of the gene encoding Bet v 1

RNA was prepared from *Betula verrucosa* pollen (Allergon, Sweden) by phenol extraction and LiCl precipitation. Oligo(dT)-cellulose affinity chromatography was performed batch-wise in Eppendorph tubes, and double-stranded cDNA was synthesised using a commercially available kit (Amersham). DNA encoding *Bet v 1* was amplified by PCR and cloned. In brief, PCR was performed using cDNA as template, and primers designed to match the sequence of the cDNA in positions corresponding to the amino terminus of *Bet v 1* and the 3'-untranslated region, respectively. The primers were extended in the 5'-ends to accommodate restriction sites (*NcoI* and *HindIII*) for directional cloning into pKK233-2.

Subcloning into pMAL-c

The gene encoding *Bet v 1* was subsequently subcloned into the maltose binding protein fusion vector pMAL-c (New England Biolabs). The gene was amplified by PCR and subcloned in frame with *malE* to generate maltose binding protein (MBP)-*Bet v 1* protein fusion operons in which MBP and *Bet v 1* were separated by a factor X_a protease cleavage site positioned to restore the authentic aminoterminal sequence of *Bet v 1* upon cleavage, as described in ref. 15. In brief, PCR was performed using pKK233-3 with *Bet v 1* inserted as template and primers corresponding to the amino- and carboxyterminus of the protein, respectively. The promoter proximal primer was

extended in the 5'-end to accommodate 4 codons encoding an in frame factor X_a protease cleavage site. Both primers were furthermore extended in the 5'-ends to accommodate restriction sites (*KpnI*) for cloning. The
5 *Bet v 1* encoding genes were subcloned using 20 cycles of PCR to reduce the frequency of PCR artefacts.

In vitro mutagenesis

10 *In vitro* mutagenesis was performed by PCR using recombinant pMAL-c with *Bet v 1* inserted as template. Each mutant *Bet v 1* gene was generated by 3 PCR reactions using 4 primers.

15 Two mutation-specific oligonucleotide primers were synthesised accommodating each mutation, one for each DNA strand, see Figs. 1 and 2. Using the mutated nucleotide(s) as starting point both primers were extended 7 nucleotides in the 5'-end and 15 nucleotides
20 in the 3'-end. The extending nucleotides were identical in sequence to the *Bet v 1* gene in the actual region.

Two generally applicable primers (denoted "all-sense" and "all non-sense" in Figure 2) were furthermore synthesised
25 and used for all mutants. These primers were 15 nucleotides in length and correspond in sequence to regions of the pMAL-c vector approximately 1 kilobase upstream and downstream from the *Bet v 1*. The sequence of the upstream primer is derived from the sense strand and
30 the sequence of the downstream primer is derived from the non-sense strand, see Fig. 2.

Two independent PCR reactions were performed essentially according to standard procedures (Saiki et al 1988, ref.
35 20) with the exception that only 20 temperature cycles were performed in order to reduce the frequency of PCR

artefacts. Each PCR reaction used pMAL-c with *Bet v 1* inserted as template and one mutation-specific and one generally applicable primer in meaningful combinations.

5 Introduction of the four amino acid substitutions (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly) in the Triple-patch mutant were performed like described above in a step by step process. First the Glu45Ser mutation then the Pro108Gly mutation and last the Asn28Thr, Lys32Gln
10 mutations were introduced using pMAL-c with inserted *Bet v 1* No. 2801, *Bet v 1* (Glu45Ser), *Bet v 1* (Glu45Ser, Pro108Gly) as templates, respectively.

The PCR products were purified by agarose gel
15 electrophoresis and electro-elution followed by ethanol precipitation. A third PCR reaction was performed using the combined PCR products from the first two PCR reactions as template and both generally applicable primers. Again, 20 cycles of standard PCR were used. The
20 PCR product was purified by agarose gel electrophoresis and electro-elution followed by ethanol precipitation, cut with restriction enzymes (*BsiWI/EcoRI*), and ligated directionally into pMAL-c with *Bet v 1* inserted restricted with the same enzymes.

25 Figure 3 shows an overview of all 9 *Bet v 1* mutations, which are as follows

Thr10Pro, Asp25Gly, Asn28Thr + Lys32Gln, Glu45Ser,
30 Asn47Ser, Lys55Asn, Glu60Ser (non-patch), Thr77Ala and Pro108Gly. An additional mutant with four mutations was also prepared (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly). Of these, five mutants were selected for further testing: Asn28Thr + Lys32Gln, Glu45Ser, Glu60Ser, Pro108Gly and
35 the Triple-patch mutant Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

48

Nucleotide sequencing

Determination of the nucleotide sequence of the *Bet v 1* encoding gene was performed before and after subcloning, and following in vitro mutagenesis, respectively.

Plasmid DNA's from 10 ml of bacterial culture grown to saturation overnight in LB medium supplemented with 0.1 g/l ampicillin were purified on Qiagen-tip 20 columns and sequenced using the Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB) following the recommendations of the suppliers.

Expression and purification of recombinant *Bet v 1* and mutants

Recombinant *Bet v 1* (*Bet v 1* No. 2801 and mutants) were over-expressed in *Escherichia coli* DH 5a fused to maltose-binding protein and purified as described in ref. 15. Briefly, recombinant *E.coli* cells were grown at 37°C to an optical density of 1.0 at 436 nm, whereupon expression of the *Bet v 1* fusion protein was induced by addition of IPTG. Cells were harvested by centrifugation 3 hours post-induction, re-suspended in lysis buffer and broken by sonication. After sonication and additional centrifugation, recombinant fusion protein was isolated by amylose affinity chromatography and subsequently cleaved by incubation with Factor Xa (ref. 15). After F Xa cleavage, recombinant *Bet v 1* was isolated by gel filtration and if found necessary, subjected to another round of amylose affinity chromatography in order to remove trace amounts of maltose-binding protein.

Purified recombinant *Bet v 1* was concentrated by ultrafiltration to about 5 mg/ml and stored at 4 °C. The final yields of the purified recombinant *Bet v 1*

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

49

preparations were between 2-5 mg per litre *E. coli* cell culture.

The purified recombinant Bet v 1 preparations appeared as single bands after silver-stained SDS-polyacrylamide electrophoresis with an apparent molecular weight of 17.5 kDa. N-terminal sequencing showed the expected sequences as derived from the cDNA nucleotide sequences and quantitative amino acid analysis showed the expected amino acid compositions.

We have previously shown (ref. 15) that recombinant Bet v 1 No. 2801 is immunochemically indistinguishable from naturally occurring Bet v 1.

Immuno-electrophoresis using rabbit polyclonal antibodies

The seven mutant Bet v 1 were produced as recombinant Bet v 1 proteins and purified as described above and tested for their reactivity towards polyclonal rabbit antibodies raised against Bet v 1 isolated from birch pollen. When analysed by immuno-electrophoresis (rocket-line immuno-electrophoresis) under native conditions, the rabbit antibodies were able to precipitate all mutants, indicating that the mutants had conserved α -carbon backbone tertiary structure.

In order to analyse the effect on human polyclonal IgE-response, the mutants Glu45Ser, Pro108Gly, Asn28Thr+Lys32Gln and Glu60Ser were selected for further analysis.

Bet v 1 Glu45Ser mutant

Glutamic acid in position 45 show a high degree of solvent-exposure (40%) and is located in a molecular

surface patch common for *Fagales* allergens (patch I). A serine residue was found to occupy position 45 in some of the *Bet v 1* homologous PR-10 proteins arguing for that glutamic acid can be replaced by serine without distortion of the α -carbon backbone tertiary structure. In addition, as none of the known *Fagales* allergen sequences have serine in position 45, the substitution of glutamic acid with serine gives rise to a non-naturally occurring *Bet v 1* molecule.

10 T cell proliferation assay using recombinant Glu45Ser *Bet v 1* mutant

The analysis was carried out as described in Spangfort et al 1996a. It was found that recombinant *Bet v 1* Glu45Ser mutant was able to induce proliferation in T cell lines from three different birch pollen allergic patients with stimulation indices similar to recombinant and naturally occurring.

20 Crystallisation and structural determination of recombinant Glu45Ser *Bet v 1*

Crystals of recombinant Glu45Ser *Bet v 1* were grown by vapour diffusion at 25°C, essentially as described in (Spangfort et al 1996b, ref. 21). Glu45Ser *Bet v 1*, at a concentration of 5 mg/ml, was mixed with an equal volume of 2.0 M ammonium sulphate, 0.1 M sodium citrate, 1% (v/v) dioxane, pH 6.0 and equilibrated against 100x volume of 2.0 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium citrate, 1% (v/v) dioxane, pH 6.0. After 24 hours of equilibration, crystal growth was induced by applying the seeding technique described in ref. 21, using crystals of recombinant wild-type *Bet v 1* as a source of seeds.

35 After about 2 months, crystals were harvested and

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

51

analysed using X-rays generated from a Rigaku rotating anode as described in ref. 21 and the structure was solved using molecular replacement.

5 Structure of Bet v 1 Glu45Ser mutant

The structural effect of the mutation was addressed by growing three-dimensional Bet v 1 Glu45Ser protein crystals diffracting to 3.0 Å resolution when analysed by
10 X-rays generated from a rotating anode. The substitution of glutamic acid to serine in position 45 was verified by the Bet v 1 Glu45Ser structure electron density map which also showed that the overall α -carbon backbone tertiary structure is preserved.

15 IgE-binding properties of Bet v 1 Glu45Ser mutant

The IgE-binding properties of Bet v 1 Glu45Ser mutant was compared with recombinant Bet v 1 in a fluid-phase IgE-
20 inhibition assay using a pool of serum IgE derived from birch allergic patients.

Recombinant Bet v 1 no. 2801 was biotinylated at a molar ratio of 1:5 (Bet v 1 no. 2801:biotin). The inhibition
25 assay was performed as follows: a serum sample (25 μ l) was incubated with solid phase anti IgE, washed, re-suspended and further incubated with a mixture of biotinylated Bet v 1 no. 2801 (3.4 nM) and a given mutant (0-28.6 nM). The amount of biotinylated Bet v 1 no. 2801
30 bound to the solid phase was estimated from the measured RLU after incubation with acridinium ester labelled streptavidin. The degree of inhibition was calculated as the ratio between the RLU's obtained using buffer and mutant as inhibitor.

35 Figure 4 shows the inhibition of the binding of

biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Glu45Ser mutant.

- 5 There is a clear difference in the amount of respective recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool. Recombinant *Bet v 1* reaches 50% inhibition at about 6.5 ng whereas the corresponding concentration for *Bet v 1* Glu45Ser mutant is about 12 ng. This show that the point mutation introduced in *Bet v 1* Glu45Ser mutant lowers the affinity for specific serum IgE by a factor of about 2. The maximum level of inhibition reached by the *Bet v 1* Glu45Ser mutant is clearly lower compared to recombinant *Bet v 1*. This may indicate that after the Glu45Ser substitution, some of the specific IgE present in the serum pool are unable to recognise the *Bet v 1* Glu45Ser mutant.

20 *Bet v 1* mutant Asn28Thr+Lys32Gln

- Aspartate and lysine in positions 28 and 32, respectively show a high degree of solvent-exposure (35% and 50%, respectively) and are located in a molecular surface patch common for *Fagales* allergens (patch II). In the structure, aspartate 28 and lysine 32 are located close to each other on the molecular surface and most likely interact via hydrogen bonds. A threonine and a glutamate residue were found to occupy positions 28 and 32, respectively in some of the *Bet v 1* homologous PR-10 proteins arguing for that aspartate and lysine can be replaced with threonine and glutamate, respectively without distortion of the α -carbon backbone tertiary structure. In addition, as none of the naturally occurring isoallergen sequences have threonine and glutamate in positions 28 and 32, respectively, the

substitutions gives rise to a non-naturally occurring *Bet v 1* molecule.

IgE-binding properties of *Bet v 1* mutant

5 *Asn28Thr+Lys32Gln*

The IgE-binding properties of mutant *Asn28Thr+Lys32Gln* was compared with recombinant *Bet v 1* in a fluid-phase IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived
10 from birch allergic patients described above.

Figure 5 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by
15 *Bet v 1* mutant *Asn28Thr+Lys32Gln*.

There is a clear difference in the amount of respective recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool.
20 Recombinant *Bet v 1* reaches 50% inhibition at about 6.5 ng whereas the corresponding concentration for *Bet v 1* mutant *Asn28Thr+Lys32Gln* is about 12 ng. This show that the point mutations introduced in *Bet v 1* mutant *Asn28Thr+Lys32Gln* lowers the affinity for specific serum
25 IgE by a factor of about 2.

The maximum level of inhibition reached by the *Bet v 1* mutant *Asn28Thr+Lys32Gln* mutant is clearly lower compared to recombinant *Bet v 1*. This may indicate that after the
30 *Asn28Thr+Lys32Gln* substitutions, some of the specific IgE present in the serum pool are unable to recognise the *Bet v 1* mutant *Asn28Thr+Lys32Gln*.

Bet v 1 mutant *Pro108Gly*

35

Proline in position 108 show a high degree of solvent-

exposure (60%) and is located in a molecular surface patch common for *Fagales* allergens (patch III). A glycine residue was found to occupy position 108 in some of the *Bet v 1* homologous PR-10 proteins arguing for that
5 proline can be replaced with glycine without distortion of the α -carbon backbone tertiary structure. In addition, as none of the naturally occurring isoallergen sequences have glycine in position 108, the substitution of proline with glycine gives rise to a non-naturally occurring *Bet v 1* molecule.
10

IgE-binding properties of *Bet v 1* Pro108Gly mutant

The IgE-binding properties of *Bet v 1* Pro108Gly mutant
15 was compared with recombinant *Bet v 1* in a fluid-phase IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived from birch allergic patients described above.

Figure 6 shows the inhibition of the binding of
20 biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Pro108Gly mutant.

There is a clear difference in the amount of respective
25 recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool. Recombinant *Bet v 1* reaches 50% inhibition at about 6.5 ng whereas the corresponding concentration for *Bet v 1* Pro108Gly is 15 ng. This show that the single point
30 mutation introduced in *Bet v 1* Pro108Gly lowers the affinity for specific serum IgE by a factor of about 2.

The maximum level of inhibition reached by the *Bet v 1* Pro108Gly mutant is somewhat lower compared to
35 recombinant *Bet v 1*. This may indicate that after the Pro108Gly substitution, some of the specific IgE present

in the serum pool are unable to recognise the *Bet v 1* Pro108Gly mutant.

Bet v 1 mutant Glu60Ser (non-patch mutant)

5
10
15
Glutamic acid in position 60 show a high degree of solvent-exposure (60%) however, it is not located in a molecular surface patch common for *Fagales* allergens. A serine residue was found to occupy position 60 in some of the *Bet v 1* homologous PR-10 proteins arguing for that glutamic acid can be replaced with serine without distortion of the α -carbon backbone tertiary structure. In addition, as none of the naturally occurring isoallergen sequences have serine in position 60, the substitution of glutamic acid with serine gives rise to a non-naturally occurring *Bet v 1* molecule.

IgE-binding properties of *Bet v 1* Glu60Ser mutant

20
25
30
35
The IgE-binding properties of *Bet v 1* Glu60Ser mutant was compared with recombinant *Bet v 1* in a fluid-phase IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived from birch allergic patients described above.
Figure 7 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant *Bet v 1* to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated *Bet v 1* and by *Bet v 1* Glu60Ser mutant. In contrast to the Glu45Ser, Pro108Gly and Asn28Thr+Lys32Gln mutants, the substitution glutamic acid 60 to serine, does not shown any significant effect on the IgE-binding properties of. This indicates that substitutions outside the defined *Fagales* common patches only have a marginal effect on the binding of specific serum IgE supporting the concept that conserved allergen molecular surface areas harbours dominant IgE-binding epitopes.

Bet v 1 Triple-patch mutant

In the Triple-patch mutant, the point mutations
5 (Glu45Ser, Asn28Thr+Lys32Gln and Pro108Gly) introduced in
the three different common *Fagales* patches, described
above, were simultaneously introduced in creating an
artificial mutant carrying four amino acid substitutions.

10 Structural analysis of Bet v 1 Triple-patch mutant

The structural integrity of the purified Triple-patch
mutant was analysed by circular dichroism (CD)
spectroscopy. Figure 8 shows the CD spectra of
15 recombinant and Triple-patch mutant, recorded at close
to equal concentrations. The overlap in peak amplitudes
and positions in the CD spectra from the two recombinant
proteins shows that the two preparations contain equal
amounts of secondary structures strongly suggesting that
20 the α -carbon backbone tertiary structure is not affected
by the introduced amino acid substitutions.

IgE-binding properties of Bet v 1 Triple-patch mutant

25 The IgE-binding properties of Bet v 1 Triple-patch mutant
was compared with recombinant Bet v 1 in a fluid-phase
IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived
from birch allergic patients described above.

30 Figure 9 shows the inhibition of the binding of
biotinylated recombinant Bet v 1 to serum IgE from a pool
of allergic patients by non-biotinylated Bet v 1 and by
Bet v 1 Triple-patch mutant. In contrast to the single
mutants described above, the inhibition curve of the
35 Triple-patch mutant is no longer parallel relative to
recombinant. This shows that the substitutions introduced

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

57

in the Triple-patch mutant has changed the IgE-binding properties and epitope profile compared to recombinant. The lack of parallelity makes it difficult to quantify the decrease of the Triple-patch mutant affinity for specific serum IgE.

Recombinant Bet v 1 reaches 50% inhibition at about 6 ng whereas the corresponding concentration for Bet v 1 Triple-patch mutant is 30 ng, i.e a decrease in affinity by a factor 5. However, in order to reach 80% inhibition the corresponding values are 20 ng and 400 ng, respectively, i.e a decrease by a factor 20.

T cell proliferation assay using recombinant Bet v 1 Triple-patch mutant

The analysis was carried out as described in ref. 15. It was found that recombinant Bet v 1 Triple-patch mutant was able to induce proliferation in T cell lines from three different birch pollen allergic patients with stimulation indices similar to recombinant and naturally occurring. This suggests that the Triple-patch mutant can initiate the cellular immune response necessary for antibody production.

25

EXAMPLE 2

Example 2 describes the preparation of recombinant mutant allergens with one primary mutation. Recombinant mutant allergens according to the invention, i.e. allergens comprising at least four primary mutations, may be prepared using the same procedures.

Identification of common epitopes within *Vespula vulgaris* venom major allergen antigen 5

35

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

58

Antigen 5 is one of the three vespid venom proteins, which are known allergens in man. The vespids include hornets, yellow-jacket and wasps. The other two known allergens of vespid venoms are phospholipase A₁ and hyaluronidase. Antigen 5 from *Vespula vulgaris* (Ves v 5) has been cloned and expressed as recombinant protein in the yeast system (Monsalve et al. 1999, ref. 22). The three-dimensional crystal structure of recombinant Ves v 5 has recently been determined at 1.8 Å resolution (in preparation). The main features of the structure consist of four β-strands and four α-helices arranged in three stacked layers giving rise to a "α-β-α sandwich". The sequence identity between Antigen 5 homologous allergens from different *Vespula* species is about 90% suggesting presence of conserved molecular surface areas and B cell epitopes.

The presence and identification of common patches was performed after alignment of all known amino acid sequences, as previously described for tree pollen allergens, of the *Vespula* antigen 5 allergens in combination with an analysis of the molecular surface of Antigen 5 revealed by the three-dimensional structure of Ves v 5. Figure 10 shows solvent accessibility of individually aligned antigen 5 residues and alignment of *Vespula* antigen 5 sequences (left panel). On the right panel of figure 10 is shown the molecular surface of antigen 5 with conserved areas among *Vespula* antigen 5:s coloured.

Selection of amino acid residues for site-directed mutagenesis

Amino acid residues for site-directed mutagenesis were selected among residues present the patches common for *Vespula* since modifications of these is expected to

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

59

affect the binding of serum IgE from the majority of patients showing clinical *Vespula* allergic cross-reactivity.

- 5 The relative orientation and percentage of solvent-exposure of each amino acid residue within respective patch was calculated based on their atomic coordinates. Residues having a low degree of solvent exposure were not regarded suitable for mutagenesis due to the possible
10 disruption of the structure or lack of antibody interaction. The remaining residues were ranked according to their degree of solvent-exposure.

Cloning of the gene encoding Ves v 5

- 15 Total RNA was isolated from venom acid glands of *Vespula vulgaris* vespid as described in (Fang et al. 1988, ref. 23).
- 20 First-strand cDNA synthesis, PCR amplification and cloning of the Ves v 5 gene was performed as described in (Lu et al. 1993, ref. 24)

Subcloning into pPICZαA

- 25 The gene encoding Ves v 5 was subsequently sub-cloned into the pPICZαA vector (Invitrogen) for secreted expression of Ves v 5 in *Pichia pastoris*. The gene was amplified by PCR and sub-cloned in frame with the coding
30 sequence for the α-factor secretion signal of *Saccharomyces cerevisiae*. In this construct the α-factor is cleaved off, in vivo, by the *Pichia pastoris* Kex2 protease system during secretion of the protein.
- 35 In brief PCR was performed using Ves v 5 as template and primers corresponding to the amino- and carboxyterminus

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

60

of the protein, respectively. The primers were extended in the 5'-end to accommodate restriction sites for cloning, EcoRI and XbaI, respectively. Nucleotides encoding the Kex2 cleavage site was in this construct
 5 positioned 18 nucleotides upstream to the amino terminus of the protein, resulting in the expression of Ves v 5 with six additional amino acids, Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Phe, at the amino terminus.

10 Insertion of pPICZαA-Ves v 5 into *P. pastoris*

The pPICZαA vectors with the Ves v 5 gene inserted was linearised by Sac I restriction and inserted into the AOX1 locus on the *Pichia pastoris* genome. Insertion was
 .15 performed by homologous recombination on *Pichia pastoris* KM71 cells following the recommendations of Invitrogen.

In vitro mutagenesis

20 In vitro mutagenesis was performed by PCR using recombinant pPICZαA with Ves v 5 inserted as template. Each mutant Ves v 5 gene was generated by 3 PCR reactions using 4 primers.

25 Two mutation-specific oligonucleotide primers were synthesised accommodating each mutation, one for each DNA strand, see Figures 11 and 12. Using the mutated nucleotide(s) as starting point both primers were extended 6-7 nucleotides in the 5'-end and 12-13
 30 nucleotides in the 3'-end. The extending nucleotides were identical in sequence to the Ves v 5 gene in the actual region.

Two generally applicable primers (denoted "all sense" and
 35 "all non-sense" in Figure 12) were furthermore synthesised and used for all mutants. To insure

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

61

expression of *Ves v 5* mutants with authentic amino terminus, one primer corresponding to the amino terminus of the protein was extended in the 5'-end with a *Xho I* site. Upon insertion of the *Ves v 5* mutant genes into the pPICZαA vector, the Kex2 protease cleavage site was regenerated directly upstream to the amino terminus of *Ves v 5*. The second primer was corresponding in sequence to a region of the pPICZαA vector positioned approximately 300 bp downstream from the *Ves v 5* gene.

10 The sequence of the primer corresponding to the amino terminus of *Ves v 5* is derived from the sense strand and the sequence of the downstream primer is derived from the non-sense strand, see Figure 11.

15 Two independent PCR reactions were performed essentially according to standard procedures (Saiki et al 1988) with the exception that only 20 temperature cycles were performed in order to reduce the frequency of PCR artefacts. Each PCR reaction used pPICZαA with *Ves v 5* inserted as template and one mutation-specific and one generally applicable primer in meaningful combinations.

