

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816284.9

C12N 9/00

C07K 16/42

C12N 15/12

C07K 16/28

C07K 16/00

A61K 39/35

A61K 39/36

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668737A

[22] 申请日 2003.5.15 [21] 申请号 03816284.9

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 16 [33] DK [31] PA200200756

[32] 2002. 5. 16 [33] US [31] 60/381,440

[86] 国际申请 PCT/DK2003/000322 2003. 5. 15

[87] 国际公布 WO2003/096869 英 2003. 11. 27

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 10

[71] 申请人 阿尔克-阿贝洛有限公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

[72] 发明人 J·霍尔姆 M·弗雷拉斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 唐伟杰

G01N 33/53A61P 37/08

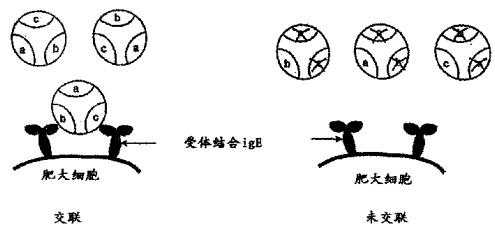
权利要求书 16 页 说明书 74 页 附图 37 页

[54] 发明名称 重组 Bet. V. 1 过敏原突变体及其方法和制备

[57] 摘要

本发明公开了带有多个突变且 IgE 结合亲和力被降低了的新型重组过敏原。该过敏原是来自于天然过敏原的突变体。其基本上保留了总体 α-碳骨架的三级结构。还公开了制备该重组过敏原的方法及其用途。

定点突变在具有3个表位的主要IgE表位模型中的作用



ISSN 1008-4274

1. 重组 Bet v 1 过敏原，其特征在于它是天然 Bet v 1 过敏原的突变体，其中：

a. 该突变体保持与所述天然过敏原基本相同的  $\alpha$ -碳骨架结构，

b. 该突变含有至少 4 个一级突变，与天然 Bet v 1 过敏原的 IgE 结合能力相比，每种突变都能够将突变过敏原的 IgE 特异性结合能力降低，

c. 每种一级突变都是一种表面暴露的氨基酸残基被另一种所取代，

d. 所述突变位点的放置方式使得：在至少一个  $400-800\text{\AA}^2$  的面积内不含有突变或仅含有一个或多个温和突变，

e. 所述一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组，每组均含有适于氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点：

组 1: A130, E131, K134, A135, K137, E138, E141, T142, R145;

组 2: V2, F3, N4, Y5, E6, T7, K119 ;

组 3: D27, S39, S40, Y41, E42, N43, I44, E45, G46, N47, P50, G51, K55, D72, E73;

组 4: E8, T10, V12, P14, V105, A106, T107, P108, D109, G110, I113, K115 ;

组 5: A16, K20, S149, Y150, L152, A153, H154, S155, D156, Y158, N159, +160, 其中+160 代表 N-末端氨基酸的增加;

组 6: L24, D25, N28, K32;

组 7: H76, T77, N78, F79, K80, E101, K103 ;

组 8: K68, R70, I86, E87, E96, K97;

组 9: G1, G92, D93, T94, K123, G124, D125, H126, E127, K129;

组 10: P35, Q36, E60, G61, P63, F64, K65, Y66;

其前提条件是：重组 Bet v 1 过敏原不是下述特定突变体：  
(Asn28Thr, Lys32Gln, Asn78Lys, Lys103Val, Arg145Glu, Asp156His,

+160Asn); (Tyr5Val, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, Lys123Ile, Lys134Glu, Asp156His) ; (Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu) ; (Ala16Pro, Asn28Thr, Lys32Gln, Lys103Thr, Pro108Gly, Leu152Lys, Ala153Gly, Ser55Pro) ; (N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H, +160N); (Tyr5Val, Lys134Glu, Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Lys65Asn, Asn78Lys, Lys103Val, Lys97Ser, Pro108Gly, Arg145Glu, Asp156His, +160Asn) ; (Tyr5Val, Lys134Glu, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, Lys123Ile, Asp156His, +160Asn) ; (Asn28Thr, Lys32Gln, Lys65Asn, Glu96Leu, Lys97Ser, Pro108Gly, Asp109Asn, Asp125Tyr, Glu127Ser, Arg145Glu) ; (Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N); (Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, K123I, K134E, D156H, +160N); 和 (Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N)。

2. 权利要求1的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述10组中的至少4组, 每组均含有适于氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

- 组 1: A130, K134, A135, K137, E138, E141, T142, R145 ;
- 组 2 : V2, F3, N4, Y5, E6, T7, K119 ;
- 组 3: D27, Y41, E42, N43, I44, E45, G46, N47, P50, G51, K55, D72, E73;
- 组 4 : E8, T10, P108, D109, I113, K115;
- 组 5: H154, S155, D156, N159, +160;
- 组 6: D25, N28, K32;
- 组 7: H76, T77, N78, K80, E101, K103;
- 组 8: K68, R70, I86, E87, E96, K97;
- 组 9: G1, G92, T94, K123, G124, D125, H126 ;
- 组 10: K65, Y66。