20

The PCR products were purified by using "Concert, Rapid PCR Purification System" (Life Technologies). A third PCR reaction was performed using the combined PCR products from the first two PCR reactions as template and both generally applicable primers. Again, 20 cycles of standard PCR were used. The PCR product was purified with the "Concert, Rapid PCR Purification System" (Life Technologies), cut with restriction enzymes (*XhoI/XbaI*), and ligated directionally into pPICZαA vector restricted with the same enzymes. Figure 13 shows an overview of all *Ves v 5* mutations.

25

30

35 Insertion of pPICZαA-*Ves v 5* mutants into *P. pastoris*

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

62

The pPICZαA vectors with the Ves v 5 mutant genes inserted were linearised by Sac I restriction and inserted into the AOX1 locus on the *Pichia pastoris* genome. Insertions were performed by homologous recombination on *Pichia pastoris* KM71 cells following the recommendations of Invitrogen.

Nucleotide sequencing

10 Determination of the nucleotide sequence of the Ves v 5 encoding gene was performed before and after subcloning, and following *in vitro* mutagenesis, respectively.

15 Plasmid DNA's from 10 ml of bacterial culture grown to saturation overnight in LB medium supplemented with 0.1 g/l ampicillin were purified on Qiagen-tip 20 columns and sequenced using the Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB) following the recommendations of the suppliers.

20 Expression and purification of recombinant Ves v 5

Recombinant yeast cells of *Pichia pastoris* strain KM71 were grown in 500 ml bottles containing 100 ml of pH 6.0 phosphate buffer containing yeast nitrogen base, biotin, 25 glycerol and histidine at 30°C with orbital shaking at 225 rpm until A₆₀₀ nm of 4-6. Cells were collected by centrifugation and re-suspended in 10 ml of similar buffered medium containing methanol in place of glycerol. Incubation was continued at 30°C for 7 days with daily 30 addition of 0.05 ml methanol.

Cells were harvested by centrifugation and the collected culture fluid was concentrated by ultrafiltration. After dialysis against 50 mM ammonium acetate buffer, pH 4.6, 35 the sample was applied to a FPLC (Pharmacia) SE-53 cation exchange column equilibrated in the same buffer. The

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

63

column was eluated with a 0-1.0 M NaCl, 50 mM ammonium acetate linear gradient. The recombinant Ves v 5 peak eluting at about 0.4 M NaCl was collected and dialysed against 0.02 N acetic acid. After concentration to about 5 10 mg/ml, the purified Ves v 5 was stored at 4°C.

Crystallisation of recombinant Ves v 5

Crystals of Ves v 5 was grown by the vapour diffusion technique at 25°C. For crystallisation, 5 µl of 5 mg/ml 10 Ves v 5 was mixed with 5 µl of 18% PEG 6000, 0.1 M sodium citrate, pH 6.0 and equilibrated against 1 ml of 18% PEG 6000, 0.1 M sodium citrate, pH 6.0.

15 X-ray diffraction data was collected at 100K from native Ves v 5 crystals and after incorporation of heavy-atom derivatives and used to solve the three-dimensional structure of Ves v 5, see Figure 10 (manuscript in preparation).

20

Immunoelectrophoresis using rabbit polyclonal antibodies

The two Ves v 5 mutants were produced as recombinant Ves v 5 proteins and tested for their reactivity towards 25 polyclonal rabbit antibodies raised against recombinant Ves v 5. When analysed by rocket immunoelectrophoresis under native conditions, the rabbit antibodies were able to precipitate recombinant Ves v 5 as well as both mutants, indicating that the mutants have conserved α- 30 carbon backbone tertiary structure.

Inhibition of specific serum IgE

The IgE-binding properties of Ves v 5 mutants were 35 compared to recombinant Ves v 5 in a fluid-phase IgE-inhibition assay using a pool of serum IgE derived from

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

64

vespid venom allergic patients.

The inhibition assay was performed as described above using biotinylated recombinant Ves v 5 instead of Bet v 1.

Ves v 5 Lys72Ala mutant

Lysine in position 72 show a high degree of solvent-exposure (70%) and is located in a molecular surface patch common for *Vespula* antigen 5. The relative orientation and high degree of solvent exposure argued for that lysine 72 can be replaced by an alanine residue without distortion of the α -carbon backbone tertiary structure. In addition, as none of the naturally occurring isoallergen sequences have alanine in position 72, the substitution of lysine with alanine gives rise to a non-naturally occurring Ves v 5 molecule.

IgE-binding properties of Ves v 5 Lys72Ala mutant

The IgE-binding properties of Ves v 5 Lys72Ala mutant was compared with recombinant Ves v 5 in a fluid-phase IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived from birch allergic patients described above.

Figure 14 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant Ves v 5 to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated Ves v 5 and by Ves v 5 Lys72Ala mutant.

There is a clear difference in the amount of respective recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool. Recombinant Ves v 5 reaches 50% inhibition at about 6 ng whereas the corresponding concentration for Ves v 5

Lys72Ala mutant is 40 ng. This show that the single point mutation introduced in Ves v 5 Lys72Ala mutant lowers the affinity for specific serum IgE by a factor of about 6.

The maximum level of inhibition reached by the Ves v 5 Lys72Ala mutant significantly lower compared to recombinant Ves v 5. This may indicate that after the Lys72Ala substitution, some of the specific IgE present in the serum pool are unable to recognise the Ves v 5 Lys72Ala mutant.

10

Ves v 5 Tyr96Ala mutant

Tyrosine in position 96 show a high degree of solvent-exposure (65%) and is located in a molecular surface patch common for *Vespula* antigen 5. The relative orientation an high degree of solvent exposure argued for that tyrosine 96 can be replaced by an alanine residue without distortion of the three-dimensional structure. In addition, as none of the naturally occurring isoallergen sequences have alanine in position 96, the substitution of tyrosine with alanine gives rise to a non-naturally occurring Ves v 5 molecule.

20

IgE-binding properties of Ves v 5 Tyr96Ala mutant

25

The IgE-binding properties of Ves v 5 Tyr96Ala mutant was compared with recombinant Ves v 5 in a fluid-phase IgE-inhibition assay using the pool of serum IgE derived from birch allergic patients described above.

30

Figure 14 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant Ves v 5 to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated Ves v 5 and by Ves v 5 Tyr96Ala mutant.

35

There is a clear difference in the amount of respective

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

66

recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool. Recombinant Ves v 5 reaches 50% inhibition at about 6 ng whereas the corresponding concentration for Ves v 5 Tyr96Ala mutant is 40 ng.

This shows that the single point mutation introduced in Ves v 5 Tyr96Ala mutant lowers the affinity for specific serum IgE by a factor of about 6.

The maximum level of inhibition reached by the Ves v 5 Tyr96Ala mutant is significantly lower compared to recombinant Ves v 5. This may indicate that after the Tyr96Ala substitution, some of the specific IgE present in the serum pool are unable to recognise the Ves v 5 Tyr96Ala mutant.

EXAMPLE 3

Identification and selection of amino acids for substitution

The parameters of solvent accessibility and conservation degree were used to identify and select surface-exposed amino acids suitable for substitution for the allergens Bet v 1, Der p 2 and Ves v 5.

Solvent accessibility

Solvent accessibility was calculated using the software InsightII, version 97.0 (MSI) and a probe radius of 1.4 Å (Connolly surface).

Internal cavities were excluded from the analyses by filling with probes using the software PASS (Putative Active Sites with Spheres). Probes on the surface were

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

67

subsequently removed manually.

Conservation

5 Bet v 1:

3-D structure is based on accession number Z80104 (1bv1.pdb).

10 38 other Bet v 1 sequences included in the analysis of conserved residues comprise accession numbers:

P15494=X15877=Z80106, Z80101, AJ002107, Z72429, AJ002108, Z80105, Z80100, Z80103, AJ001555, Z80102, AJ002110, Z72436, P43183=X77271, Z72430, AJ002106, P43178=X77267, 15 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.

20

Der p 2:

3-D structure is based on accession number P49278 (1a9v.pdb).

25 6 other Der p 2 sequences included in the analysis of conserved residues comprise the following substitutions:

ALK-G: V40L, T47S, M111L, D114N.

ALK-101: M76V.

ALK-102: V40L, T47S.

30 ALK-104: T47S, M111I, D114N.

ALK-113: T47S.

ALK-120: V40L, T47S, D114N.

Ves v 5:

35

3-D structure is based on accession number Q05110 (pdb

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

68

coordinates unpublished).

Another Ves v 5 sequence in the analysis of conserved residues contains one amino acid substitution: M202K.

5

Results

Bet v 1

10 59 amino acids highly solvent exposed:

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, 15 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.

57 amino acids highly solvent exposed and conserved (>70%):

20 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-25 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.

23 mutations performed:

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

Table 1 shows a listing in descending order of solvent exposure of Bet v 1 amino acids. Column 1 lists the amino acid number starting from the amino-terminal, column 2 35

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

69

lists the amino acid in one letter abbreviation, column 3
 lists the normalised solvent exposure index, column 4
 lists the percent of known sequences having the concerned
 amino acid in this position.

5

Table 1: Bet v 1

NO	AA	Solv_exp	Cons %
129K		1,000	90
80E		0,986	97
47N		0,979	100
65K		0,978	100
108P		0,929	100
158N		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
98E		0,696	100
156D		0,693	97
63P		0,682	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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

70

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
88I	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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

71

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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

72

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

Der p 2

55 amino acids highly solvent exposed:

5 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-10 87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109, K-15.

54 amino acids highly solvent exposed and conserved (>70%):

15 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.

20

6 mutations performed:

K6A, K15E, H30N, E62S, H74N, K82N

25 Table 2 shows a listing in descending order of solvent exposure of Der p 2 amino acids. Column 1 lists the amino acid number starting from the amino-terminal, column 2 lists the amino acid in one letter abbreviation, column 3 lists the normalised solvent exposure index, column 4

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

73

lists the percent of known sequences having the concerned amino acid in this position.

Table 2: Der p 2

5

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

WO 02/40676

74

PCT/DK01/00764

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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

75

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

Ves v 5

89 amino acids highly solvent exposed:

- 5 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-
- 10 205, 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,
- 15 I-182.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

76

88 amino acids highly solvent exposed and conserved (>70%):

5 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,
10 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.

15 9 mutations performed:

K29A, T67A, K78A, V84S, Y102A, K112S, K144A, K202M, N203G

Table 3 shows a listing in descending order of solvent exposure of Ves v 5 amino acids. Column 1 lists the amino acid number starting from the amino-terminal, column 2 lists the amino acid in one letter abbreviation, column 3 lists the normalised solvent exposure index, column 4 lists the percent of known sequences having the concerned amino acid in this position.

25

Table 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	0,888	100
	149K	0,888	100
	128K	0,857	100
	184E	0,841	100
	112K	0,824	100

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

77

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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

78

31N	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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

79

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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

80

168A	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
168M	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

EXAMPLE 4

5 This Example describes preparation and characterisation of recombinant mutant Bet v 1 allergens according to the invention, i.e. allergens with diminished IgE-binding affinity comprising at least four primary mutations.

10 Selection of amino acid residues for site-directed mutagenesis of Bet v 1

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

81

Solvent accessibility of amino acid residues of Bet v 1 is shown in Example 3, table 1. The rate of amino acid conservation is based on sequence alignment performed at the ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) using the ClustalW algorithm on a BLAST search where the Bet V 1.2801 wild type amino acid sequence is used as input sequence. The alignment includes 67 allergen sequences (39 Bet v 1 sequences, 11 Car b 1 sequences, 6 Cor a 1 sequences, and 13 Aln g 1 sequences) from species within the order *Fagales* (Bet v 1: *Betula verrucosa*; Car b 1: *Carpinus betulus*; Cor a 1: *Corylus avellana*; Aln g 1: *alnus glutinosa*). In respect to the mutated recombinant Bet v 1 allergens shown in the examples, target residues for substitution was based on $\geq 95\%$ amino acid identity.

As described in Example 1, amino acid residues with a high degree of solvent-exposure and a high degree of conservation between pollen allergens from related species, were selected for site-directed mutagenesis. Residues having a low degree of solvent exposure ($<20\%$) were not regarded relevant for mutagenesis due to the possible disruption of the tertiary structure or lack of antibody interaction.

The introduced residues were all present in corresponding positions in isoforms of a group of plant proteins called pathogenesis related (PR-10) proteins. Molecular modelling suggests that the tertiary structures of *Fagales* allergens and PR-10 proteins are close to being identical. Bet v 1 shares significant sequence identity (20-40%) with PR-10 proteins. However, there are no reports of allergic cross-reactivity towards these PR-10 proteins. Thus, exchange of a highly conserved and solvent exposed amino acid from Bet v 1 with an amino acid in the corresponding position in a PR-10 protein,

results in a mutated Bet v 1 protein with an unaltered α -carbon backbone tertiary structure but with diminished IgE-binding affinity.

5 In vitro mutagenesis

In vitro mutagenesis was performed by PCR using recombinant pMAL-c with Bet v 1 inserted as template. Preparation of recombinant mutant allergens comprising
10 five to nine primary mutations included two PCR steps; step I and II. First, each single mutation (or several mutations if located closely together in the DNA sequence) was introduced into sequential DNA sequences of Bet v 1.2801 or Bet v 1.2801 derivatives using sense and
15 anti-sense mutation-specific oligonucleotide primers accommodating each mutation(s) along with sense and anti-sense oligonucleotide primers accommodating either upstream or downstream neighbour mutations or the N-terminus/C-terminus of Bet v 1, respectively as
20 schematically illustrated in Figure 17 (I). Secondly, PCR products from PCR reaction I were purified, mixed and used as templates for an additional PCR reaction (II) with oligonucleotide primers accommodating the N-terminus and C-terminus of Bet v 1 as schematically illustrated in
25 Figure 17 (II). The PCR products were purified by agarose gel electrophoresis and PCR gel purification (Life Technologies) followed by ethanol precipitation, cut with restriction enzymes (*SacI/EcoRI*) or (*SacI/XbaI*), and ligated directionally into pMAL-c restricted with the
30 same enzymes.

Figure 18 shows synthesised oligonucleotide primers and schematically illustrations for the construction of Bet v 1 mutants with five to nine primary mutations. The
35 mutated amino acids were preferably selected from the group consisting of amino acids that are characterised by

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

83

being highly solvent exposed and conserved as described in Example 3. The Bet v 1 mutants are the following primary and secondary mutations stated in parenthesis:

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

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

10

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

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

Mutant Bet v 1 (2753): (Asn28Thr, Lys32Gln), Lys65Asn, 20 (Glu96Leu, Lys97Ser), (Pro108Gly, Asp109Asn), (Asp125Tyr, Glu127Ser), Arg145Glu.

Nucleotide sequencing

25 Determination of the nucleotide sequence of the Bet v 1 encoding gene was performed before and after subcloning, and following in vitro mutagenesis, respectively.

Plasmid DNA's from 10 ml of bacterial culture grown to 30 saturation overnight in LB medium supplemented with 0.1 g/l ampicillin were purified on Qiagen-tip 20 columns and sequenced using the Ready reaction dye terminator cycle sequencing kit and a Fluorescence Sequencer AB PRISM 377, both from (Perkin Elmer), following the recommendations 35 of the suppliers.

Expression and purification of recombinant Bet v 1 and mutants

Recombinant Bet v 1 (Bet v 1.2801 and mutants) were over-
5 expressed in *Escherichia coli* DH 5 α fused to maltose-
binding protein and purified as described in ref. 15.
Briefly, recombinant *E.coli* cells were grown at 37°C to
an optical density of 0.8 at 600 nm, whereupon expression
of Bet v 1 fusion protein was induced by addition of
10 IPTG. Cells were harvested by centrifugation 3 hours
post-induction, re-suspended in lysis buffer and broken
by sonication. After sonication and additional
centrifugation, recombinant fusion protein was isolated
by amylose affinity chromatography and subsequently
15 cleaved by incubation with Factor Xa (ref. 15). After F
Xa cleavage, recombinant Bet v 1 was isolated by
gelfiltration and subjected to another round of amylose
affinity chromatography in order to remove trace amounts
of maltose-binding protein.

20 Purified recombinant Bet v 1 was concentrated by
ultrafiltration to about 5 mg/ml and stored at 4 °C. The
final yields of the purified recombinant Bet v 1
preparations were between 2-5 mg per litre *E. coli* cell
25 culture.

The purified recombinant Bet v 1 preparations appeared as
single bands after silver-stained SDS-polyacrylamide
electrophoresis with an apparent molecular weight of 17.5
30 kDa.

We have previously shown (ref. 15) that recombinant Bet v
1 No. 2801 is immunochemically indistinguishable from
naturally occurring Bet v 1.

35 Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) mutants

Figure 19 shows introduced point mutations at the molecular surface of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637). In mutant Bet v 1 (2628) five primary mutations were introduced in one half of Bet v 1 leaving the other half unaltered. In mutant Bet v 1(2637) five primary and three secondary mutations were introduced in the other half leaving the first half unaltered. In this way, mutations in mutant Bet v 1 (2628) and mutant Bet v 1(2637) affects different halves of the Bet v 1 surface, respectively.

Crystallisation and structural determination of recombinant Bet v 1(2628) mutant protein.

Crystals of recombinant Bet v 1 (2628) were grown by vapour diffusion at 25°C, essentially as described in (Spangfort *et al* 1996b, ref. 21). Bet v 1 (2628), at a concentration of 5 mg/ml, was mixed with an equal volume of 2.2 M ammonium sulphate, 0.1 M sodium citrate, 1% (v/v) dioxane, pH 6.3 and equilibrated against 100x volume of 2.2 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium citrate, 1% (v/v) dioxane, pH 6.3. After 24 hours of equilibration, crystal growth was induced by applying the seeding technique described in ref. 21, using crystals of recombinant wild-type Bet v 1 as a source of seeds.

After about 4 months, crystals were harvested and analysed using X-rays generated from a Rigaku rotating anode as described in ref. 21 and the structure was solved using molecular replacement.

Structure of Bet v 1 (2628) mutant

The structural effect of the mutations was addressed by growing three-dimensional Bet v 1 (2628) protein crystals diffracting to 2.0 Å resolution when analysed by X-rays

generated from a rotating anode. The substitutions Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu were verified by the Bet v 1 (2628) structure electron density map which also showed that the overall α -carbon backbone tertiary structure is preserved.

Structural analysis of Bet v 1 (2637) mutant

The structural integrity of the purified Bet v 1 (2637) mutant was analysed by circular dichroism (CD) spectroscopy. Figure 20 shows the CD spectra of recombinant Bet v 1.2801 (wildtype) and Bet v 1 (2637) mutant, recorded at close to equal concentrations. The overlap in peak amplitudes and positions in the CD spectra from the two recombinant proteins shows that the two preparations contain equal amounts of secondary structures strongly suggesting that the α -carbon backbone tertiary structure is not affected by the introduced amino acid substitutions.

IgE-binding properties of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) mutants.

The IgE-binding properties of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) as well as a 1:1 mix of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) was compared with recombinant wild type Bet v 1.2801 in a fluid-phase IgE-inhibition assay using a pool of serum IgE derived from birch allergic patients.

As described in Example 1, recombinant Bet v 1.2801 was biotinylated at a molar ratio of 1:5 (Bet v 1 no. 2801:biotin). The inhibition assay was performed as follows: a serum sample (25 μ l) was incubated with solid phase anti IgE, washed, re-suspended and further incubated with a mixture of biotinylated Bet v 1.2801 and a given mutant or 1:1 mix of the two mutants. The amount

of biotinylated Bet v 1.2801 bound to the solid phase was estimated from the measured RLU after incubation with acridinium ester labelled streptavidin. The degree of inhibition was calculated as the ratio between the RLU's obtained using buffer and mutant as inhibitor.

Figure 21 shows the inhibition of the binding of biotinylated recombinant Bet v 1.2801 to serum IgE from a pool of allergic patients by non-biotinylated Bet v 1.2801 and by Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637) and a 1:1 mix of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637).

There is a clear difference in the amount of respective recombinant proteins necessary to reach 50% inhibition of the binding to serum IgE present in the serum pool. Recombinant Bet v 1.2801 reaches 50% inhibition at about 5 ng whereas the corresponding concentration for Bet v 1 (2628) mutant is about 15-20 ng. This shows that the point mutation introduced in the Bet v 1 (2628) mutant lowers the affinity for specific serum IgE by a factor of about 3-4.

The maximum level of inhibition reached by the Bet v 1 (2628) mutant protein is clearly lower compared to recombinant Bet v 1.2801. This may indicate that some of the specific IgE present in the serum pool are unable to recognise the Bet v 1 (2628) mutant protein due to the introduced point mutations.

Bet v 1 (2637) reaches 50% inhibition at about 400-500 ng showing that the point mutation introduced in the Bet v 1 (2637) mutant lowers the affinity for specific serum IgE by 80 to 100-fold compared to Bet v 1.2801. The large difference in IgE-binding is further supported by a clear difference in inclination of the inhibition curve obtained with Bet v 1(2637) mutant protein compared to

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

88

the inhibition curve for Bet v 1.2801. The different inclination provide evidence that the reduction in IgE-binding is due to a distinctly different epitope pattern of the mutant compared to Bet v 1.2801.

5

In addition to the inhibition assays with single modified allergens a 1:1 mix of Bet 1 (2628) and Bet v 1 (2637) having same molar concentration of Bet v 1 as each of the samples with Bet 1 (2628) or Bet v 1 (2637), respectively was tested and showed full (100%) capacity to inhibit IgE-binding to rBet v 1.2801. The capacity to fully inhibit IgE-binding is a clear indication that all reactive epitopes present on Bet v 1.2801 were present in the 1:1 allergen mix. Further support comes from the comparable inclination of the two inhibition curves for Bet v 1.2801 and the allergen mix. Reduced IgE-reactivity of the mixed allergen sample is demonstrated by the need of a four-fold higher concentration of the allergen mix, when compared to Bet v 1.2801, for obtaining 50% inhibition of IgE-binding.

15

20

T cell proliferation assay using mutated recombinant Bet v 1 allergens.

25

The analysis was carried out as described in ref. 15. Bet v 1 (2628) and Bet v 1(2637) mutant protein were both able to induce proliferation in T cell lines from birch pollen allergic patients with stimulation indices similar to recombinant and naturally occurring. This suggests that both of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) mutant protein can each initiate the cellular immune response necessary for antibody production.

30

Histamine release assays with human basophil.

35

Histamine release from basophil leucocytes was performed

as follows. Heparinized blood (20 ml) was drawn from each birch pollen patient, stored at room temperature, and used within 24 hours. Twenty-five microlitres of heparinized whole blood was applied to glass fibre coated microtitre wells (Reference Laboratory, Copenhagen, Denmark) and incubated with 25 microlitres of allergen or anti-IgE for 1 hour at 37°C. Thereafter the plates were rinsed and interfering substances were removed. Finally, histamine bound to the microfibrres was measured spectrophotofluometrically.

Histamine release properties of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) mutant protein.

Histamine release data is shown in Figure 22 and Figure 23. The potency of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) mutant protein to induce histamine release in human basophil from two birch pollen allergic patients has been tested. In both cases the release curve of the mutated allergens to induce histamine release is clearly shifted to the right compared to the release curve of Bet v 1.2801. The shift indicate that the potency of Bet v 1 (2628) and Bet v 1 (2637) is reduced 3 to 10-fold.

Mutant Bet v 1 (2744) and mutant Bet v 1 (2753)

Bet v 1 (2744) and Bet v 1 (2753) was likewise constructed for use as a mixed allergen vaccine. In these mutated allergens point mutations were distributed in an all surface arranged fashion as shown in Figure 24 and Figure 25 and was again designed to affect different surface areas in the two molecules, respectively, as shown in Figure 26. However these modified allergens might individually be used as single allergen vaccines as well.

Structural analysis of Bet v 1 (2744) mutant protein

The structural integrity of the purified Bet v 1 (2744) mutant was analysed by circular dichroism (CD) spectroscopy. Figure 27 shows the CD spectra of recombinant Bet v 1.2801 (wildtype) and Bet v 1 (2744) mutant, recorded at close to equal concentrations. The overlap in peak amplitudes and positions in the CD spectra from the two recombinant proteins shows that the two preparations contain equal amounts of secondary structures strongly suggesting that the α -carbon backbone tertiary structure is not affected by the introduced amino acid substitutions.

Histamine release properties of Bet v 1 (2744)

Histamine release data from five experiments with basophil leucocytes from five different birch pollen allergic patients is shown in Figure 28 and Figure 29A-D. The potency of Bet v 1 (2744) mutant protein to induce histamine release in human basophil has been tested. The release curves of the mutated allergens are clearly shifted to the right compared to the release curve of Bet v 1.2801 indicating that the potency of Bet v 1 (2744) to release histamine is reduced 3 to 5-fold.

Mutant Bet v 1 (2733)

A Mutant Bet v 1 (2733) with nine primary mutations has been constructed and recombinantly expressed. The distribution of point mutations in Bet v 1 (2733) leave several surface areas constituting $>400\text{\AA}^2$ unaltered. Figure 30 show introduced point mutations at the molecular surface of Bet v 1 (2733).

EXAMPLE 5

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

91

This Example describes cloning of the gene encoding Der p 2 from *Dermatophagoides pteronyssinus* and construction of mutants with reduced IgE-binding affinity.

5 PCR amplified products from first strand cDNA synthesis of *Dermatophagoides pteronyssinus* total RNA was obtained from Dr. Wendy-Anne Smith and Dr. Wayne Thomas (TVW Telethon Institute for Child Health Research, 100 Roberts
10 Rd, Subiaco, Western Australia 6008). During the amplification of the first strand cDNA library, Der p 2 had been selectively amplified using Der p 2 specific primers. PCR fragments were subsequently cloned into the Bam HI site of pUC19 (New England BioLabs). DNA
15 sequencing of Der p 2 was performed using vector specific sense (5'-GGCGATTAAGTTGGGTACGCCAGGG-3') and anti-sense (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-3') primers.

A total of seven unique Der p 2 isoforms designated ALK-
20 101, ALK-102, ALK-103, ALK-104, ALK-113, ALK-114, and ALK120 were identified. The clone entitled ALK-114 was chosen as starting point for generation of low-affinity IgE-mutants because of its high sequence identity with the Der p 2 NMR structure with the data base accession
25 number 1A9V. Compared to ALK-114, the 6 other naturally occurring isoforms comprise the following substitutions:

ALK-101: M76V.

ALK-102: V40L, T47S.

ALK-103: M111L, D114N.

30 ALK-104: T47S, M111I, D114N.

ALK-113: T47S.

ALK-120: V40L, T47S, D114N.

Insertion of Der p 2 into pGAPZα-A

35

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

92

The gene encoding Der p 2 (ALK-114) was subsequently inserted into the pGAPZ α -A vector (Invitrogen) for secreted expression of Der p 2 in the yeast, *Pichia pastoris*. The gene was amplified using sense primer OB27

5 (5'- GGAATTCTCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTGCCC-3')
 and anti-sense primer OB28 (5'-
 CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTAGCATGAGTTGC-3') corresponding
 to the amino- and the carboxytermi of the Der p 2
 polypeptide, respectively. The primers were extended in
 10 the 5'-end to accomodate the restriction sites Xho I and
 Xba I, respectively. The Xho I restriction site fuses the
 first codon of Der p 2 in frame with the nucleic acid
 sequence encoding the KEX2 cleavage site (LYS-ARG) of
 pGAPZ α -A. A single round of PCR amplification was
 15 performed in a 100 microliter (μ l) volume: 0.1 mg of
 template ALK-114 DNA, 1 X Expand polymerase buffer
 (available from Boehringer Mannheim), 0.2 millimolar (mM)
 each of the four dNTPs, 0.3 micromolar (μ M) each of the
 sense and anti-sense primers and 2.5 Units of Expand
 20 polymerase (available from Boehringer Mannheim). The DNA
 was amplified following 25 cycles of: 95°C for 15
 seconds, 45°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute, followed
 by 1 cycle of 72°C for 7 minutes. The resulting 475 base
 pair ALK-114 PCR fragment was purified using a QIAquick
 25 spin purification procedure (available from Qiagen). The
 purified DNA fragment was then digested with Xho I and
 Xba I, gel purified and ligated into similarly digested
 pGAPZ α -A. The ligation reaction was trasformed into
 E.coli strain DH5 α , resulting in plasmid, pCBo06.

30 The nucleotide sequence of Der p 2 was confirmed by DNA
 sequencing before and after cloning and following *in*
 vitro mutagenesis (see below).

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

93

Der p 2 sequences

SEQ ID NO 1 corresponds to the nucleic acid sequence of
Der p 2 (ALK-114):

5
1 gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttgtaccagga
61 tgccatgggttcagaaccatgtatcattcatcgttgtaaacattccaattggaagccgtt
121 ttccaagccaacaaaacacaaaacgcgtaaaattgaaatcaagcctcaatcgatggt
181 ttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcattgacattacatgaaatgccattg
10 241 gttaaaggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccgaaaattgcacaaaa
301 tctgaaaatgttgcgtcactgttaagttatgggtgatggtgtttttggcctgtgct
361 attgtactcatgctaaaatccgcgattaa

SEQ ID NO 2 corresponds to the deduced amino acid
15 sequence of Der p 2 (ALK-114):

1 dqvdvkdcanheikkvlvpghgsepchirgkpfgleavfeanqtktkielkasidg
61 levdvpgidpnachymkplvkgqgydikytwnvpkiapksenvvvtvkvmgddgvlaca
121 iathakird
20

Insertion of pGAPZα-A-Der p 2 into P. pastoris

The vector, pCBo06 was linearized using Avr II
restriction enzyme and transformed into competent P.
25 pastoris strain, X-33, as described in the Invitrogen
manual. Recombinant cells resistant to 100 micrograms per
milliliter (μg/ml) of Zeocin were selected, and colony
purified on fresh YPD plates containing 100 μg/ml Zeocin.

30 Expression and purification of recombinant Der p 2

A 250 ml of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2%
glucose) containing 100 μg/ml Zeocin was inoculated with
an overnight culture of recombinant yeast cells
35 expressing Der p 2. The culture was grown at 30°C for 72
hours to obtain optimal Der p 2 expression. Cells were
harvested by centrifugation and the resulting culture

supernatant was saturated with 50% ammonium sulfate. Following centrifugation at 3000x g for 30 minutes, the supernatant was saturated with 80% ammonium sulfate. Following centrifugation, the pellet was resuspended in 5 150 millimolar (mM) NH_4HCO_3 and fractionated on a Superdex 75 gel filtration column, equilibrated with the same buffer. Der p 2 was eluted as a major peak corresponding to its expected molecular weight. The elution of Der p 2 was monitored both by SDS page 10 electrophoresis, followed by silver staining and by immunoblot analysis using Der p 2 specific polyclonal antibodies.

15 Selection of amino acid residues for site-directed mutagenesis

Selection of amino acid residues for mutagenesis was based on identification of residues that are highly solvent exposed and highly conserved among allergens from 20 House Dust Mites (Der p 2/f 2 and Eur m 2) and storage mites (Tyr p 2, Lep d 2, Gly d 2). Highly solvent exposed amino acid residues were identified visually by analysis of the molecular surface of the Der p 2 NMR structure (#1.9, 1A9V.pdb). Twelve amino acid residues were 25 selected for mutagenesis: K6A, N10S, K15E, S24N, H30N, K48A, E62S, H74N, K77N, K82N, K100N and R128Q.

Site-directed mutagenesis

30 Construction of recombinant mutant allergens with single primary mutations and multiple combinations thereof, are described in the following.

Expression plasmids encoding Der p 2 mutants were 35 produced using pCBo06 as DNA template. PCR reactions were performed using sense and anti-sense primers

incorporating the specified mutations. Primer pairs used in the PCR reactions to generate the specified mutations are listed in Figure 31. The mutations are designated in bold and the restriction sites used in the subsequent cloning step are underlined in the figure. For the construction of mutants K6A, K15E, H30N, H74N and K82N, PCR reactions were performed essentially as described in the section "Cloning of Der p 2 into pGAPZ α -A". The purified PCR fragments were digested with the designated restriction enzyme sites (see Figure 31), gel purified, ligated into similarly digested pCBo06 and transformed into *E.coli* DH5 α .

The mutation E62S was generated using an alternative PCR mutagenesis methodology described for the generation of Bet v 1 mutants in Example 1. Two mutation specific oligonucleotide primers were synthesized covering the specified mutations (OB47 and OB48, listed in Figure 31). Two additional primers used for the secondary amplification step were OB27 and OB28 as described in the section: "Insertion of Der p 2 into pGAPZ α -A".

The mutant allergens produced are characterised using the same methods as described in example 4, e.g. circular dichroism (CD) spectroscopy, crystallisation, measurements of IgE binding properties, histamin-release, T-cell proliferation stimulation capacity, etc.

EXAMPLE 6

Mutated recombinant mite allergens (Der p 2) with improved safety for specific allergy vaccination

In this example the application of the concept of the current invention on house dust mite allergens is

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

96

exemplified by one allergen, Der p 2. Manipulation of other house dust mite allergens may be performed by equivalent procedures.

5 Design of mutated recombinant Der p 2 molecules.

SEQ ID NO. 3 shows the nucleotide and deduced amino acid sequence of Der p 2-ALK-G clone, which is a wild type isoform.

10

SEQ ID NO. 3: Nucleotide and deduced amino acid sequence of Der p 2-ALK-G.

```

15 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
20 GTT TTG GTA CCA GGA TGC CAT GGT TCA GAA CCA TGT ATC ATT CAT 90
   V L V F G C H G S E F C I I H 30
35 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
40 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
55 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
60 ATG AAA TGT CCA TTG GTT AAA GGA CAA CAA TAT GAT ATT AAA TAT 270
   H K C P L V K G Q Q Y D I K Y 90
75 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
80 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
90 ATT GCT ACT CAT GCT AAA ATC CGC GAT 387
   I A T H A K I R D 129

```

Fig. 32 shows a sequence alignment performed at the ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>)

45

using the ClustalW algorithm on a BLAST search using the Der p 2-ALK-G amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 3 as input sequence. The alignment includes sequences from house dust mite species, i.e. Der p 2, Der f 2 and Eur m 2. In Fig. 32 amino acid residues identical to amino acids in the same position in the Der p 2-ALK-G protein

50

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

97

sequence are highlighted using black letters on grey background. Non-identical amino acids are printed in black on a white background.

5 Surface structure images

Amino acid sequences representing the house dust mite group 2 allergens have a similarity greater than 85 % and some of the molecular surface is conserved (grey-coloured zones), see Fig. 33.

Fig. 33 shows surface contours viewed from 4 different angles when superimposing the Der p 2-ALK-G protein sequence on to the published PDB:1A9V NMR structure, structure number 1 of 10 contained in the PDB file.

Conserved and highly solvent exposed amino acid spatially distributed over the entire surface within distances in the range of 25-30 Å are selected for mutation. In the sections below the following information is given: A list of amino acids considered to be appropriate for mutation (A), a list of the mutants designed (B) and the DNA sequences representing the mutants designed (C). Fig. 34 shows surface contours of mutant number 1 as an example. Grey colour indicates conserved amino acid residues. Black colour indicates amino acid residues selected for mutation.

A. List of amino acids selected for mutation

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

B. List of mutants designed

Mutant 1:

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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

98

Mutant 2:
K15E, S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, R128Q

5 Mutant 3:
K15E, S24N, H30G, K48A, K77N, K82N, K100N, R128Q

Mutant 4:
K15E, S24N, H30G, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

10 Mutant 5:
K15E, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

Mutant 6:
15 S24N, H30G, K48A, E62S, K77N, K82N, K100N, R128Q

Mutant 7:
K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N

20 Mutant 8:
K15E, S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, R128Q

Mutant 9:
K15E, S24N, R31S, K48A, H74N, K82N, K100N, R128Q

25 Mutant 10:
K15E, S24N, R31S, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

Mutant 11:
30 K15E, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

Mutant 12:
S24N, R31S, K48A, E62S, H74N, K82N, K100N, R128Q

35 C. Nucleotide sequence of mutants

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

99

Mutant 1:

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

5 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
 ggatgccatgggtAACgaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccatttatg
10 AACgtgccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatccgcgat

Mutant 2:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
 ggatgccatgggtAACgaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
20 atcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccatttatg
 AACgtgccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaattgcacaaaaatctgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatcCAGgat

25 Mutant 3:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttggtacca
30 ggatgccatgggtAACgaaccatgtatcattGGCcggtgtaaacattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggtttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccatttatg
 AACgtgccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
35 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatcCAGgat

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

100

Mutant 4:

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

5 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttgggtacca
 ggatgccatgggtAACgaaccaatgtatcattGGCgtggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaaaacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcattgccattatatg
10 AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaaattgcaccaAACTcttgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatcCAGgat

Mutant 5:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttgggtacca
 ggatgccatgggttcagaaccaatgtatcattGGCgtggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
20 atcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcattgccattatatg
 AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaaattgcaccaAACTcttgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatcCAGgat

25 Mutant 6:

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

 Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagtttgggtacca
30 ggatgccatgggtAACgaaccaatgtatcattGGCgtggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggtttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcattgccattatatg
 AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaaattgcaccaAACTcttgaaaatgttgcgtcactgttaaagtttgggtgataat
35 ggtgttttggcctgtgctattgtactcatgctaaaatcCAGgat

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

101

Mutant 7:

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

5 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttgggtacca
 ggatgccatggTAAcgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAActatatg
 aaatgtccattggTAAcggacaacaatatgatattaaatatacatggaaatgttcca
10 aaaattgcaccaAAcTctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatccgcat

Mutant 8:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttgggtacca
 ggatgccatggTAAcgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
20 atcgatgggttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAActatatg
 aaatgtccattggTAAcggacaacaatatgatattaaatatacatggaaatgttcca
 aaaattgcacaaaaatctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagtttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatccAGgat

25 Mutant 9:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAgttttgggtacca
30 ggatgccatggTAAcgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAActatatg
 aaatgtccattggTAAcggacaacaatatgatattaaatatacatggaaatgttcca
 aaaattgcaccaAAcTctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagtttgggtgataat
35 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatccAGgat

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

102

Mutant 10:

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

5 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
 ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
 aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
10 aaaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatcCAGgat

Mutant 11:

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

 GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
 ggatgccatggttcagaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
20 atcgatgggttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
 aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatcCAGgat

25 Mutant 12:

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

 Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagtttttggtacca
30 ggatgccatggtAACGaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
 gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
 atcgatgggttaAGCgttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
 aaatgtccattggtAACGgacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
 aaaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgcgtcactgttaaagttttgggtgataat
35 ggtgttttggcctgtgctattgtctactcatgctaaaatcCAGgat

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

103

EXAMPLE 7

Mutated recombinant mite allergens (Der p 1) with improved safety for specific allergy vaccination

5 In this example the application of the concept of the current invention on house dust mite allergens is exemplified by one allergen, Der p 1. Manipulation of other house dust mite allergens may be performed by
10 equivalent procedures.

Design of mutated recombinant Der p 1 molecules.

15 SEQ ID NO. 4 shows the nucleotide and deduced amino acid sequence of Der p 1-ALK clone, which is a wild-type isoform.

20 SEQ ID NO. 4: Nucleotide and deduced amino acid sequence of Der p 1-ALK

25	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 F 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
30	TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GGT GGC 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 GGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA	180
	A Y L A Y R N Q S L D L A E Q	60
35	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 S C H G D T	75
	ATT CCA CGT GGT ATT GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC CAA	270
40	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
45	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 GGT GAA GGT TTG GCT CAA ACC GAC	405
	F F N V N K I R E A L A Q T H	135
50	AGC GCT ATT GCC GTC ATT 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
55	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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

104

```

      Q P N Y H A V N I Y G Y S N A 180
5    CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT 585
      Q G V D Y W I V R N S W D F N 195
      TGG GGT GAT AAT GGT TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG 630
      W G D N G Y G Y F A A N I D L 210
10   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

```

Fig. 35 shows a sequence alignment performed at the ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) using the ClustalW algorithm on a BLAST search using the Der p 1-ALK amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 4 as input sequence. The alignment includes sequences from house dust mite species, i.e. Der p 1, Der f 1 and Eur m 1. In Fig. 35 amino acid residues identical to amino acids in the same position in the Der p 1-ALK protein sequence are highlighted using black letters on grey background. Non-identical amino acids are printed in black on a white background.

25 Surface structure images

Amino acid sequences representing the house dust mite group 1 allergens are similar to a certain degree and some of the molecular surface is conserved (grey-coloured zones), see Fig. 36. Fig. 36 shows surface contours viewed from 4 different angles when superimposing the Der p 1-ALK protein sequence on to a Der p 1 molecular structure model.

35 Conserved and highly solvent exposed amino acid spatially distributed over the entire surface within distances in the range of 25-30 Å are selected for mutation. In the sections below the following information is given: A list of amino acids considered to be appropriate for mutation
 40 (A), a list of the mutants designed (B) and the DNA sequences representing the mutants designed (C). Fig. 37 shows surface contours of mutant number 11 as an example.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

105

Grey colour indicates conserved amino acid residues.
Black colour indicates amino acid residues selected for mutation.

5 A. List of amino acids selected for mutation

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

10 B. List of mutants designed

Mutant 1:

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

15 Mutant 2:

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

Mutant 3:

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

20

Mutant 4:

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

Mutant 5:

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

Mutant 6:

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

30 Mutant 7:

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

Mutant 8:

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

35 P167T

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

106

Mutant 9:

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

5 Mutant 10:

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

Mutant 11:

10 E13S, P24T, Y50V, R78Q, R99E, Q109D, R128Q, R156E, R161Q,
P167T, W192FC. Nucleotide sequences of mutants

15 Mutant 1:

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

ACT AAC GGC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
 20 ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
 GGC 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
 25 CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT CGT GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GGT 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 CAA 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
 30 ATT CTC 666

Mutant 2:

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

35 ACT AAC GGC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

107

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 CTC 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 300
5 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 GGT 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 CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
10 TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666

Mutant 3:

15 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
20 GAA TTA CTC 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 GGT 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
25 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 CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666

30 Mutant 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
35 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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

108

GAA TTA GTC GAT TGT GCT TOC 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
5 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 CAA 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

10

Mutant 5:

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

15 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
20 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 CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
25 TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666

Mutant 6:

30 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 YGT 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
35 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

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

109

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 GGT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GGT 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 GGT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
 5 CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
 TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
 ATT CTC 666

Mutant 7:

10

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

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AAC ATC GAT TTG CCA 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
 15 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 CCA TAC GTT GCA CAG GAA 300
 CAA TCA TGC CCA CCA 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 GGT ATT GCC GTC 420
 20 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 GGT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
 CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CAA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
 TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
 ATT CTC 666

25

Mutant 8:

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

30

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CCA CAA ATG CAG 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
 35 GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CCA TAC GTT GCA CAG GAA 300
 CAA TCA TGC CCA CCA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

110

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 GGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
 GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GGT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
 CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CCA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
 5 TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
 ATT CTC 666

Mutant 9:

10 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 GGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
 15 GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG GGT 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 GGT 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
 20 ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC GGT CAT TAT GAT GGC GAA ACA ATC ATT CAA 480
 CAG GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GGT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
 CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CCA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
 TAC GGT TAT TTT GGT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
 ATT CTC 666

25

Mutant 10:

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

30

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 GGT 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 GGT 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
 35 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 GGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

111

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 COT 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 CAA AAC AGT TTT GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
 5 TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
 ATT CTC 666

Mutant 11:

10 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 CCA CAA ATG CGA 60
 ACT GTC ACT ACC ATT COT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
 15 GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG COT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
 GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CMT GGT GAT ACC ATT CCA CAG GGT ATT 240
 GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CCA TAC GTT GCA GAA GAA 300
 CAA TCA TGC CGA CCA 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
 20 ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC COT 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 CAA 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 666

25

EXAMPLE 8

Mutated recombinant grass allergens (Phl p 5) with
 improved safety for specific allergy vaccination

30

In this example the application of the concept of the
 current invention on grass pollen allergens is
 exemplified by one allergen, Phl p 5. Manipulation of
 other grass pollen allergens may be performed by
 35 equivalent procedures.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

112

Design of mutated recombinant Phl p 5 molecules

SEQ ID NO. 5 shows the nucleotide and deduced amino acid sequence of the Phl p 5.0103 clone, which is a wild-type isoform.

SEQ ID NO. 5: Nucleotide and deduced amino acid sequence of Phl p 5.0103.

```
10  gccgatctcggttacggcccccacccagctgcccggccgctacaccccgcg      60
   A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A      20
   acccccgcgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgacgacggagcagaag      120
   T P A A P A G A E P A G K A T T E E Q K      40
   ctgatcgaagaatcaacgcccgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgtcccg      180
15  L I E K I N A G F K A A L A A A A G V P      60
   ccagcggcaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcggccctccaagaagccttc      240
   P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F      80
   gcggagggcctctcggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctc      300
   A E G L S G E P K G A A E S S S K A A L      100
20  acctccaagctcgacgccgcctacaagctgcctacaagacgcccgggcccgcgcct      360
   T S K L D A A Y K L A Y K T A E G A T P      120
   gaggccaagtacgacgcctacgtcgccacgttaagcgaggcgtccgcacatcgcgggc      420
   E A K Y D A Y V A T V S E A L R I I A G      140
   accctcgaggtccacgcccgtcaagcccgcggccgagggtaaggtcatccccgcggc      480
25  T L E V H A V K P A A E E V K V I P A G      160
   gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgccgcttcaaggtcgctgccacgcccgaac      540
   E L Q V I E K V D A A F K V A A T A A N      180
   gccgccccccaacgacaagttcacggtcttcgagccgcttcaacgacgccatcaag      600
   A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K      200
30  gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgcctggaggccgcgtc      660
   A S T G G A Y E S Y K F I P A L E A A V      220
   aagcaggcctacgcccaccgtcgccacgcgcggaggtcaagtacactgtctttgag      720
   K Q A Y A A T V A T A P E V K Y T V F E      240
   accgcactgaaaaaggccatcacgccatgtccgaagcacagaagggtgccaaagccgccc      780
35  T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A      260
   gccgctgccaccgccacgcgaacgcgcgttggcgcggccacggcgccgccaccgcc      840
   A A A T A T A T A A V G A A T G A A T A      280
   gctactgggtggctacaaagtc      861

   A T G G Y K V
```

40

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

113

Fig. 38 shows a sequence alignment performed at the ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) using the ClustalW algorithm on a BLAST search using the Phl p 5.0103 amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 5 as input sequence. The alignment includes group 5 allergen sequences from grass species, i.e. Phl p 5, Poa p 5, Lol p 5, Hol 1 5, Pha a 5, Hor v 9 and Hor v 5. In Fig. 38 amino acid residues identical to amino acids in the same position in the Phl p 5.0103 protein sequence are highlighted using black letters on grey background. Non-identical amino acids are printed in black on a white background.

Surface structure images

Amino acid sequences representing the grass pollen group 5 allergens are similar to a certain degree and some of the molecular surface is conserved (grey-coloured zones), see Fig. 39. Fig. 39 shows surface contours viewed from 4 different angles when superimposing the Phl p 5.0103 protein sequence on to a Phl p 5 molecular structure model. The structure model encompass the molecule in two halves, Model A (amino acid 34-142) shown in Fig. 39A, and Model B (amino acid 149-259) shown in Fig. 39B.

Highly solvent exposed amino acid spatially distributed over the entire surface within distances in the range of 25-30 Å are selected for mutation. In the sections below, the following information is given: A list of amino acids considered to be appropriate for mutation (A), a list of the mutants designed (B) and the DNA sequences representing the mutants designed (C). Fig. 40 A and B shows surface contours of mutant number 1 Model A and Model B, respectively, as an example. Grey colour indicates conserved amino acid residues. Black colour indicates amino acid residues selected for mutation.

WO 02/40676

114

PCT/DK01/00764

A: List of amino acids selected for mutation

I45, R66, E133, R136, I137, D186, F188, K211, P214, Q222,
5 P232, L243, Q254

B. List of mutants designed

Mutant 1:

10 I45K, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

Mutant 2:

R66N, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

15 Mutant 3:

I45K, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

Mutant 4:

I45K, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

20

Mutant 5:

I45K, E133S, D186H, Q222K, L243E, Q254K

Mutant 6:

25 I45K, E133S, Q222K, P232G, L243E, Q254K

Mutant 7:

I45K, E133S, F188I, P214G, L243E, Q254K

30 Mutant 8:

I45K, E133S, F188I, K211N, L243E, Q254K

Mutant 9:

R66N, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

35

Mutant 10:

115

[illegible]

WO 02/40676

116

PCT/DK01/00764

gaggccaagtacgacgctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
 accctcgaggtccacgctcgaagcccgccgagggaggtcaaggtcatcccccgccg 480
 gaggctcgaggtcatcgaggaagtcgacgccccttcaaggtcgctgccacgcccgaac 540
 gccgcccccgccaaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 5 gcgagcacgggcccgcctacgagagctacaagttcatccccgcccctggaggcccgctc 660
 aagAAAgcctacgcccgaacgctcgccacgcccggagggtcaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAaaaaaggccatcacgccaatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagcccgc 780
 gccgtcgccaccgccaacgccaacgcccgttggcgccgccaacggcgccgccaacgccc 840
 gctactggtggtacaaaagtc 861

10

Mutant 3:

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

15 gccgatctcgggttaacggccccgccaccagctgccccggcgccggtacaacccccgc 60
 acccccgccgccccggcgccgagccgagccaggttaaggcgacgacccgaggaagaag 120
 ctgatcgagaagAAaaacgcccgttcaaggccgcttggccgctgcccgcgctcccg 180
 ccagcggaacagtaacggagcttcgtcgcaaccttggcgccgctccaacaggccttc 240
 gcggaggcctctcggggagcccaaggcgccgcgaatccagctccaaggccgctc 300
 20 acctccaagctcgacgcccctacaagctcgccacaagacacgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcccctacgtcgccacgttaagcgaggcgctcAGCcatcatcgccggc 420
 accctcgaggtccacgcccctcaagcccgccgcccgaagggtcaaggtcatcccccgccg 480
 gaggctcgaggtcatcgagaaggtcgacgccccttcaaggtcgctgccacgcccgaac 540
 gccgcccccgccaaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 25 gcgagcacgggcccgcctacgagagctacaagttcatccccgcccctggaggcccgctc 660
 aagAAAgcctacgcccgaacgctcgccacgcccggagggtcaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAaaaaaggccatcacgccaatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagcccgc 780
 gccgtcgccaccgccaacgccaacgcccgttggcgccgccaacggcgccgccaacgccc 840
 gctactggtggtacaaaagtc 861

30

Mutant 4:

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

35 gccgatctcgggttaacggccccgccaccagctgccccggcgccggtacaacccccgc 60
 acccccgccgccccggcgccgagccgagccaggttaaggcgacgacccgaggaagaag 120
 ctgatcgagaagAAaaacgcccgttcaaggccgcttggccgctgcccgcgctcccg 180
 ccagcggaacagtaacggagcttcgtcgcaaccttggcgccgctccaacaggccttc 240
 gcggaggcctctcggggagcccaaggcgccgcgaatccagctccaaggccgctc 300
 40 acctccaagctcgacgcccctacaagctcgccacaagacacgagggcgcgacgct 360
 gaggccaagtacgacgcccctacgtcgccacgttaagcgaggcgctccgcAAAtcgccggc 420
 accctcgaggtccacgcccctcaagcccgccgcccgaagggtcaaggtcatcccccgccg 480
 gaggctcgaggtcatcgagaaggtcgacgccccttcaaggtcgctgccacgcccgaac 540
 gccgcccccgccaaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
 45 gcgagcacgggcccgcctacgagagctacaagttcatccccgcccctggaggcccgctc 660
 aagAAAgcctacgcccgaacgctcgccacgcccggagggtcaagtaactgtctttgag 720
 accgcaGAaaaaaggccatcacgccaatgtccgaagcaAAAAaggctgccaagcccgc 780
 gccgtcgccaccgccaacgccaacgcccgttggcgccgccaacggcgccgccaacgccc 840
 gctactggtggtacaaaagtc 861

50

Mutant 5:

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

55 gccgatctcgggttaacggccccgccaccagctgccccggcgccggtacaacccccgc 60

15

Mutant 6:

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

35

Mutant 7:

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

55

Mutant 8:

	gcgatctcgggttagcgccgccgacaccgaagtcgccgcgcgcgcgcgtatacacccgcgc	60
5	accgccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	120
	ctgatcgagaagaGAAaaacaggacttgtcaaaggcatttgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	180
	cacagcagacaagtacacgcgcgcttgctgcaccaacttcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	240
	cgccggagcgacctctgcggcgagccccagggcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	300
	aacctccaagctcgacgcgcgcctcatgcgcctcacagaacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	360
10	gagccgcaagatcagacgcctaactgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	420
	gacctcgaggctcagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	480
	gagctcgaggctcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	540
	gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	600
	gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	660
15	aagacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	720
	accgcgaGAaaaaaacgcacacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	780
	gcgcctctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc	840
	gctactgggtgcgcacaagtc	861

[illegible][illegible]

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

119

gocgtgccaccgcaaccgcaaccgcccgttggcgccgacccggcgccgacccgccc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

Mutant 11:

5

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

gocgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
accccccgccgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgacccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAacgcccgttcaaggcgcccttggcgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggaagaatcaggagcgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaaggccttc 240
gcggaggccctctcgggcgagcccaaggcgccgcaatccagctccaaggcgccgcttc 300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcttc 360
gaggccaagtagcagcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
15 acctcgaggttcacgcccgtcaagccccggcgaggggtcaagggtcatccccggcgcc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgagccgcttcaagggtcgctgccaacccgcccgaac 540
gcgcccccgccaaCAaagttcaagctctcgaggcgccctccaacgacgcccataag 600
ggagcagcgggcgccctacgagagctacaagttcatcGGCgcccctggaggccgcccgtc 660
aagcaggcctacgcccacccgtcgccaccgcccggaggtcaagtaactgtctttgag 720
20 accgcaGAaaaaagccatcaccccatgtccgaagcaAAAaagctgccaagcccgcc 780
gcgctgccaccgccaacgcaaccgcccgttggcgccgacccggcgccgcccacgccc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

Mutant 12:

25

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

gocgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
accccccgccgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgacccgaggagcagaag 120
30 ctgatcgagaagAAAacgcccgttcaaggcgcccttggcgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggaagaatcaggagcgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaaggccttc 240
gcggaggccctctcgggcgagcccaaggcgccgcaatccagctccaaggcgccgcttc 300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcttc 360
gaggccaagtagcagcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
35 acctcgaggttcacgcccgtcaagccccggcgaggggtcaagggtcatccccggcgcc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgagccgcttcaagggtcgctgccaacccgcccgaac 540
gcgcccccgccaaCAaagttcaagctctcgaggcgccctccaacgacgcccataag 600
gcgagccagggcgccgctacgagagctacACtcatccccgcccggaggccgcccgttc 660
aagcaggcctacgcccacccgtcgccaccgcccggaggtcaagtaactgtctttgag 720
40 accgcaGAaaaaagccatcaccccatgtccgaagcaAAAaagctgccaagcccgcc 780
gcgctgccaccgccaacgcaaccgcccgttggcgccgacccggcgccgcccacccgccc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

Mutant 13:

45

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

gocgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggctacaccccgcc 60
accccccgccgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgacccgaggagcagaag 120
50 ctgatcgagaagAAAacgcccgttcaaggcgcccttggcgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggaagaatcaggagcgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaaggccttc 240
gcggaggccctctcgggcgagcccaaggcgccgcaatccagctccaaggcgccgcttc 300
acctccaagctcgacgcccctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcttc 360
gaggccaagtagcagcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
55 acctcgaggttcacgcccgtcaagccccggcgaggggtcaagggtcatccccggcgcc 480

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

120

gagctgcaaggtcatcgagaaggtcgacgcgccttcaaggtcgctgccacgcgcgccaac 540
 gccgccccgcgcaacgacaagttcacgtcttcgaggcgcccttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcacggcgcgccctacgagagctacaagttcatcGGCgcctggaggccgcgctc 660
 aagcaggcctacgcgcgcaacgtcgccacgcgGGCgaggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaaggccatcacgcctatgtccgaagcaAAAAaggtgccaagcccgcc 780
 gccgctgccacgcgccaacgcgcaacgcgcgcttgccgcgccacgcggtcgccacgcgc 840

Mutant 14:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccggtacacccccgccc 60
 accccccgcgccccggcgccgagcgagcagcaggttaaggcgacgacgaggagcagaag 120
 ctgatcgagaagAAAacgcggttcaaggcgcccttgccgctgccgcggtcccg 180
 ccagcggaacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaggccttc 240
 ggggagggccctcctggggcgagcccaaggcgccgcggaatccagctccaagggccgctc 300
 acctccaagctcgacgcgcctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgagcgtc 360
 gaggccaagtacgcgcctacgtcgccacgttaagcAGCgcgtccgcatcatcgccggc 420
 acctcgaggtccaagccgtcaagcccgcgccgagggaggtcaaggtcatcccgccggc 480
 gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcgccttcaaggtcgctgccacgcgcgccaac 540
 gccgccccgcgcaacgacaagttcacgtcttcgaggcgcccttcaacgacgcatcaag 600
 gcgagcagggcgcgccctacgagagctacaAACTtcatccccgcctggaggccgcgctc 660
 aagcaggcctacgcgcgcaacgtcgccacgcgGGCgaggtcaagtacactgtctttgag 720
 accgcaGAAAAaaaggccatcacgcctatgtccgaagcaAAAAaggtgccaagcccgcc 780
 gccgctgccacgcgccaacgcgcaacgcgcgcttgccgcgccacgcggtcgccacgcgc 840
 gctactggtgctacaaagtc 861

EXAMPLE 9

30

T-cell reactivity of recombinant and mutant Bet v 1:Purpose:

35 To investigate an *in vitro* T-cell response to the mutated
 allergens in terms of proliferation and cytokine
 production.

Methods:

40

PBL (Peripheral blood lymphocytes) from allergic patients
 were used in the following investigation.

Eight bet v 1 specific T-cell lines were established from
 45 the PBL with naturally purified bet v 1 in order to

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

121

sustain the variety of bet v 1 isoforms the T-cells are presented to, as described in a previously published protocol (26).

5 Ten PBL and eight T-cell lines were stimulated with birch extract (Bet v), naturally purified bet v 1 (nBet v 1), recombinant Bet v 1 (rBet v 1 or wt; 27) and four different mutated forms of rBet v 1 (described elsewhere): 2595, 2628, 2637, 2744, 2773. The 2637 mutant
10 was later found to be partly unfolded and will not be discussed.

In brief: In a round-bottomed 96 well plate PBL were added in 2×10^5 per well. The different birch samples
15 were added in three different concentrations in quadruplicates and allowed to grow for 6 days. At day 6 cell half of volume (100 μ l) from each well with the highest concentration of birch were harvested for cytokine production. Radioactive labelled thymidine was
20 added to the wells. Next day (day 7) the cells were harvested on a filter. Scintillation fluid was added to the filter and the radioactivity was measured in a scintillation counter.

25 Likewise in a 96 well round-bottomed 96 well plate T-cells were added in 3×10^4 T-cells per well and stimulated with irradiated autologous PBL (1×10^5 cells/well) and 3 different concentrations of the different birch samples. After 1 day cells from each well with the highest
30 concentration birch were harvested for cytokine production. Radioactive labelled thymidine were added to the wells. At day 2 the cells were harvested onto a filter and counted as described for PBL.

35 Supernatant from the quadruplicates were pooled and cytokines were measured using a CBA (cytokine bead array)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

122

kit from Becton Dickinson.

Results:

5 Ten PBL cultures showed specific stimulation to birch. In general proliferation of the PBL to the different birch samples were similar, although variations could be seen. In 3 PBL, nBet v 1 stimulated proliferation better than rBet v 1 and the mutants. The mutant birch samples
10 stimulated PBL almost identical to rBet v 1 (Fig. 41). Fig. 41 shows the Stimulation Index for the above-mentioned Bet v 1 preparations. The Stimulation Index (SI) is calculated as proliferation (cpm: count per minute) of the stimulated sample (highest concentration)
15 divided with the proliferation (cpm) of the medium control. PPD designates purified protein derivative from *Mycobacterium tuberculosis*, which serves as a positive control.

20 Cytokine production was dominated by IFN-gamma and increased proportionally with PBL proliferation. No signs of a Th1/Th2 shift were apparent (Fig. 42-44). Figure 42 shows a patient with a Th0 profile, Figure 43 a Th1 profile and Figure 44 a Th2 profile. Cytokine production
25 is measured in pg/ml indicated as the bars and the ratio between IL-5/IFN-gamma is the lower dashed line (Y-axis to the right). Proliferation is measured in cpm seen on the Y-axis to the right as a solid line measured in cpm. Medium and MBP (maltose binding protein) are included as
30 background controls.

Eight T-cell lines established on nBet v 1 and all, except one, proliferated equally well to all birch samples. Four T-cell lines were secreting Th0 like
35 cytokines based on the IL-5 and IFN-gamma ratio (Th2 > 5, 5 > Th0 > 0.2, 0.2 > Th1). Three T-cell lines were

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

123

secreting Th1 cytokines and one T-cell line was secreting Th2 cytokines. The IL-5/IFN-gamma ratio was not affected by the different birch samples.

5 Conclusion:

All PBL cultures and 7/8 T-cell lines that showed specific stimulation to nBet v 1 did also respond to rBet v 1 and the mutants. These data suggests that for T-cell stimulation a single isoform of Bet v 1 or these 4 mutants can substitute for the mixture of individual isoforms found in the natural allergen preparations. Thus, vaccines based on recombinant allergens or these 4 mutants will address the existing Bet v 1 specific T-cell population.

EXAMPLE 10

20 Induction of Bet v 1 specific IgG antibodies and blocking antibodies following immunization with recombinant and mutant Bet v 1 proteins:

In this section the term "blocking antibodies" is defined as antibodies, different from human IgE antibodies, that are able to bind to an antigen and prevent the binding of human IgE antibodies to that antigen.

The ability of recombinant Bet v1 2227 wild type protein (rBet v 1) and Bet v 1 2595, 2628, 2744 and 2773 mutant proteins to induce Bet v 1 specific IgG antibodies and blocking antibodies was tested in immunization experiments in mice.

35 BALB/cA mice (8 in each group) were immunized by intraperitoneal injections with recombinant Bet v1 2227 wild type protein or the four mutant proteins. The mice

were immunized four times with a dose interval of 14 days. The different proteins were conjugated to 1,25 mg/ml Alhydrogel, (Aluminium Hydroxide gel, 1,3 % pH 8.0 - 8.4, Superfos Biosector). The mice were immunized with
5 either 1 ug protein/dose or 10 ug protein/dose. Blood samples were drawn by orbital bleed at day 0,14,35, 21, 49 and 63.

Specific IgG antibody levels was analyzed by direct ELISA
10 using rBet v 1 coated microtiterplates and biotinylated rabbit anti mouse IgG antibodies (Jackson) as detection antibody. Immunization with recombinant Bet v1 2227 wild type protein or the four mutant proteins induced a strong
15 r Bet v 1 specific IgG response. This finding demonstrates that the four mutated proteins are able to induce antibodies that are highly cross reactive to the Bet v 1 2227 wild type protein

To assess the induction of blocking antibodies, serum
20 samples from birch pollen allergic patients were incubated with paramagnetic beads* coated with a monoclonal mouse anti-human IgE antibody. After incubation, the beads were washed and resuspended in buffer or diluted samples (1:100) of mouse serum from un-
25 immunized mice (control) or mice immunized as described above. Biotinylated r Bet v 1 was then added to this mixture of beads and mouse serum antibodies. After incubation, the beads were washed and bound biotinylated
30 rBet v 1 was detected using acridinium labeled streptavidine. Incubation of beads with serum from un-immunized mice did not change the binding of r Bet v 1 to the beads. In contrast, incubation of the beads with serum from mice immunized with the recombinant Bet v1
35 2227 wild type protein or the four mutant proteins significantly reduced binding of r Bet v 1 to the beads demonstrating the presence of Bet v 1 specific blocking

antibodies in the serum samples. Thus, at day 63 one or more serum samples from all high dose (10 ug/dose) immunization groups were able to reduce binding of r Bet v1 to the beads with more than 80%. These findings
5 demonstrate that the four mutated proteins are able to induce antibodies that can act as Bet v 1 specific blocking antibodies.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

126

REFERENCES

1. WO 97/30150 (Pangenetics B.V., Molecules for the induction of immunological tolerance)
- 5 2. WO 92/02621 (Biomay Biotechnik Produktions- und Handelsgesellschaft mbH, Allergens of Alder pollen and applications thereof)
- 10 3. WO 90/11293 (Immunologic Pharmaceutical Corporation, The University of North Carolina at Chapel Hill, Allergenic proteins from ragweed and uses thereof)
- 15 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).
- 20 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).
- 25 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).
- 30 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, 1229-35 1235 (1995).

8. Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon 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, Bannon 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. Wiedemahn 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,
5 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,
10 Larsen MR, Mørtz E, Roepstorff P, Larsen JN: "Characteri-
zation of Purified Recombinant Bet v 1 with Authentic N-
terminus, Cloned in Fusion with Maltose-Binding Protein".
Prot Exp Purification 8, 365-373 (1996a).
- 15 16. Ipsen H, Wihl J-Å, Petersen BN, Löwenstein 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)
- 20 17. Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN,
Joost van Neerven RJ, Schou C, Löwenstein 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).
- 25 18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman
DJ: "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.*
215, 403-410 (1990).
- 30 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
35 (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).
- 5
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, Struct Func Genet* 26, 358-360 (1996b).
- 10
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.
- 15
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).
- 20
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
25. Punnonen J: "Molecular Breeding of Allergy Vaccines and Antiallergic Cytokines". *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:173-182.
- 30
26. P.A. Würtzen, M. Wissenbach, H. Ipsen, A. Bufe, J. Arnved, and R. J. J. van Neerven. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104: 115-23.
- 35
27. Sparholt SH, Larsen JN, Ipsen H, Schou C, van Neerven RJ. *Clin Exp Allergy* 1997 Aug;27(8):932-41.

CLAIMS

1. A recombinant allergen, characterised in that it is a mutant of a naturally occurring allergen, wherein the mutant allergen has at least four primary mutations, which each reduce the specific IgE binding capability of the mutated allergen as compared to the IgE binding capability of the said naturally occurring allergen, wherein each primary mutation is a substitution of one surface-exposed amino acid residue with another residue, which does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates, wherein each primary mutation is spaced from each other primary mutation by at least 15 Å, and wherein the primary mutations are placed in such a manner that at least one circular surface region with a area of 800 Å² comprises no mutation.
2. A recombinant allergen according to claim 1, wherein the primary mutations are spaced 20 Å, preferably 25 Å and most preferably 30 Å.
3. A recombinant allergen according to claim 1 or 2 comprising a number of secondary mutations, which each reduce the specific IgE binding capability of the mutated allergen as compared to the binding capability of the said naturally occurring allergen, wherein each secondary mutation is a substitution of one surface-exposed amino acid residue with another residue, which does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates, wherein the secondary mutations are placed outside the said circular region.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

131

4. A recombinant allergen according to any of claims 1-3,
wherein at least one of the surface-exposed amino acids
to be substituted in the naturally occurring allergen has
a solvent accessibility of above 20 %, preferably above
5 30 %, more preferably above 40 % and most preferably
above 50 %.

5. A recombinant allergen according to any of claims 1-4,
wherein at least one of the surface-exposed amino acids
10 to be substituted in the naturally occurring allergen is
conserved with more than 70 %, preferably 80 % and most
preferably 90 % identity in all known homologous proteins
within the species from which said naturally occurring
allergen originates.

15 6. A recombinant allergen according to any of claims 1-5,
which essentially has the same α -carbon backbone tertiary
structure as said naturally occurring allergen.

20 7. A recombinant allergen according to any of claims 1-6,
wherein each amino acid residue to be incorporated into
the mutant allergen does not occur in the same position
in the amino acid sequence of any known homologous
protein within the taxonomic genus, preferably the
25 subfamily, more preferably the family, more preferably
the superfamily, more preferably the legion, more
preferably the suborder and most preferably the order
from which said naturally occurring allergen originates.

30 8. A recombinant allergen according to any of claims 1-
7, characterised in that the specific IgE binding to the
mutated allergen is reduced by at least 5%, preferably at
least 10%.

35 9. A recombinant allergen according to claim 6,
characterised in that when comparing the α -carbon

backbone tertiary structures of the mutant and the naturally occurring allergen molecules, the average root mean square deviation of the atomic coordinates is below 2Å.

5

10. A recombinant allergen according to any of claim 1-9, characterised in that said circular surface region comprises atoms of 15-25 amino acid residues.

10 11. A recombinant allergen according to any one of claims 1-10, characterised in that the surface-exposed amino acid residues are ranked with respect to solvent accessibility, and that one or more amino acids among the more solvent accessible ones are substituted.

15

12. A recombinant allergen according to any one of claims 1-11, characterised in that the surface-exposed amino acid residues are ranked with respect to degree of conservation in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates, and that one or more amino acids among the more conserved ones are substituted.

20

13. A recombinant allergen according to any of claims 1-12, wherein the mutant allergen is a non-naturally occurring allergen.

25

14. A recombinant allergen according to any of claims 1-13 comprising from 5 to 20, preferably from 6 to 15, more preferably from 7 to 12, and most preferably from 8 to 10 primary mutations.

30

15. A recombinant allergen according to any one of claims 1-14 characterised in that the mutant allergen comprises from 1 to 4 secondary mutations per primary mutation.

35

16. A recombinant allergen according to any one of claims 1-15, characterised in that one or more of the substitutions is carried out by site-directed mutagenesis.
- 5 17. A recombinant allergen according to any one of claims 1-16, characterised in that one or more of the substitutions is carried out by DNA shuffling.
- 10 18. A recombinant allergen according to any one of claims 1-17 characterised in that it is a mutant of an inhalation allergen.
- 15 19. A recombinant allergen according to claim 18, characterised in that it is a mutant of a pollen allergen.
- 20 20. A recombinant allergen according to claim 19 characterised in that it is a mutant of a pollen allergen originating from the taxonomic order of *Fagales*, *Oleales* or *Pinales*.
21. A recombinant allergen according to claim 20, characterised in that it is a mutant of *Bet v 1*.
- 25 22. A recombinant allergen according to claim 21, characterised in that one or more of the substitutions is selected from the group consisting of V2, D72, E87, K-129, E-60, N-47, K-65, P-108, N-159, D-93, K-123, K-32, 30 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, 35 K-137, E-141, E-87 and E-73.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

134

23. A recombinant allergen according to claim 19, characterised in that it is a mutant of a pollen allergen originating from the taxonomic order of *Poales*.
- 5 24. A recombinant allergen according to claim 19, characterised in that it is a mutant of a pollen allergen originating from the taxonomic order of *Asterales* or *Urticales*.
- 10 25. A recombinant allergen according to claim 18, characterised in that it is a mutant of a house-dust mite allergen.
26. A recombinant allergen according to claim 25, characterised in that it is a mutant of a mite allergen originating from *Dermatophagoides*.
27. A recombinant allergen according to claim 18, characterised in that it is a mutant of a cockroach allergen.
- 20 28. A recombinant allergen according to claim 18, characterised in that it is a mutant of an animal allergen.
- 25 29. A recombinant allergen according to claim 28, characterised in that it is a mutant of an animal allergen originating from cat, dog or horse.
- 30 30. A recombinant allergen according to any one of claims 1-17 characterised in that it is a mutant of a venom allergen.
- 35 31. A recombinant allergen according to claim 30, characterised in that it is a mutant of a venom allergen originating from the taxonomic order of *Hymenoptera*.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

135

32. A recombinant allergen according to claim 31, characterised in that it is a mutant of a venom allergen from the taxonomic order of Vespidae, Apidae and Formicoidae.

33. A recombinant allergen according to any one of claims 30-32 characterised in that it is a mutant of Ves v 5.

34. A recombinant allergen according to claim 33 characterised in that one or more of the substitutions is selected from the group consisting of 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.

35. A recombinant allergen according to any of claims 1-34 for use as a pharmaceutical.

36. Use of the recombinant allergen according to any of claims 1-34 for preparing a pharmaceutical for preventing and/or treating allergy.

37. A composition comprising two or more recombinant mutant allergen variants according to any of claims 1-34, wherein each variant is defined by having at least one primary mutation, which is absent in at least one of the other variants, wherein for each variant no secondary mutation is present within a radius of 15 Å from each

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

136

absent primary mutation.

38. A composition according to claim 37 comprising 2-12,
preferably 3-10, more preferably 4-8 and most preferably
5 5-7 variants.

39. A composition according to claim 37 or 38 for use as
a pharmaceutical.

10 40. Use of a composition according to claim 37 or 38 for
preparing a pharmaceutical for preventing and/or treating
allergy.

15 41. A pharmaceutical composition, characterised in that
it comprises a recombinant allergen according to any one
of claims 1-34 or a composition according to claim 37 or
38, optionally in combination with a pharmaceutically
acceptable carrier and/or excipient, and optionally an
adjuvant.

20 42. A pharmaceutical composition according to claim 41,
characterised in that it is in the form of a vaccine
against allergic reactions elicited by a naturally
occurring allergen in patients suffering from allergy.

25 43. A method of generating an immune response in a
subject comprising administering to the subject a
recombinant allergen according to any one of claims 1-34,
a composition according to claim 37 or 38 or a
30 pharmaceutical composition according to claims 41 or 42.

44. Vaccination or treatment of a subject comprising
administering to the subject a recombinant allergen
according to any one of claims 1-34, a composition
35 according to claim 37 or 38 or a pharmaceutical
composition according to claims 41 or 42.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

137

45. A process for preparing a pharmaceutical composition according to claim 41 or 42 comprising mixing a recombinant allergen according to any one of claims 1-34
5 or a composition according to claim 37 or 38 with pharmaceutically acceptable substances and/or excipients.

46. A pharmaceutical composition obtainable by the process according to claim 45.

10 47. A method for the treatment, prevention or alleviation of allergic reactions in a subject comprising administering to a subject a recombinant allergen according to any one of claims 1-34, a composition
15 according to claim 37 or 38 or a pharmaceutical composition according to any one of claims 41-42 or 46.

48. A method of preparing a recombinant allergen according to any one of claims 1-34, characterised in

20 a) identifying a number of amino acid residues in a naturally occurring allergen, which has a solvent accessibility of at least 20 %;

25 b) selecting at least four of the identified amino acid residues in such a manner that each selected amino acid is spaced from each other selected amino acid by at least 15 Å, and that the selected amino acids are placed in such a manner that at least one circular surface region
30 with a area of 800 Å² comprises no selected amino acid; and

c) effecting for each of the selected amino acids a primary mutation, which reduce the specific IgE binding
35 capability of the mutated allergen as compared to the binding capability of the said naturally occurring

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

138

allergen, wherein each primary mutation is a substitution of a selected amino acid residue with another amino acid, which does not occur in the same position in the amino acid sequence of any known homologous protein within the taxonomic species from which said naturally occurring allergen originates.

49. A method according to claim 48, characterised in ranking the said identified amino acid residues with respect to solvent accessibility and substituting one or more amino acids among the more solvent accessible ones.

50. A method according to claim 48 or 49, characterised in selecting identified amino acid residues, which are conserved with more than 70 % identity in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates.

51. A method according to claim 50, characterised in ranking the said identified amino acid residues with respect to degree of conservation in all known homologous proteins within the species from which said naturally occurring allergen originates and substituting one or more amino acids among the more conserved ones.

52. A method according to any of claims 48-51 comprising selecting the identified amino acids so as to form a mutant allergen, which has essentially the same α -carbon backbone tertiary structure as said naturally occurring allergen.

53. A method according to any of claims 48-52 characterised in that the substitution of amino acid residues is carried out by site-directed mutagenesis.

54. A method of preparing a recombinant allergen

according to any one of claims 1-34, characterised in that the allergen is produced from a DNA sequence obtained by DNA shuffling (molecular breeding) of the DNA encoding the corresponding naturally occurring.

5 55. A DNA sequence encoding a recombinant allergen according to any of claims 1-34, a derivative thereof, a partial sequence thereof, a degenerated sequence thereof or a sequence, which hybridises thereto under stringent
10 conditions, wherein said derivative, partial sequence, degenerated sequence or hybridising sequence encodes a peptide having at least one B cell epitope.

15 56. A DNA sequence according to claim 55, which is a derivative of the DNA sequence encoding the naturally occurring allergen.

20 57. A DNA sequence according to claim 56, wherein the derivative is obtained by site-directed mutagenesis of the DNA encoding the naturally occurring allergen.

58. A DNA sequence according to any of claims 55-57, wherein the sequence is a derivative of the sequence shown in Fig. 3, wherein the DNA sequence is mutated so
25 as to encode an allergen having at least four mutations selected from the group consisting of 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-
30 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.

35 59. A DNA sequence according to any of claims 55-57, wherein the sequence is a derivative of the sequence

shown in Fig. 13, wherein the DNA sequence is mutated so as to encode an allergen having at least four mutations selected from the group consisting of K-16, K-185, K-11, K-44, K-210, R-63, K-13, F-6, K-149, K-128, E-184, K-112, 5 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, 10 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.

15 60. A DNA sequence according to any of claims 55-57, wherein the sequence is a derivative of the sequence shown in Fig. 16, wherein the DNA sequence is mutated so as to encode an allergen having at least four mutations selected from the group consisting of R-128, D-129, H-11, 20 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- 25 124, 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, 30 N-46, E-42, T-91, D-87, N-10, M-111, C-8, H-124, I-68, P-79, K-109 and K-15.

61. An expression vector comprising the DNA according to any of claims 55-60.

35

62. A host cell comprising the expression vector of claim

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

141

61.

63. A method of producing a recombinant mutant allergen comprising the step of cultivating the host cell
5 according to claim 62.

64. A recombinant allergen according to any of claims 1-34 or encoded by the DNA sequence according to any of claims 55-60 comprising at least one T cell epitope
10 capable of stimulating a T cell clone or T cell line specific for the naturally occurring allergen.

65. A diagnostic assay for assessing relevance, safety or outcome of therapy of a subject using a recombinant mutant allergen according to any of claims 1-34 or a
15 composition according to claim 37 or 38, wherein an IgE containing sample of the subject is mixed with said mutant or said composition and assessed for the level of reactivity between the IgE in said sample and said
20 mutant.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

1/68

Fig. 1

Mutant-specific oligonucleotide primers used for mutant number 1. Mutated nucleotide underlined.

Bet v 1 sense	5'- AATTATGAGACTGAGACC <u>A</u> CCTCTGTTATCCCAGCAGCTCG -3'
Bet v 1 non-sense	3'- TTAATACTCTGACTCTGG <u>T</u> GGAGACAATAGGGTCGTCGAGC -5'
sense primer	5'- TGAGACC <u>C</u> CCTCTGTTATCCCAG -3'
non-sense primer	3'- ATACTCTGACTCTGGGGGAGACA -5'

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

2/68

Fig. 2

Oligonucleotide primers for site directed mutagenesis of
Bet v 1 (No. 2801).

all	sense	1: 183Bv, 15-mer	5'-GTTGCCAACGATCAG
1	sense	2: 184Bv, 23-mer	5'-TGAGACCCCTCTGTTATCCCAG
1	non-sense	3: 185Bv, 23-mer	5'-ACAGAGGGGCTCTCAGTCTCATA
2	sense	4: 186Bv, 31-mer	5'-GATACCCCTCTTCCACAGGTTGCACCCCAAG
2	non-sense	5: 187Bv, 31-mer	5'-ACCTGTGAAAGAGGGTATCGCCATCAAGGA
3	sense	6: 188Bv, 23-mer	5'-AACATTTCAGGAAATGGAGGGCC
3	non-sense	7: 189Bv, 23-mer	5'-TTTCCTGAAATGTTTCAACACT
4	sense	8: 190Bv, 23-mer	5'-TTAAGAACATCAGCTTCCCGAA
4	non-sense	9: 191Bv, 23-mer	5'-AGCTGATGTTCTTAATGTTTCCA
5	sense	10: 192Bv, 23-mer	5'-GGACCATGCAAACTTCAAATACA
5	non-sense	11: 193Bv, 23-mer	5'-AGTTTGCAATGGTCCACCTCATCA
6	sense	12: 194Bv, 23-mer	5'-TTTCCCTCAGGCTCCCTTTCAA
6	non-sense	13: 195Bv, 23-mer	5'-AGGCCTGAGGGAAGCTGATCTT
7	sense	14: 196Bv, 24-mer	5'-TGAAGGATCTGGAGGGCCTGGAAC
7	non-sense	15: 197Bv, 24-mer	5'-CCCTCCAGATCCTTCAATGTTTTC
8	sense	16: 198Bv, 24-mer	5'-GGCAACTGGTGATGGAGGATCCAT
8	non-sense	17: 199Bv, 24-mer	5'-CCATCACCAGTTGCCACTATCTTT
all	non-sense	18: 200Bv, 15-mer	5'-CATGCCATCCGTAAG

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

3/68

Fig. 3

Overview of all Bet v 1 mutations

1 (A-C)	
GGTGTGTTAATTATGAGACTGAGACCACTCTGTATCCAGCAGCTCGACTGTTCAAG	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)	
GCCTTTATCCTTGTATGGCGATACCTCTTTCCAAAGGTGCACCCCAAGCCATTAGCAGT	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)	
GTGAAACATTTGAAGGAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTCCCGAA	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)	
GGCCTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCAACCAACTTCAAA	240
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K	80
TACAATTACAGCGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTTGGAAGAGATCTCCAAC	
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)	
GAGATAAAGATAGTGGCAACCCCTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAGTAC	360
E I K I V A T P-G D G G S I L K I S N K Y	120
CACRCCAAAGGTGACCATGAGGTGAAGGCAGAGCAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATGGGC	
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G	140
GAGACACTTTTGAAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAATAA	
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N stop	159

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

4/68

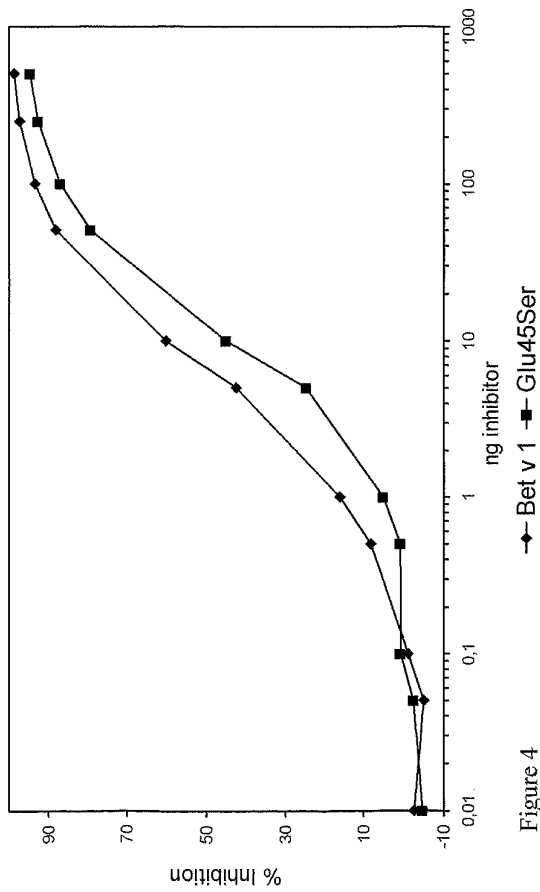


Figure 4

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

5/68

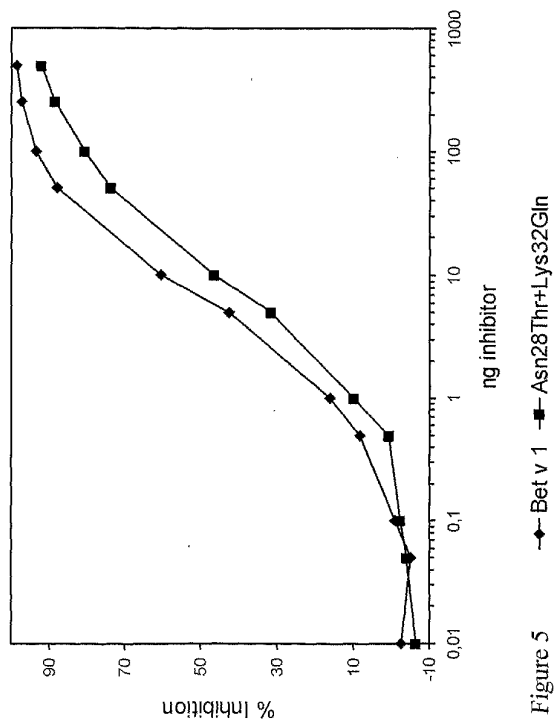


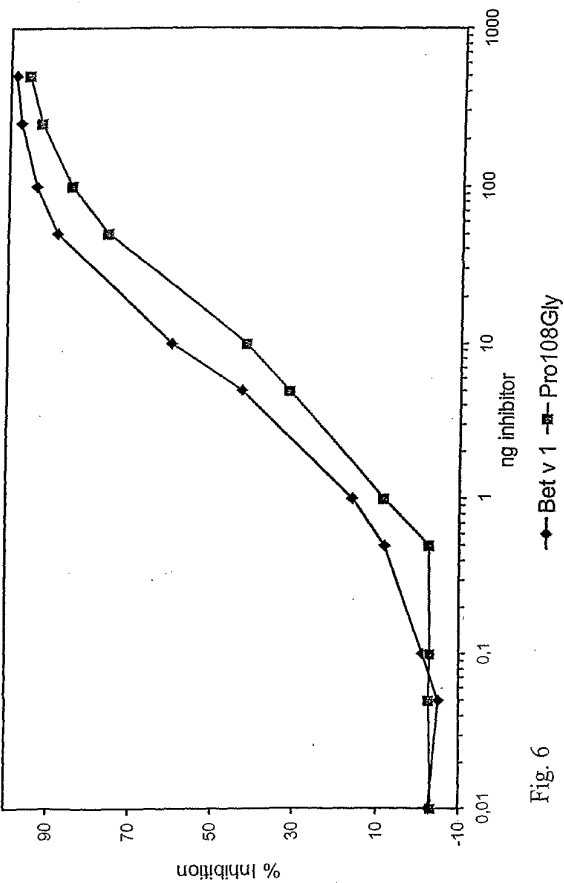
Figure 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

6/68



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

7/68

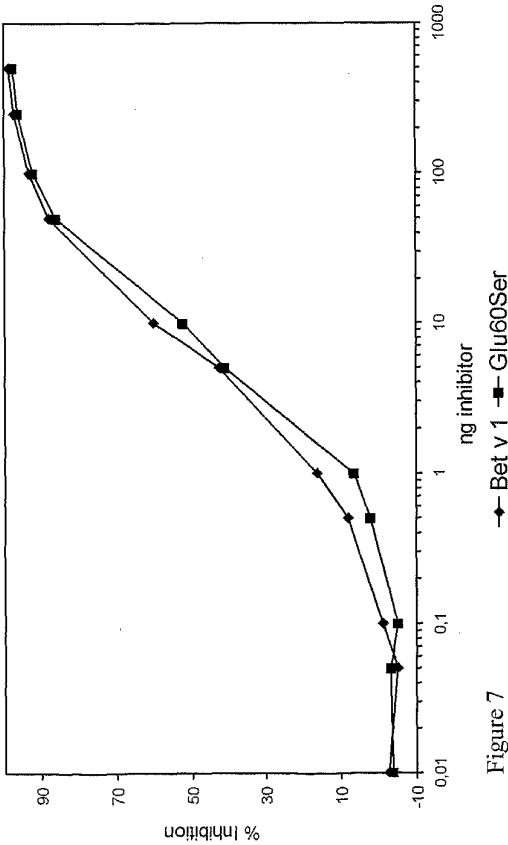
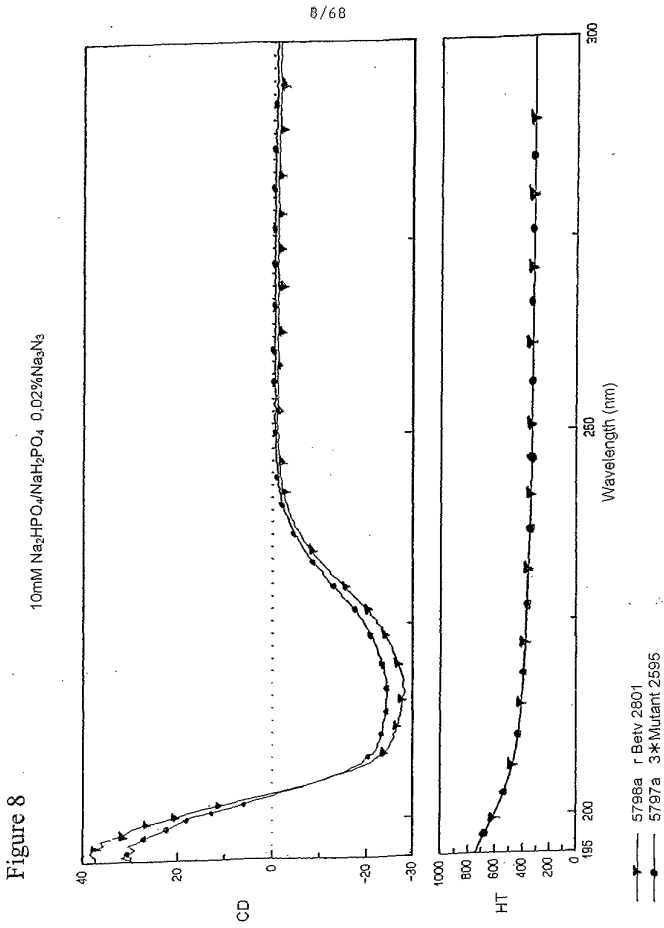


Figure 7

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

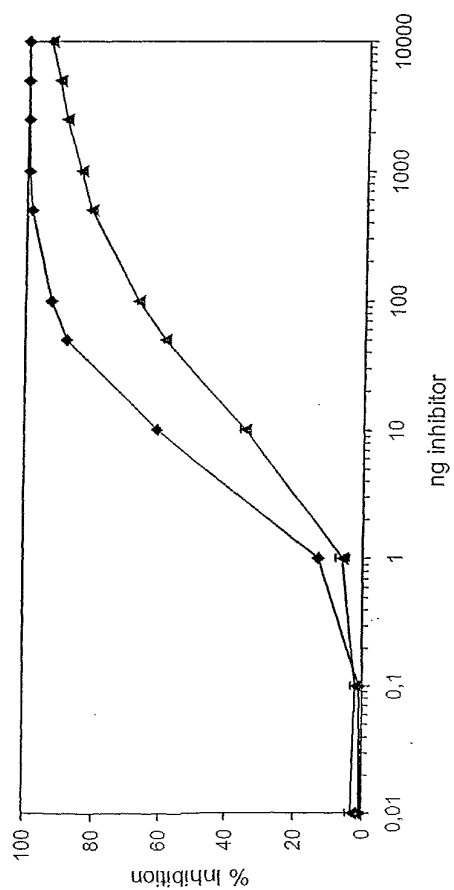


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

9/68



◆ Bet v 1 ▲ Glu45Ser, Pro108Gly, Asn28Thr+Lys32Gln.

Fig. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

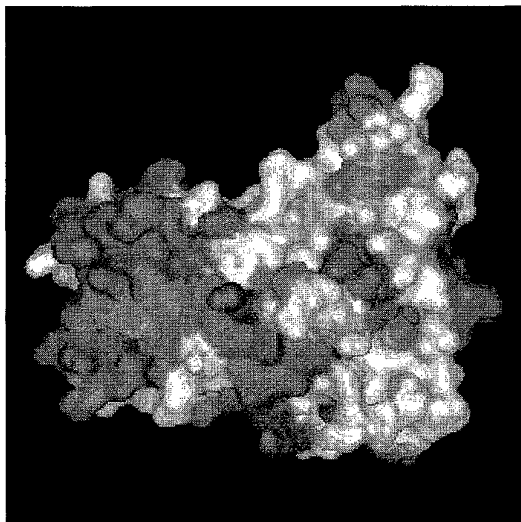
WO 02/40676

PCT/DK01/00764

10/68

Figure 10

Conserved residues among
Vespula antigen 5



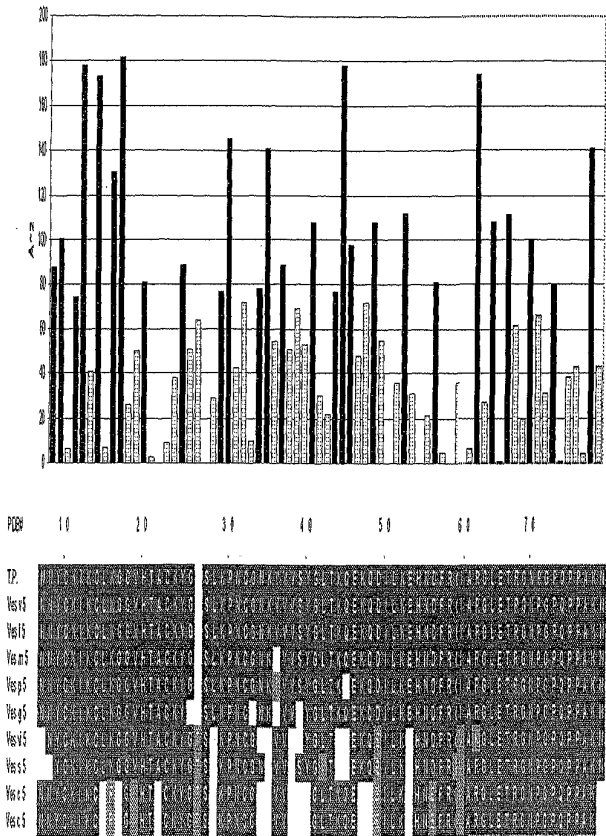
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

11/68

Figure 10 (cont.)



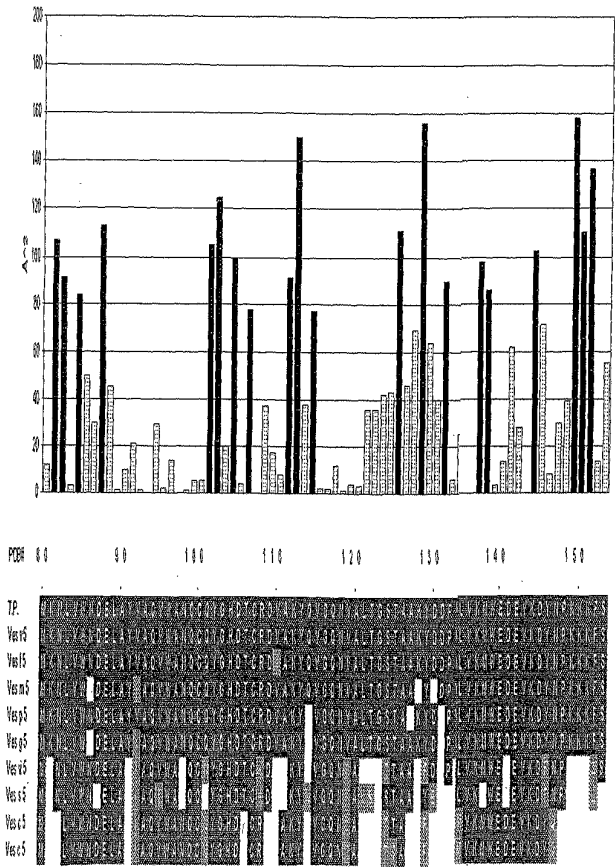
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

12/68

Figure 10 (cont.)



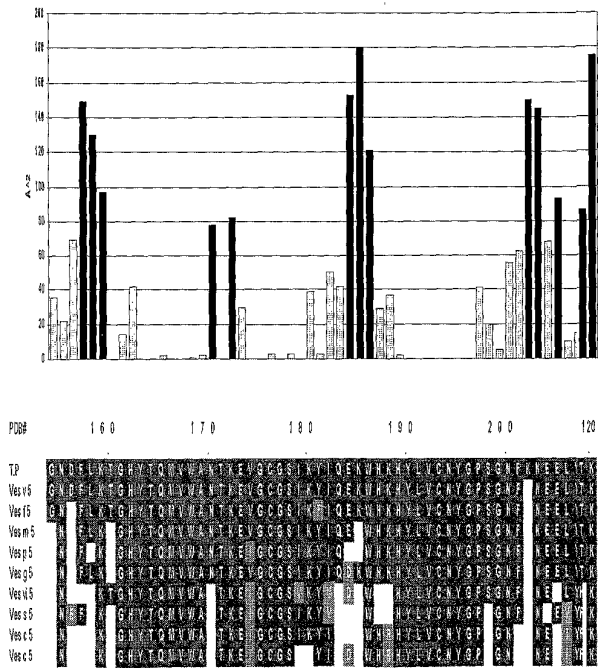
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

13/68

Figure 10 (cont.)



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

14/68

Fig.11

Mutant-specific oligonucleotide primers used for Ves v 5 mutants.
Mutated nucleotides underlined.

Ves v 5 mutant 1 (K72A)

Ves v 5 sense	5'-	ACCACAGCCTCCAGCGAAGATATGAAAAATTTGGTATGGA	-3'
Ves v 5 non-sense	3'-	TGGTGTGGAGGTCGCTTCTTAACTTTTAAACCATACCT	-5'
sense primer	5'-	CCAGCGGCTAATATGAAAAAT	-3'
non-sense primer	3'-	GTCGGAGGTCGCCGATTATAC	-5'

Ves v 5 mutant 2 (Y96A)

Ves v 5 sense	5'-	GGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACTTGCAGGGATG	-3'
Ves v 5 non-sense	3'-	CGATTAGTTACAGTTATACCAAGTGCATGAACGTCCTAC	-5'
sense primer	5'-	TGTCAGCTGGTCACGATACT	-3'
non-sense primer	3'-	TTAGTTACAGTTCGACCAAGT	-5'

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

-
15/68

Fig. 12

Oligonucleotide primers for site directed mutagenesis of
Ves v 5.

all sense 1: XhoI start, 38-mer:

EcoRI
5'-CCGCTCGAGAAAGGAACAATTATTGTAATAAATAAATG
L E K R N N Y C K I K
KecI cleavage site amino terminus of Ves v 5

1	sense	1: K72As	21-mer	5'-CCAGCGGCTAATATGAAAAAT
1	non-sense	2: K72Aa	21-mer	5'-CATATTAGCCGCTGGAGGCTG
2	sense	3: Y96As	21-mer	5'-TGTCAGCTGGTCACGATACT
2	non-sense	4: Y96Aa	21-mer	5'-GTGACCAGCTTGACATTGATT
all	non-sense	7: CT-pPIC2αA,	21-mer	5'-ATTCATCAGCTGCGAGATAGG

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

16/68

Fig. 13

Overview of Ves v 5 mutations

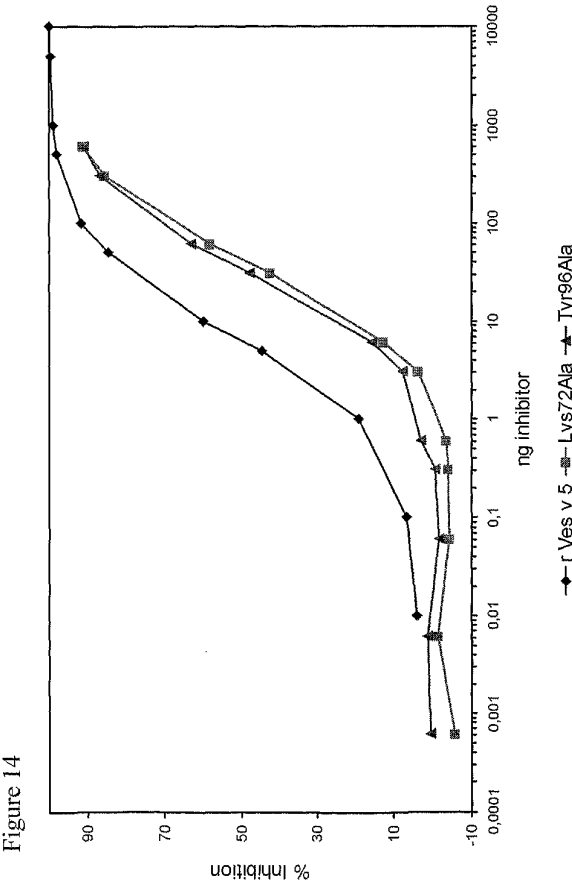
1	AACAATATTGTAAATAAATGTTTGAAGGAGGTGCCATCTGCCTGCAATATGGA	60
1	N N Y C K I K C L K G G V H T A C K Y G	20
61	AGTCCTAAACCGAATTGCGGTAAAGGTAGTGGTATCCTATGGCTAACGAAACAAGAG	120
21	S L K P N C G N K V V V S Y G L T K Q E	40
121	AACAAGACATCTTAAAGGAGCACAATGACTTTAGACAAAAATTCACGAGGATTGGAG	180
41	K Q D I L K E H N D F R Q K I A R G L E	60
	1[K72A] (AAG-GCT)	
181	ACTAGAGGTAATCCTGGACCAAGCCTCCAGCGAAGATATGAAAAATTGGTATGGAAC	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	GACGAGTTAGCTTATGTCGCCAAGTGTGGGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACT	300
81	D E L A Y V A Q V W A N Q C Q Y G H D T	100
301	TGCAGGGATGTAGCAAAATATCAGGTTGGACAAAACGTAGCCTAACAGGTAGCACGGCT	360
101	C R D V A K Y Q V G Q N V A L T G S T A	120
361	GCTAAATACGATGATCCAGTTAACTAGTTAAATGTGGGAAGATGAAGTGAAGATTAT	420
121	A K Y D D P V K L V K M W E D E V K D Y	140
421	AATCCTAAGAAAAAGTTTCGGGAACGACTTTCTGAAACCGGCCATTACACTCAATG	480
141	N P K K K F S G N D F L K T G H Y T Q M	160
481	GTTTGGGCTAACCAAGGAAGTTGTTGTGGAAAGTATAAAATACATTCAAGAGAAATGG	540
161	V W A N T K E V G C G S I K Y I Q E K W	180
541	CACAAACATTACCTTGTATGTAATTATGGACCCAGCGGAACTTTAAGAATGAGGAACCT	600
181	H K H Y L V C N Y G P S G N F K N E E L	200
601	TATCAACAAAGTAA	612
201	Y Q T K stop	204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

17/68



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

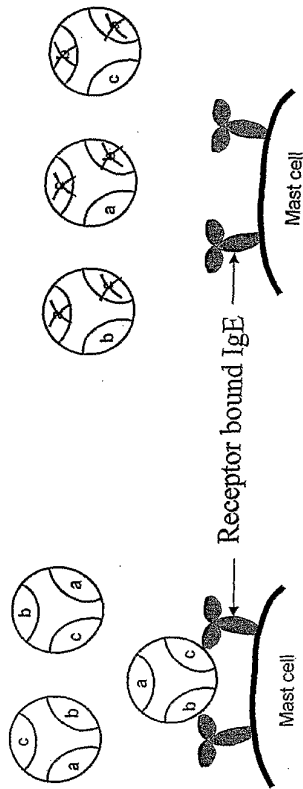
WO 02/40676

PCT/DK01/00764

18/68

Fig. 15

Effect of point mutations in dominating IgE epitopes
hypothetical model with 3 epitopes

Cross-linking
Fig. 15ANo cross-linking
Fig. 15B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

19/68

Fig. 16

DNA SEQUENCE

Der p 2 (DNA sequence referred to in notes in accession No. P49278 SWISSPROT)

ORIGIN

```
1   cacaaattct tcttcttc ttactactga tcaattaatc gaaaacaaaa ccaaacaaac
61   catcaaaat gatgtacaaa atttctgtc ttcatgtt ggtgcagoc gttgtotgtg
121  atcaagtoga tgtcaaagat tgtgccaatc atgaaatcaa aaaagtittg gtaccaggat
181  gccatggttc agaaccatgt atcattcatc gtggtaaac attccaattg gaagccgttt
241  tcgaagccaa ccaaaacaca aaaacggcta aaatgaaat caaagcctca atcgatggtt
301  tagaagtga tgtcccggt atgatccaa atgcatgcca ttacatgaaa tgccattgg
361  ttaaaggaca acaatatgat attaaatata catggaatgt tccgaaaatt gcacaaaaat
421  ctgaaaatgt tgtctcact gttaaagtta tgggtgatga tgggtitttg gccctgtcta
481  ttgctactca tgcataaat cgcgattaaa tcaaacaaaa ttattgatt ttgtaatcac
541  aaatgatga ttttcttc aaaaaaaaaa taaataaaat ttgggaatt c
```

AMINO ACID SEQUENCE

Der p 2 (Accession No. P49278 SWISSPROT; includes signal peptide 1-17)

```
1   mmvklclsl lyaavardqv dvkdcanhei kkvlvpgchg sepciihrkg pfqleavfea
61   nqntktakie ikasidglev dvpgidpnac hymkcpivkg qqydikytwn vpkiapksen
121  vvvtkvmgd dgvlaciat hakird
```

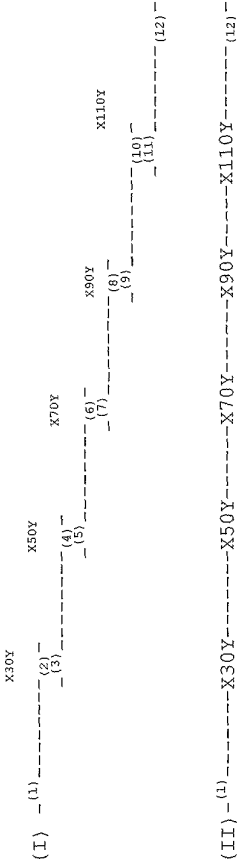
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

20/68

Figure 17



Lines represents DNA sequences.
Numbers in parentheses above lines represents sense oligonucleotide primers: (1), (3), (5), (7), (9), (11).
Numbers in parentheses below lines represents anti-sense oligonucleotide primers: (2), (4), (6), (8), (10), (12).
Notation X (position) Y represents mutations.
(1) Represents the sense oligonucleotide primer accommodating the protein N-terminus.
(12) Represents the anti-sense oligonucleotide primer accommodating the protein C-terminus.

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

21/68

Bet v 1 (2637)
(A16P, N28T, K32Q, K103T, P108G, L152K, A153G, S155P)
DNA template: Bet v 1 (2571) carrying N28T, K32Q, P108G mutations.

331pMale
368Bva
367Bvs
370Bva
369Bvs
372Bva

368Bva : CAGACTAATTCGAGCTCGGTACCC
367Bvs : CAGTGGGGTCTGGGATACAGA
370Bva : CCAGCAGCGGAGCTGTTCAGAGCC
369Bvs : CACTATGGTTATCTCTCTTGGAGAT
372Bva : TTACTGAATTCATTAGTTGTAGGCTTCGGGTGgcctttGAGGTA

Figure 18
Bet v 1 (2628) (Y5V, E45S, K65N, K97S, K134E)
DNA template: Bet v 1 (2589) carrying the Y5V mutation.

331pMale (s)
188BV (a)
188BV (s)
362BV (a)
361BV (s)
364BV (a)
363BV (s)
366BV (a)
365BV (s)
332pMale (a)

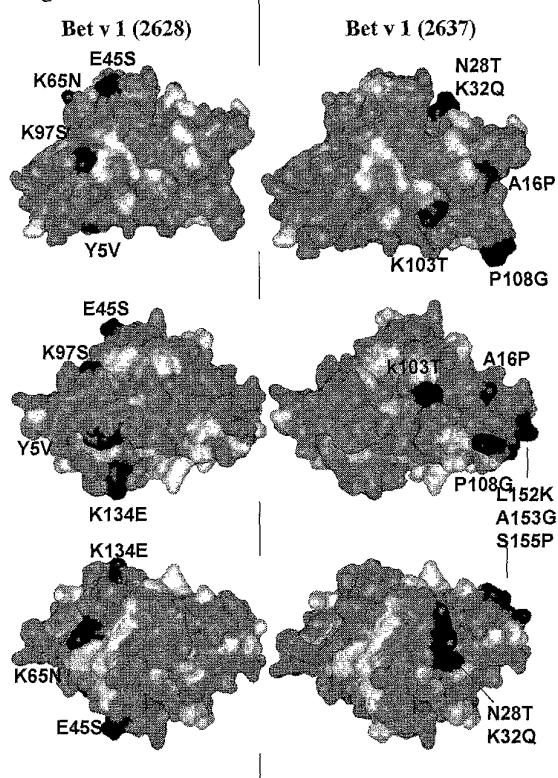
331pMale c : CAGACTAATTCGAGCTCGGTACCC
188BV : TTTCCTGAAATGTTTCAACACT
188BV : AACATTCAGGAATGGAGGCC
362Bva : CACGTAGTTGGAAGGGGCTTC
361Bvs : TTTCAGTCTGTCGAGGACAGAT
364Bva : GGAGTGTCTCTCAATGTGTGCC
363Bvs : GGAGAGCATCTCCAGAGATATAA
366Bva : ACTTGTCTCACTGCTCTGCTT
365Bvs : CAGGTTGAAGCAAGTAAAGAAATG
332pMale c : GCAGGTGCACTCTAGAGGATCCAT

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

22/68

Figure 19



Molecular surface of Bet v 1.

Left side: Bet v 1 (2628), Right side: Bet v 1 (2637)

Grey: Backbone + amino acids 95-100% conserved among *Fagales*

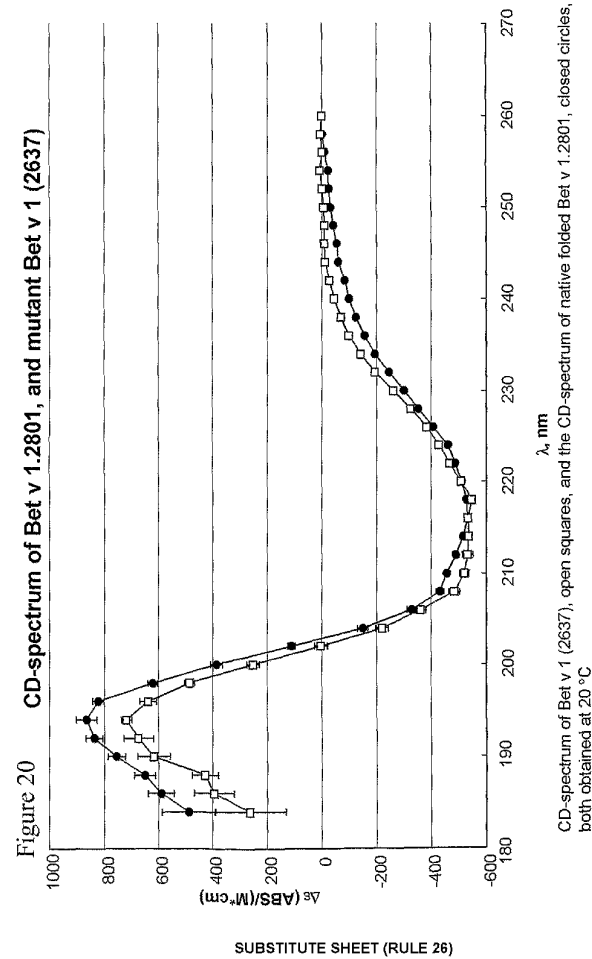
Black: Introduced point mutations.

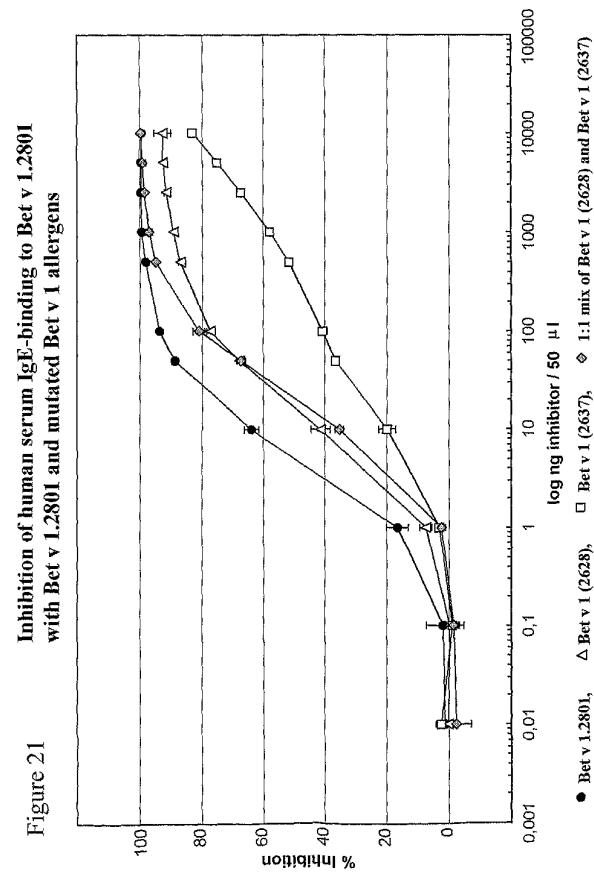
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

23/68





WO 02/40676

PCT/DK01/00764

25/68

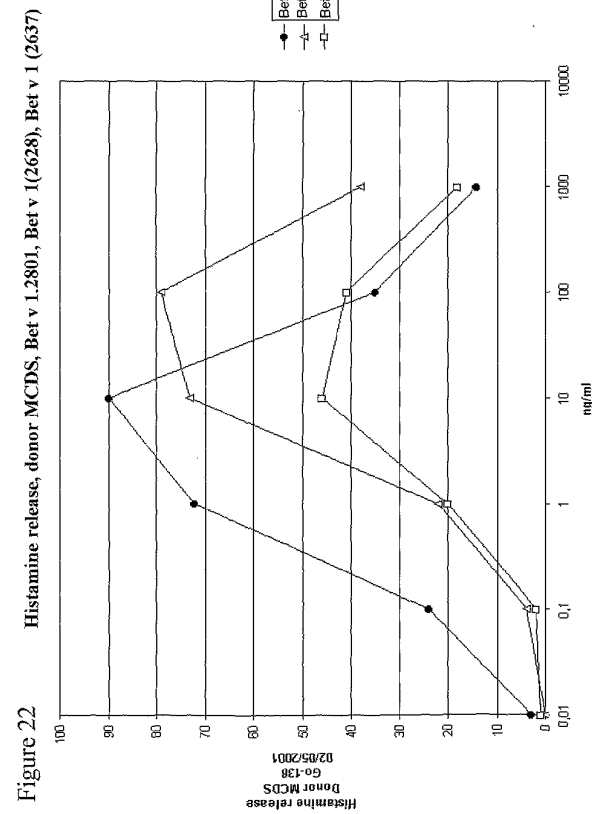
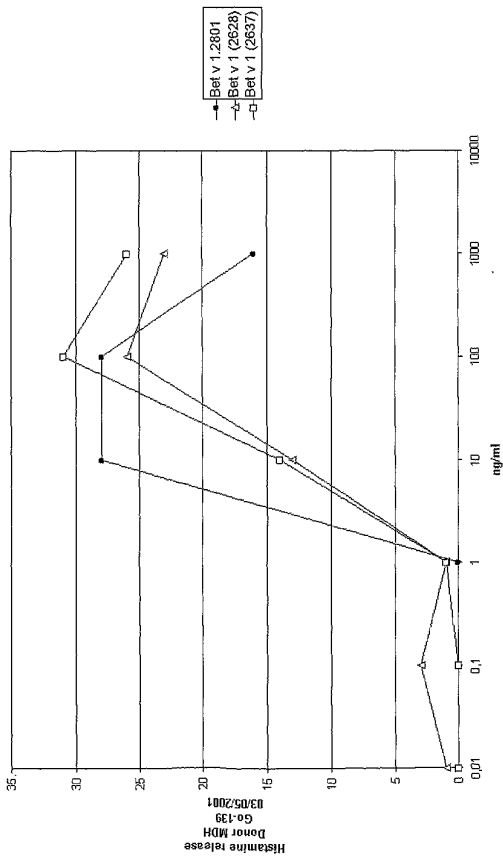


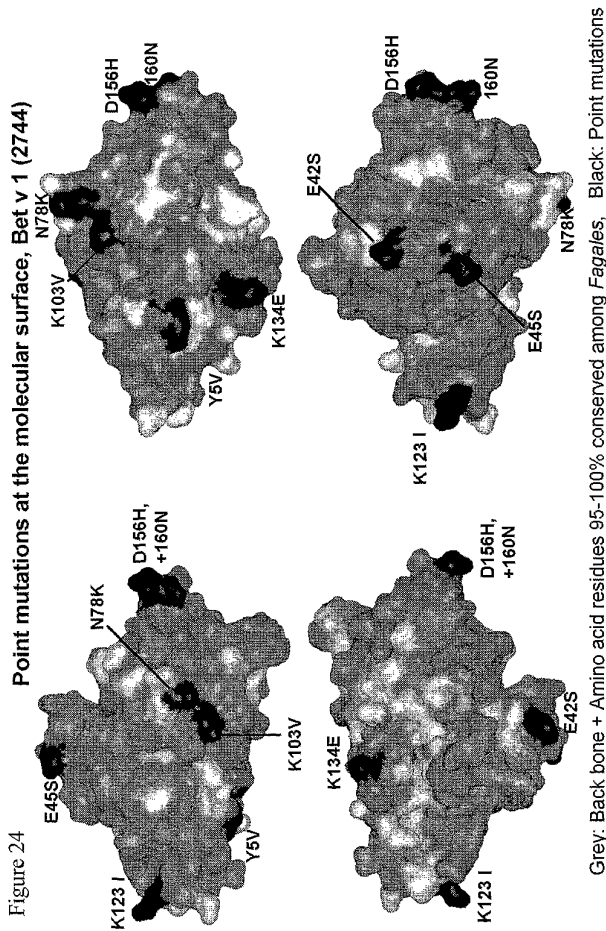
Figure 23 Histamine release, donor MDH, Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1 (2637)



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

27/68

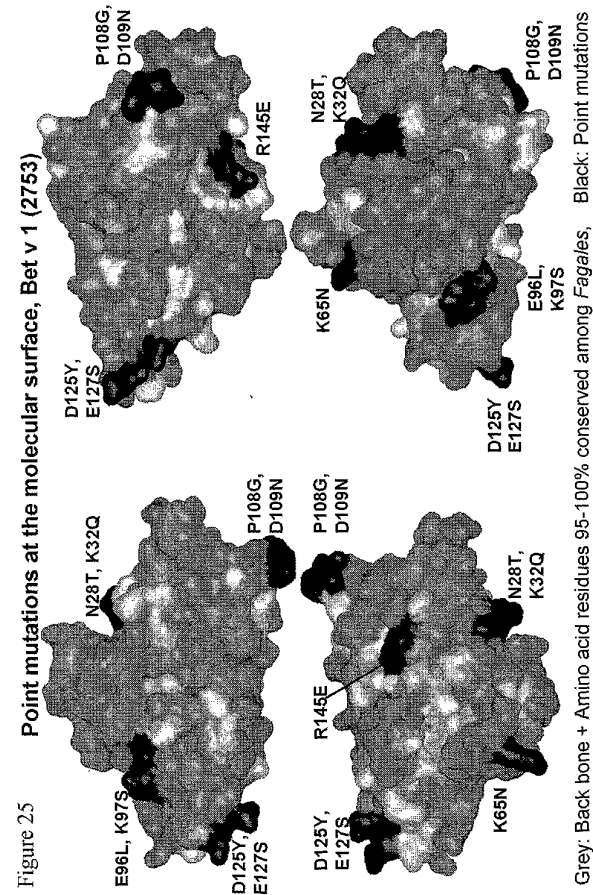


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

28/68



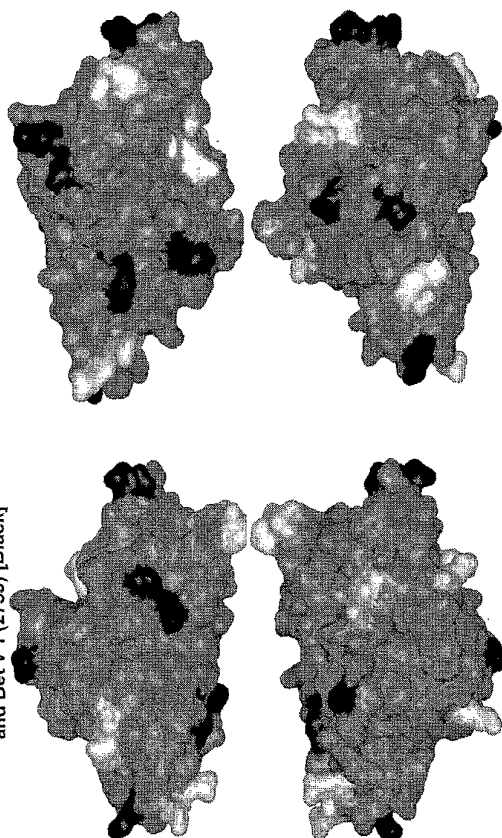
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

29/68

Figure 26 Distribution of point mutations at the molecular surface of, Bet v 1 (2744) [white],
and Bet v 1 (2753) [Black]



Grey: Molecular surface; amino acid residues 95-100% conserved among *Fagales*
Black: Mutations (Y5V, K134E), (E42S, E45S), (N78K, K103V), K123 I, (D156H, +160N)
White: Mutations (N28T, K32Q), K65N, (E96L, K97S), (P108G, D109N), (D125Y, E127S), R145E

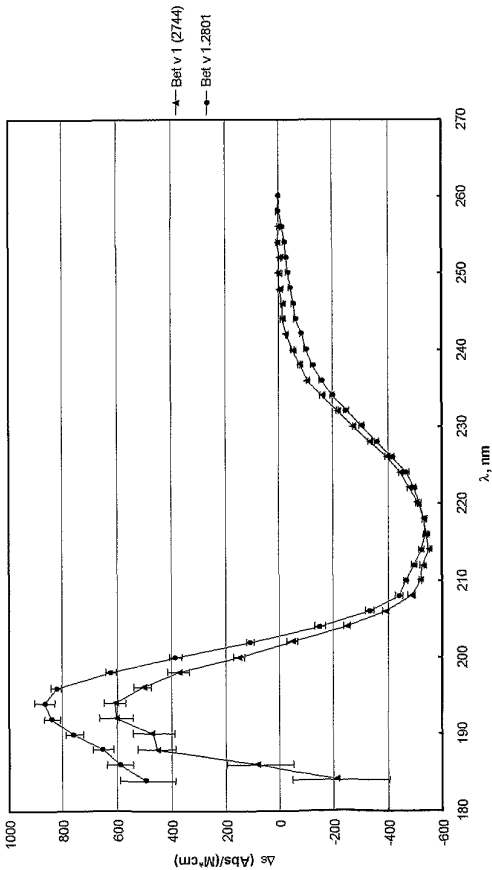
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

30/68

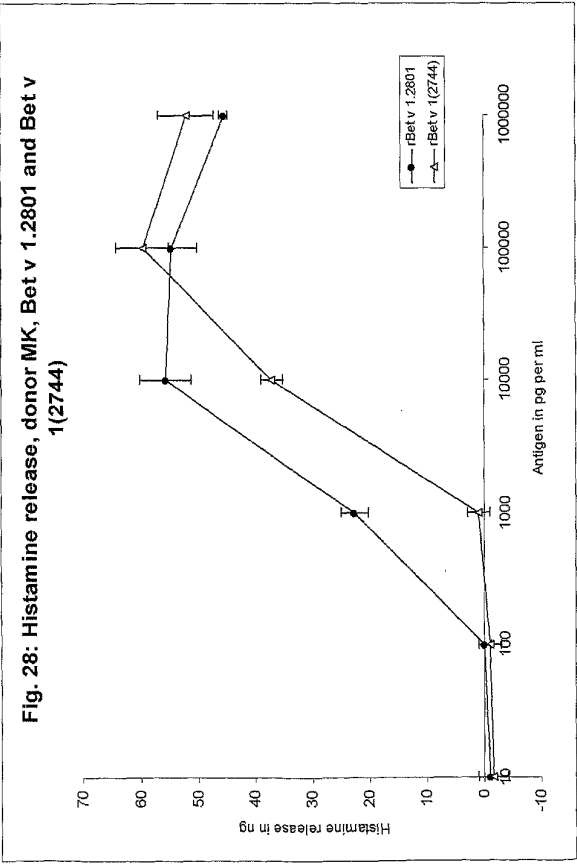
Figure 27 Circular dichroism spectra of Bet v 1.2801 and mutant Bet v 1(2744), pH 7.13, T 20C.



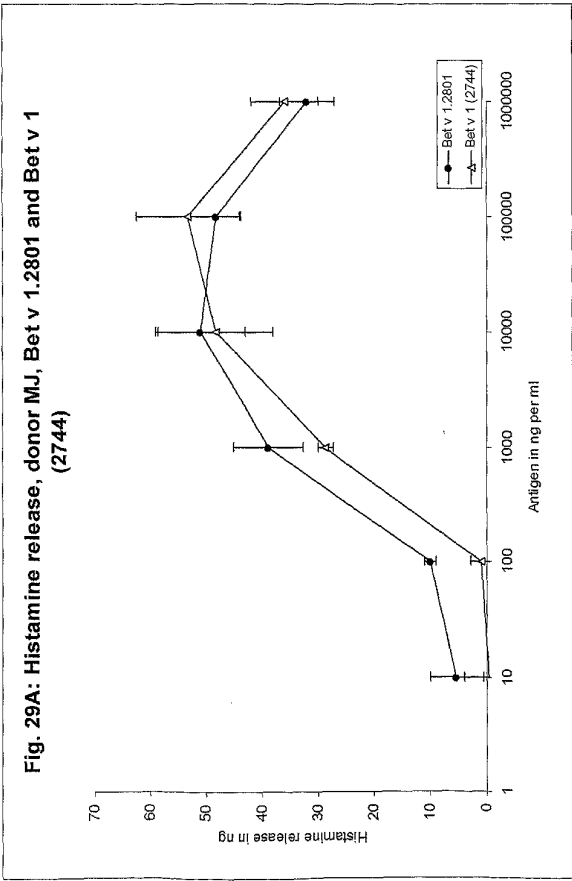
WO 02/40676

PCT/DK01/00764

31/68



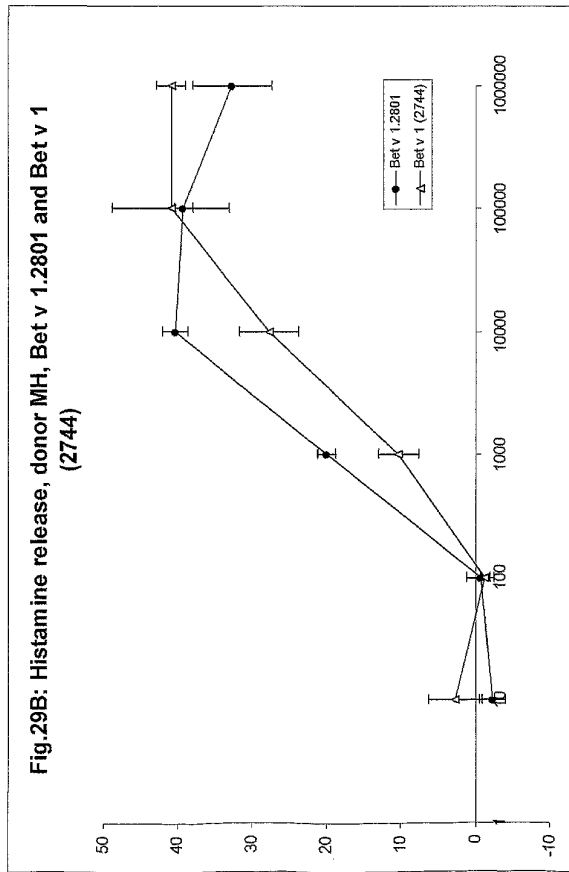
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



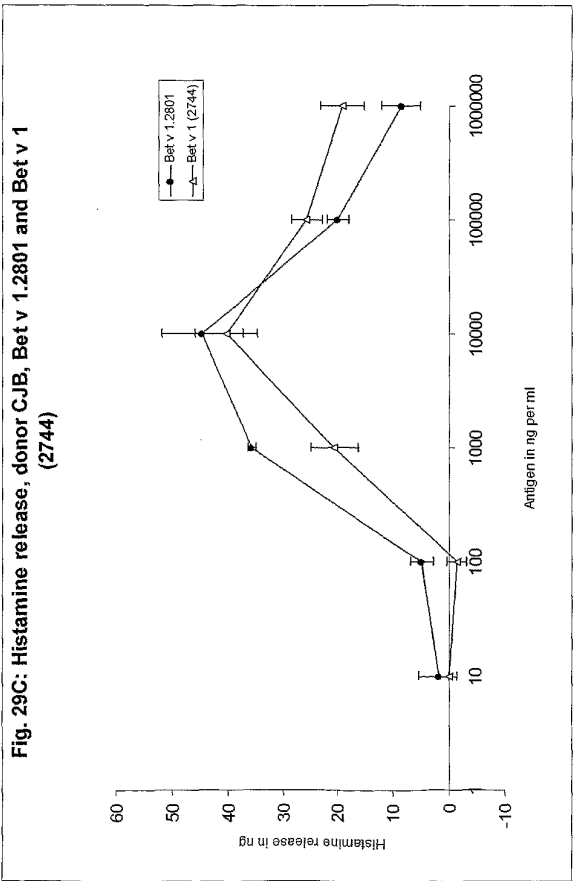
WO 02/40676

PCT/DK01/00764

33/68



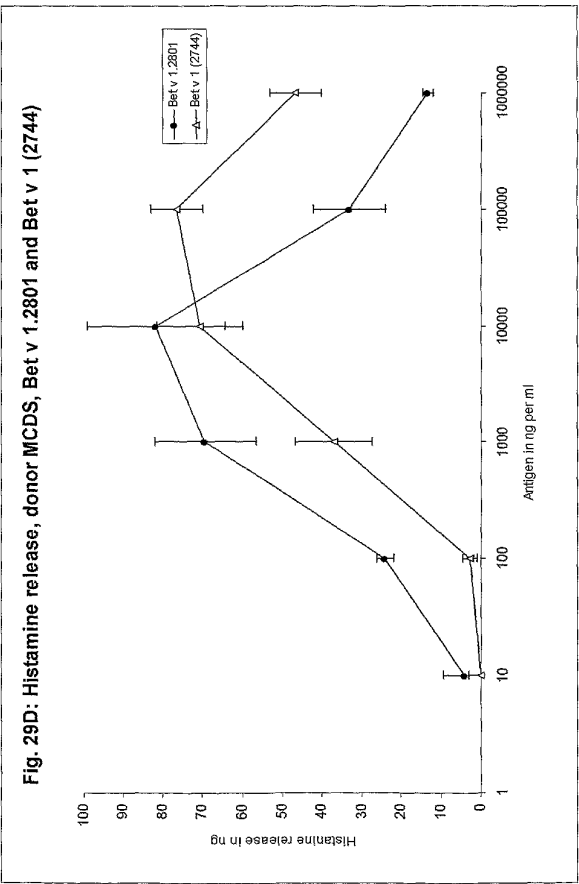
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

35/68



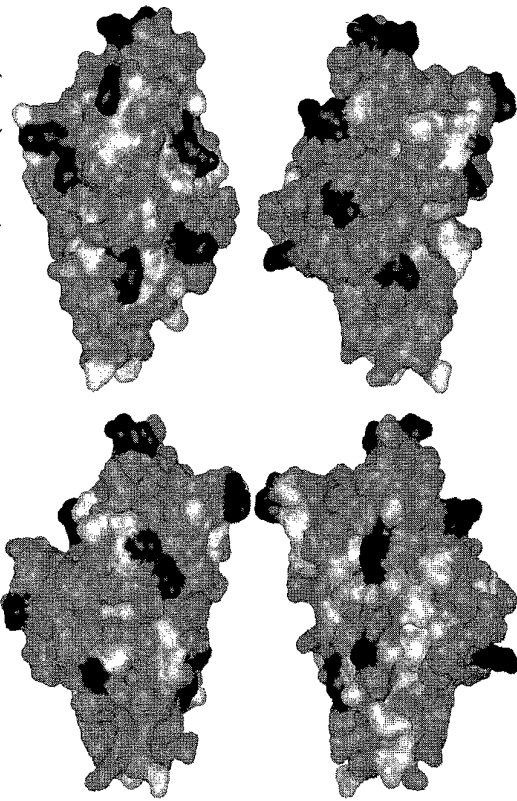
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

36/68

Figure 30 Point mutations at the Molecular surface, Bet v 1 (2733)



Grey: Back bone + Amino acid residues 95-100% conserved among *Fagales*,
Black: Point mutations: Y5V, N28T, K32Q, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K134E, R145E, D156H, +160N

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

f

37/68

Figure 31 Oligonucleotide primers for site-directed mutagenesis of Der p 2

K6A	sense	OB43	42-mer	<i>Xba</i> I	5'-CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCGCCGATTGTGCC-3'
	anti-sense	OB28	39-mer	<i>Xba</i> I	5'-CGTCTCTAGACTATTAAATCCGGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
K15E	sense	OB44	67-mer	<i>Xba</i> I	5'-CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCGAAAGATTGTGCC AACCATGAAATCAAAAGAGTTTGG-3'
	anti-sense	OB28	39-mer	<i>Xba</i> I	5'-CGTCTCTAGACTATTAAATCCGGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
H30N	sense	OB46	54-mer	<i>Kpn</i> I	5'-CGGGTACCCAGGATGTCATGGTTCAGAACCATGTATCATTA CCGTGGTAAACC-3'
	anti-sense	OB28	39-mer	<i>Xba</i> I	5'-CGTCTCTAGACTATTAAATCCGGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
E62S	sense	OB47	33-mer		5'-GCCCTCAATCGATGGTTTATCAGTTGATGTTCCC-3'
	anti-sense	OB48	33-mer		5'-GGGAACATCACTGATAAACCATCGATTGAGGC-3'
H74N	sense	OB49	32-mer	<i>Sph</i> I	5'-CATGGCATGCAATTACATGAAATGCCCATTTGG-3'
	anti-sense	OB28	39-mer	<i>Xba</i> I	5'-CGTCTCTAGACTATTAAATCCGGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'
K82N	sense	OB50	50-mer	<i>Sph</i> I	5'-CTACCGCATGCGATTACATGAAATGCCAATTGGTTAATGGACAA CAATATG-3'
	anti-sense	OB28	39-mer	<i>Xba</i> I	5'-CGTCTCTAGACTATTAAATCCGGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

	10	1	10	20	30
1DEP2AUG Derp2					
2DEP2JUNA Derp2					
3DEP2S0010 Derp2					
4DEP2S010 Derp2					
5DEP2S010 Derp2					
6DEP2S013 Derp2					
7DEP2S013 Derp2					
8148V Derp2					
9DE2JDEFA Der2					
10B21M Der2					
1114HK Der2					
124650 Der2					
1308630					
1408722					

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

39/68

Figure 32 (Der p 2) (cont.)

		40	50	60	70	80
1DERP2ALV6 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
2DERP2CMA Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
3DERP2BS0101 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
4DERP2BS0102 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
5DERP2BS0104 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
6DERP2BS0113 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
7DERP2BS0120 Derp 2		AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
8148V Derp 2	PDB	AGRPFOLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
9DERP2CERFA Derp 2	00355	AGRPFTLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
10BS1241 Derp 2	BS1241	AGRPFTLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
11144K Derp 2	PDB	AGRPFTLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
12146BN Derp 2	146BN	AGRPFTLEAVEEANTSTAXEIKASDGLLENDVP6DPRACHYMCPL				
13108430 ERM 2001 108430		AGRTAFLEAVEEANTSTAXEIKATDGLVE				
14130722 ERM 2002 130722		AGRTAFLEAVEEANTSTAXEIKATDGLVE				

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

41/68

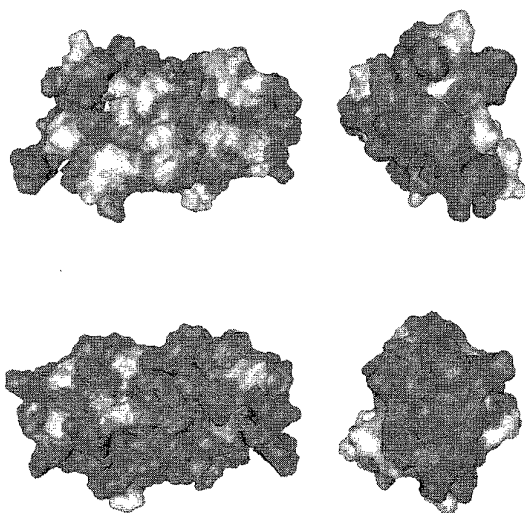


FIG. 33: Der p 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

42/68

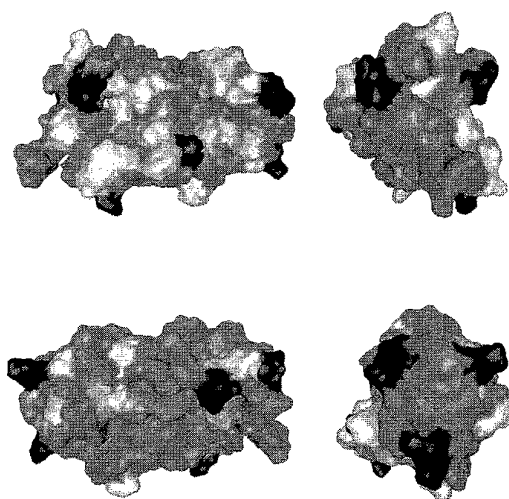


FIG. 34: Der p 2 mutant

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 35A (Der p 1)

Derp ALK		100	90	80	70	60	50
SP161230M4_00FF1	Derp1						
SP161230M4_00FF0	Erzm10001						
SP161230M4_00FF0	Erzm10001						
SP161230M4_00FF1	Erzm10002						
SP161230M4_00FF1	Derp1						
SP161230M4_00FF0	Erzm1						
SP161230M4_00FF0	Derp1						

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 35A (Der p 1) (cont.)

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

47/68

Figure 35B (Der p 1) (cont.)

	140	150	160	170	180	190
Der p 1	SPAVTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
SPB170MMA DEPT Der1	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
MSB6900690	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
MS7223723	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
MS7243724	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
SPB170MMA DEPT Der1	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
SP2300EIM EIDRA Eom1	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT
HA43052043020 Der1	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT	QRTTGGHQLDAPHHYGGRTT

Figure 35B (Der p 1) (cont.)

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

49/68

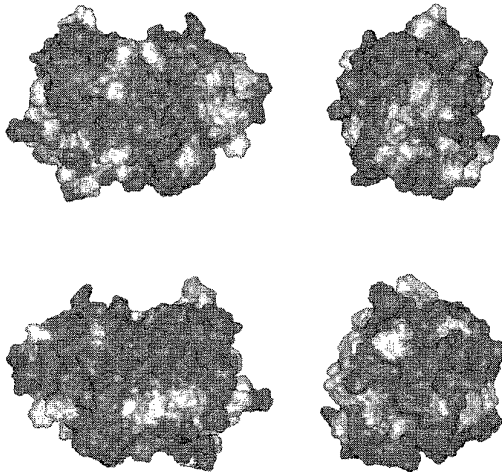


FIG. 36: Der p 1

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

50/68

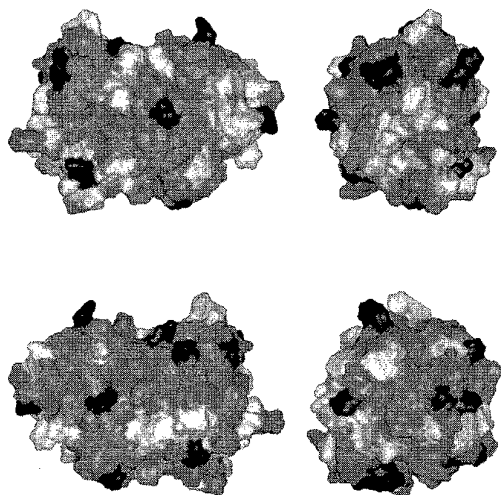


FIG. 37: Der p 1 mutant

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

52/68

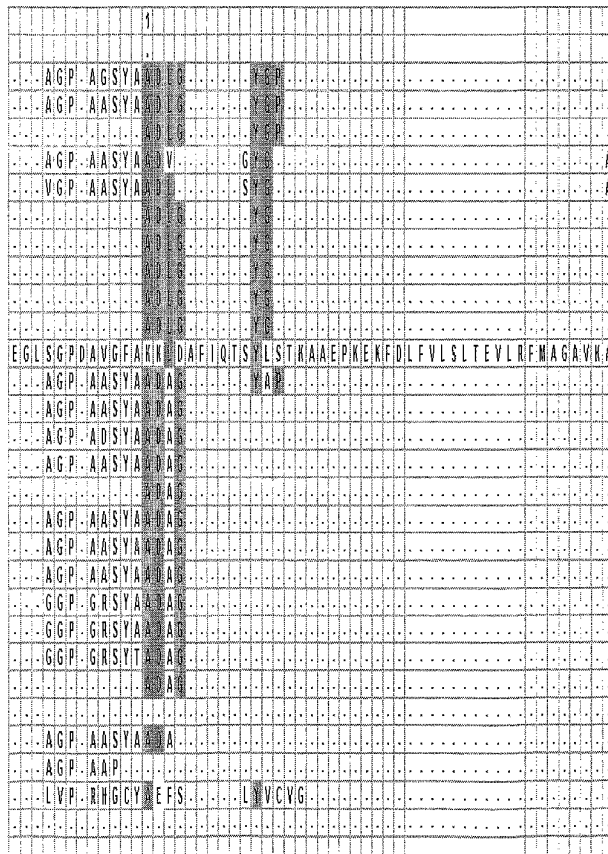
				10	20	30
W081341C081341	FM p5.0003			...T P A P A G Y T P A T P A A P A G		A P A G K A T
W040520C040520	FM p5			...T P A P A A G Y T P T P A P A E		A P A G K A T
sp040533MF5A PHLPR	FM p5A			...T P A P A A G Y T P T P A P A E		A D A G K A T
sp022839MF3 PHLPR	Pwp 5 (KG641)			P I A T L T P A P A A G Y P A A P A G		A . . P A
sp022839MF3 PHLPR	Pwp 5 (KG68)			P I . . . T P A P A A G Y P A A P A G		A . . P A
W065320C065319	Phil p5			...G P A T P A P A E		A P A G K A T
W065320C065320	Phil p5			...G P A T P A P A E		A P A G K A T
W065320C065321	Phil p5			...G P A T P A P A E		A P A G K A T
W065378C065318	Phil p5			...G P A T P A P A E		A P A G K A T
HP0657P06367	Phil p5			...G P A T P A P A E		A P A G K A T
sp022844MF31 PHLPR	Pwp 5 (KG331)			P P A S K F A K P P K V A A Y T P A P A G		A P . . K A T
W026279MF3 LCLPR	Lrlp 5B			...T A T P T A A P T A I P A T A T R A T P		A V P S G K A T
W026279MF3 LCLPR	Lrlp 5A			...Y T P A A A T P A T P A I A T P A I A G G K A T		A P A G K A T
W030530MF030530	Lrlp 6C			...Y T P A A A T P A T P A I A T P A I A G G K A T		A P A G K A T
W081343C081343	FM p5.0006			...Y A P A T P A A G		A P A G K A T
W0028720C2872	Htl 15			...Y T P A P A A G		A . . G G K A
W081344C081344	FM p5.0007			...Y A P A T P A A G		A P A G K A T
W04042250C4042250	Htl 15B			...Y A P T P A A G		A A . G G K A
W04042250C4042250	Pwp 5			...Y A P A T P A A G		A A . G G K A
W081344C081342	FM p5.0038			...Y A P A T P A A G		A P A G K A T
W030630P03063	FM p5			...Y A P A T P A A G		A P A G K A T
sp040533MF36 PHLPR	FM p5B			...Y A P A T P A A G		A A . G G K A
W030530C030530	Phk p5.0204			...Y A P A T P A A G		A P A G K A T
W002871C002871	FM p5.0102					
sp050636MF33 PH40	Pwp 5.53			...G Y P P T P A T P . . . A V I P G I A A G A A T		A P A G K A T
HH40	Phk 5.1			...T P T P T R T P P . . . L L P P P R A R D K A		A P A G K A T
W0040238C040238	Htr v9			...N I N A R F P V F N R T F I A N A G		A E
W002895C002895	Htr v5 (E040a)					

PCT/DK01/00764

53768

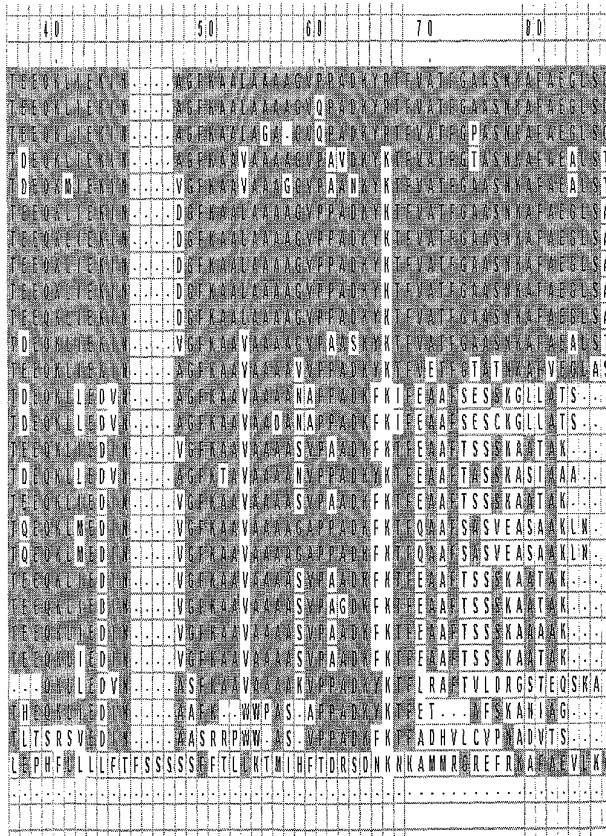
	90	100	110	120
HC01341 D01341	Phi p5.03G	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC04660 A0360	Phi p5	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp Q05521 MF5A_P4LPR	Phi p5A	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp P22328 MP92_PQAPR	Phi p5 (KEB41)	EPKGC..AAASSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp P22328 MP93_PQAPR	Phi p5 (KEB50)	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC05319 D05319	Phi p5	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC05319 D05320	Phi p5	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC05321 D05321	Phi p5	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC05319 D05316	Phi p5	EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HP05467 P3467		EPKGC..AAESSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp P22328 MP91_PQAPR	Phi p5 (KEB31)	EPKGC..AAVASKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp P22327 MP95_LDLPZ	Ldp p4B	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC02974 D02974	Ldp p5A	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC03309 D03309	Ldp p5C	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC03349 D03343	Phi p5.02G	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC02974 D02972	Hul15	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC01341 D01344	Phi p5.0207	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HP04302 P04302	Hul15B	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HP04422 P04422	Phi p5	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC01342 D01342	Phi p5.0203	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
MP05466 P05466	Phi p5	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp Q04830 MF5B_P4LPR	Phi p5B	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC05583 Q05583	Phi p5.024	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC02391 D02391	Phi p5.021	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
sp P22369 MP63_P4H40	Phi a5.3	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HA40	Phi a5.1	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC00824 D00828	Huv9	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		
HC03995 D03996	Huv5 (300d)	EPKGC..AAVDSKAAATSKLDAAAYKAYKTAEGNTPEA		

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



PCT/DK01/00764

55/68



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCT/DK01/00764

56/68

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

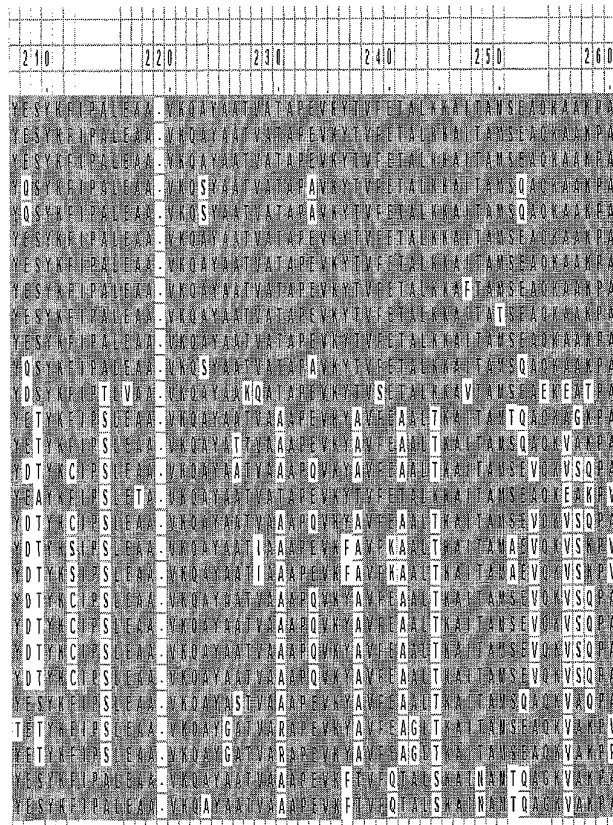
PCT/DK01/00764

57/68

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

58/68

[illegible]



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

61/68

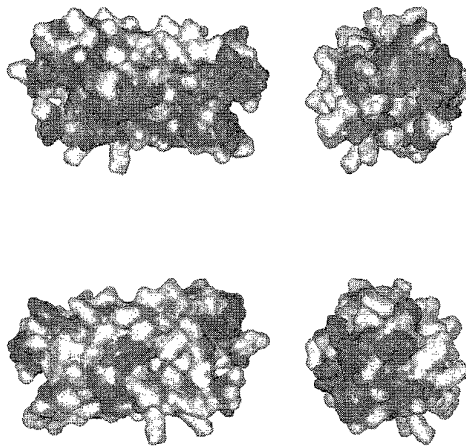


FIG. 39A: Phl p 5, Model A

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

62/68

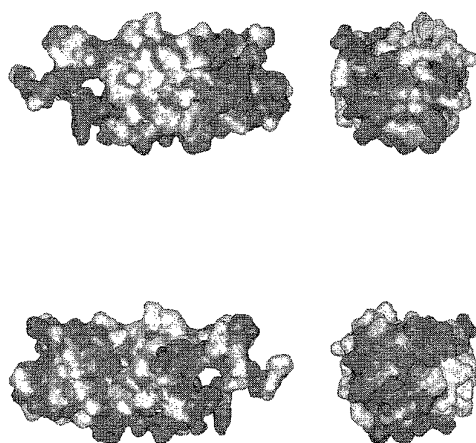


FIG. 39B: Phl p 5, Model B

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

63/68

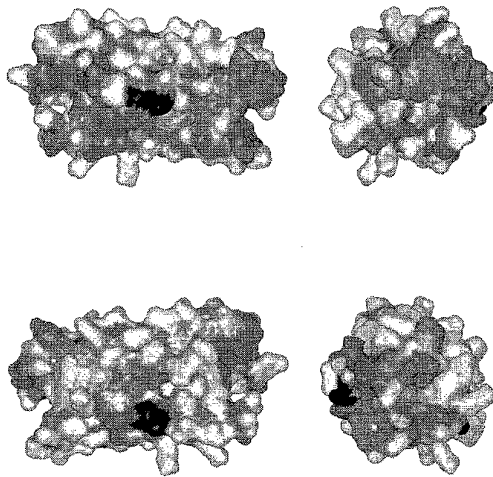


FIG. 40A: Phl p 5 mutant, Model A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

64/68

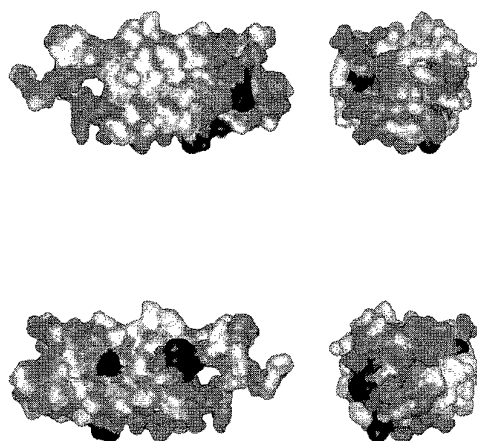


FIG. 40B: Phl p 5 mutant, Model B

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

65/68

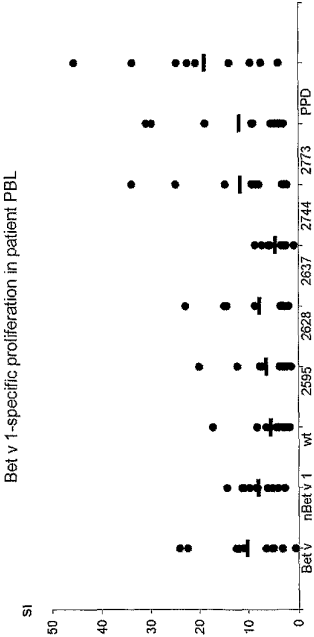
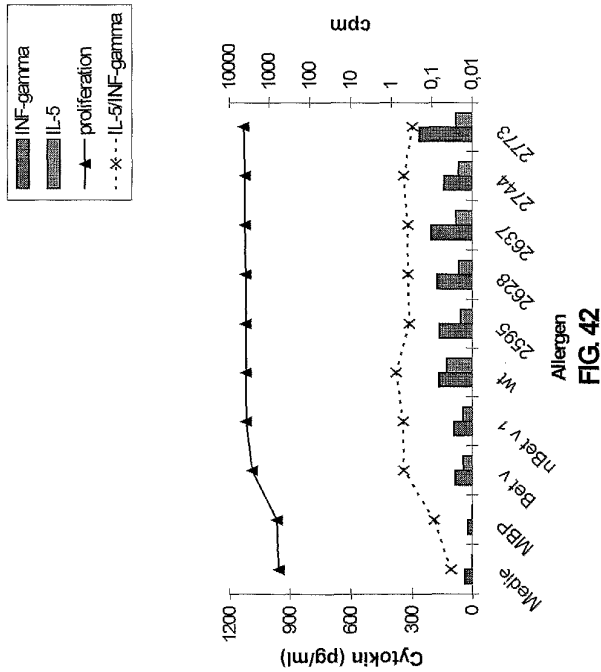


Figure 41: Stimulation of Bet v 1 samples

WO 02/40676

PCT/DK01/00764

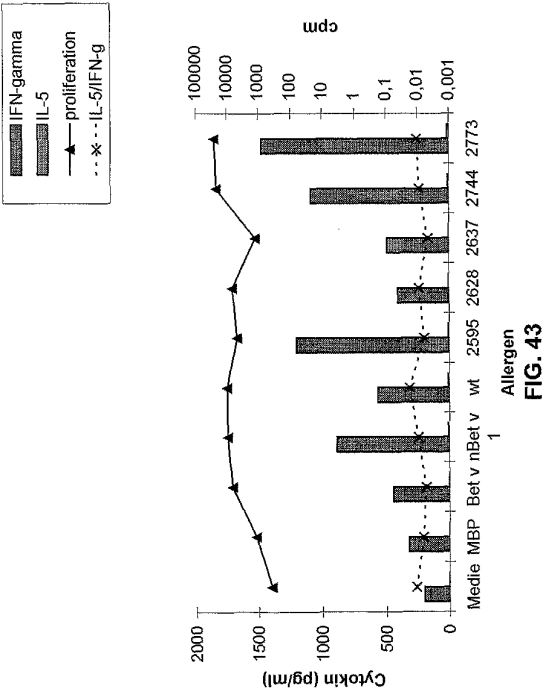
66/68



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

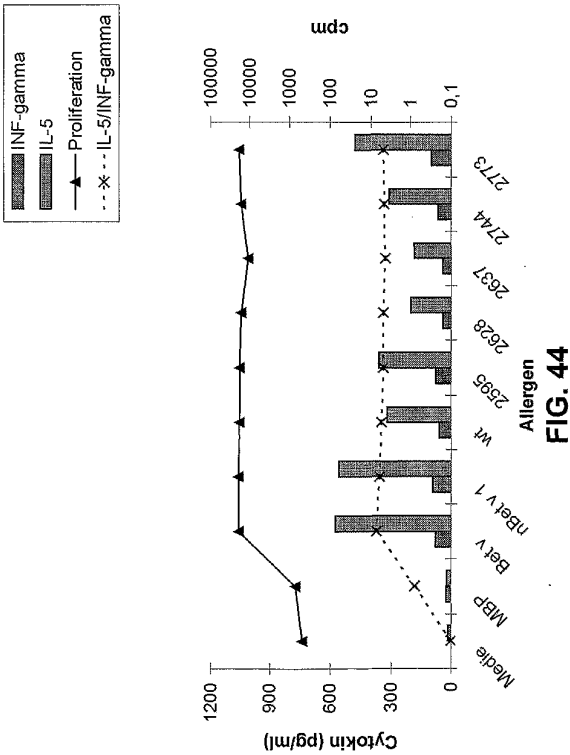
67/68



WO 02/40676

PCT/DK01/00764

68/68



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/040676 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/29,
15/12, C07K 14/415, 14/435, A61K 39/35, 39/36, C12N
5/10 // A61P 37/08(74) Agent: ZACCO DENMARK A/S; Hans Bekkevolds Allé
7, DK-2900 Hellerup (DK).

(21) International Application Number: PCT/DK01/00764

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (util-
ity model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (util-
ity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:
16 November 2001 (16.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2000 01718 16 November 2000 (16.11.2000) DK
60/249,361 16 November 2000 (16.11.2000) US
60/298,170 14 June 2001 (14.06.2001) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).Published:
with international search report(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOLM, Jens
[NO/NO]; Nøddehegnst 30, DK-3480 Fredensborg (NO).
IPSEN, Henrik [DK/DK]; Ligevej 16, DK-3400 Hillerød
(DK). NEDERGAARD LARSEN, Jørgen [DK/DK];
Nyvej 11, DK-3230 Græsted (DK). SPANGFORT,
Michael, Dho [DK/SE]; Döshultsvägen 483, S-260 40
Viken (SE).(88) Date of publication of the international search report:
9 October 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/040676 A3

(54) Title: MUTANT ALLERGENS

(57) Abstract: Novel recombinant allergens with multiple mutations and reduced IgE binding affinity are disclosed. The allergens are non-naturally occurring mutants of naturally-occurring allergens. The overall α -carbon backbone tertiary structure is essentially preserved. Also disclosed is a method for preparing such recombinant allergens as well as uses thereof.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/DK 01/00764
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/29 C12N15/12 C07K14/415 C07K14/435 A61K39/35 A61K39/36 C12N5/10 //A61P37/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 47680 A (IPSEN HANS HENRIK ;LARSEN JOERGEN NEDERGAARD (DK); ALK ABELLO A S) 23 September 1999 (1999-09-23) cited in the application	1, 2, 4-14, 16, 18-36, 41-47, 55-59, 61-64
Y	the whole document	1-22, 30-36, 55-59, 65
	---	--- --
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 March 2003		Date of mailing of the international search report 21/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet Application No PCT/DK 01/00764
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIRZA O ET AL: "Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 JUL 2000 (2000-07-01), vol. 165, no. 1, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 331-338, XP002233501 ISSN: 0022-1767 the whole document ---	1-22, 55-58,65
Y	KING TE PIAO ET AL: "Structure and biology of stinging insect venom allergens." INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 123, no. 2, October 2000 (2000-10), pages 99-106, XP008014036 ISSN: 1018-2438 the whole document ---	1-16, 30-36,59
Y	PUNNONEN J: "MOLECULAR BREEDING OF ALLERGY VACCINES AND ANTIALLERGIC CYTOKINES" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 121, no. 3, 2000, pages 173-182, XP000979180 ISSN: 1018-2438 cited in the application the whole document ---	17
A	SPANGFORT MICHAEL D ET AL: "The potential use of recombinant allergens for immunotherapy." JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 105, no. 1 part 2, January 2000 (2000-01), page S169 XP002233502 Abstract 514 ISSN: 0091-6749 abstract & 56th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.; San Diego, California, USA; March 03-08, 2000 --- -/--	1-65

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet Application No PCT/DK 01/00764
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LARSEN JORGEN NEDERGAARD ET AL: "Toward a unifying theory for the mechanism of Specific Allergy Vaccination." JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 105, no. 1 part 2, January 2000 (2000-01), page S311 XP002233503 Abstract 915 ISSN: 0091-6749 the whole document & 56th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, San Diego, California, USA; March 03-08, 2000 ---	1-65
A	SCHWEIMER K ET AL: "NMR spectroscopy reveals common structural features of the birch pollen allergen Bet v 1 and the cherry allergen Pru a 1" APPLIED MAGNETIC RESONANCE, (JUL 1999) VOL. 17, NO. 2-3, PP. 449-464., XP001010259 the whole document ---	1-3, 48-54
A	FERREIRA F ET AL: "Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy" FASEB JOURNAL, vol. 12, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 231-242, XP002085249 ISSN: 0892-6638 cited in the application the whole document ---	1-22
A	SMITH A M AND CHAPMAN M D: "Localization of antigenic sites on Der p 2 using oligonucleotide-directed mutagenesis targeted to predicted surface residues" CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 27, no. 5, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 593-599, XP002085251 ISSN: 0954-7894 the whole document ---	60
A	SPANGFORT M D ET AL: "Three-dimensional structure and epitopes of Bet v 1" INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 113, no. 1/03, 1997, pages 243-245, XP002085253 ISSN: 1018-2438 --- -/-	

Form PCT/ISAQ210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet Application No PCT/DK 01/00764
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 43657 A (MERCK PATENT GMBH ;MUJELLER WOLF DIETER (DE); BUFE ALBRECHT (DE); F) 8 October 1998 (1998-10-08)	
A	WO 99 38978 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ;UNIV ARKANSAS (US); SOSIN HOWARD (US)) 5 August 1999 (1999-08-05)	
A	SINGH MOHAN B ET AL: "Genetically engineered plant allergens with reduced anaphylactic activity." INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol. 119, no. 2, June 1999 (1999-06), pages 75-85, XP001010229 ISSN: 1018-2438	
T	HENRIKSEN ANETTE ET AL: "Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily." PROTEINS, vol. 45, no. 4, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 438-448, XP008014513 ISSN: 0887-3585	

Form PCT/ISA610 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	Inter. inv. application No. PCT/DK 01/00764
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 43, 44 and 47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. ☒ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/JP 01 00764

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim 55 (and dependent claims 56-64) relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCI and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCI is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds specifically described in the examples.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internet application No
PCT/DK 01/00764

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9947680	A	23-09-1999	AU 749749 B2
			04-07-2002
			AU 2714799 A
			11-10-1999
			CA 2323687 A1
			23-09-1999
			CN 1293710 T
			02-05-2001
			WO 9947680 A1
			23-09-1999
			EP 1062341 A1
			27-12-2000
			HU 0101464 A2
			28-08-2001
			JP 2002506648 T
			05-03-2002
			NO 20004614 A
			26-10-2000
			PL 343029 A1
			30-07-2001
WO 9843657	A	08-10-1998	DE 19713001 A1
			01-10-1998
			WO 9843657 A2
			08-10-1998
			EP 1009419 A2
			21-06-2000
			HU 0001552 A2
			28-09-2000
			JP 2002511842 T
			16-04-2002
			PL 335981 A1
			05-06-2000
WO 9938978	A	05-08-1999	AU 743647 B2
			31-01-2002
			AU 2350599 A
			16-08-1999
			CA 2319437 A1
			05-08-1999
			EP 1051494 A1
			15-11-2000
			JP 2002501748 T
			22-01-2002
			WO 9938978 A1
			05-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	Z T D
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	Q
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

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

(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ホルム イェンス
デンマーク デーコー 3 4 8 0 フレーデンスボルク ネーデーグネット 3 0

(72)発明者 イプセン ヘンリック
デンマーク デーコー 3 4 0 0 ヒレレード エーゲヴェイ 1 6

(72)発明者 ネーデルガールド ラルセン イェルゲン
デンマーク デーコー 3 2 3 0 グレーステッド ニヴェイ 1 1

(72)発明者 スパングホルト ミハエル ドー
スウェーデン エス 2 6 0 4 0 ヴィケン デスールツヴェーゲン 4 8 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA31 BA38 BA80 CA04 CA20 DA06 DA12
EA04 GA25 HA01 HA03 HA20
4B064 AG01 AG30 AG31 CA02 CA06 CA19 CC01 CC24 CE06 CE11
CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA58X AA77X AA87X AA88Y AA90Y AB01 AC14 BA02 BA16
BA24 BB06 BB12 BB20 BB29 BC03 BC26 BD14 CA24 CA43
CA44 CA45 CA46
4C085 AA03 BB03 BB04 CC03 DD01 DD62 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA30 CA51 DA83 DA86
EA22 EA50 FA74 GA10 GA23 GA26