3. 权利要求 1 或 2 的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

- 组 1: A130, K134, A135, K137, E138, E141, T142;
- 组 2: V2, F3, N4, Y5, E6, T7, K119 ;
- 组 3: D27, Y41, N43, I44, E45, G46, N47, P50, G51, K55, D72, E73;
- 组 4: E8, P108, I113, K115 ;
- 组 5: H154, S155, N159, +160;
- 组 6: D25, N28;
- 组 7: H76, N78, K80, E101, K103;
- 组 8: K68, R70, I86, E87, E96, K97;
- 组 9 : G1, G92, T94, G124, D125, H126;
- 组 10: Y66。

4. 权利要求 1-3 任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

- 组 1: A130, A135, K137, E138, E141, T142 ;
- 组 2: F3, N4, E6, T7, K119 ;
- 组 3: D27, Y41, N43, I44, G46, P50, G51, D72, E73;
- 组 4 : E8, I113, K115 ;
- 组 5: H154, S155, N159;
- 组 7: H76, N78, K80, E101;
- 组 8: K68, R70, I86, E87;
- 组 9: G1, G92, D93, G124, H126 ;
- 组 10: Y66。

5. 权利要求 1 的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于下列特定氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

组 1: A130 : A130V, A130G, A130I, A130L, A130S, A130H, A130T ; E131 : E131D, E131H, E131K, E131R, E131S ; K134 : K134R, K134H, K134S, K134Q, K134I, K134E ; A135 : A135V, A135G, A135I, A135L, A135S, A135H, A135T; K137: K137R, K137H, K137S, K137Q, K137I, K137E ; E138: E138D, E138H, E138K, E138R, E138S, E138N; E141: E141D, E141H, E141K, E141R, E141S ; T142: T142A, T142S, T142L, T142V, T142D, T142K, T142N; R145: R145K, R145H, R145T, R145D, R145E;

组 2: V2: V2A, V2I, V2K, V2L, V2R, V2T; F3 : F3H, F3W, F3S, F3D ; N4 : N4H, N4K, N4M, N4Q, N4R; Y5: Y5D, Y5G, Y5H, Y5I, Y5K, Y5V; E6: E6D, E6H, E6K, E6R, E6S; T7: T7P, T7S, T7L, T7V, T7D, T7K, T7N; K119 : K119R, K119H, K119S, K119Q, K119I, K119E, K119N ;

组 3: D27: D27E, D27H, D27K, D27R, D27S; S39: S39T, S39L, S39V, S39D, S39K; S40: S40T, S40L, S40V, S40D, S40K; Y41: Y41 D, Y41G, Y41H, Y41I, Y41K, Y41V ; E42: E42S, E42D, E42H, E42K, E42R; N43: N43H, N43K, N43M, N43Q, N43R ; I44 : I44L, I44K, I44R, I44D ; E45: E45S, E45D, E45H, E45K, E45R; G46: G46N, G46H, G46K, G46M, G46Q, G46R; N47: N47H, N47K, N47M, N47Q, N47R; P50: P50G; G51: G51 N, G51 H, G51K, G51M, G51Q, G51R ; K55 : K55R, K55H, K55S, K55Q, K55I, K55E, K55N; D72: D72E, D72S, D72H, D72R, D72K; E73: E73D, E73S, E73H, E73R, E73K;

组 4: E8: E8D, E8H, E8K, E8R, E8S; T10: T10P, T10S, T10L, T10V, T10D, T10K, T10N ; V12: V12A, V12I, V12K, V12L, V12R, V12T; P14: P14G; V105: V105A, V105I, V105K, V105L, V105R, V105T; A106: A106V, A106G, A106I, A106L, A106S, A106H, A106T; T107 : T107A, T107S, T107L, T107V,

T107D, T107K, T107N; P108: P108G ; D109: D109N D109E,  
D109S, D109H, D109R, D109K; G110: G110N, G110H, G110K,  
G110M, G110Q, G110R ; I113 : I113L, I113K, I113R, I113D,  
K115 : K115R, K115H, K115S, K115Q, K115I, K115E, K115N ;

组 5: A16: A16V, A16G, A16I, A16L, A16S, A16H, A16T;  
K20: K20R, K20H, K20S, K20Q, K20I, K20E, K20N; S149:  
S149T, S149L, S149V, S149D, S149K ; Y150 : Y150T, Y150L,  
Y150V, Y150D, Y150K; L152: L152A, L152V, L152G, L152I,  
L152S, L152H, L152T; A153: A153V, A153G, A153I, A153L,  
A153S, A153H, A153T; H154: H154W, H154F, H154S, H154D;  
S155: S155T, S155L, S155V, S155D, S155K; D156: D156H,  
D156E, D156S, D156R, D156K; Y158: Y158D, Y158G, Y158H,  
Y158I, Y158K, Y158V; N159: N159H, N159K, N159M, N159Q,  
N159R, N159G, +160N ;

组 6: L24: L24A, L24V, L24G, L24I, L24S, L24H, L24T;  
D25: D25E, D25H, D25K, D25R, D25S; N28: N28H, N28K,  
N28M, N28Q, N28R, N28T; K32: K32Q, K32R, K32N, K32H,  
K32S, K32I, K32E;

组 7: H76: H76W, H76F, H76S, H76D; T77: T77A, T77S,  
T77L, T77V, T77D, T77K, T77N; N78: N78H, N78K, N78M,  
N78Q, N78R; F79: F79H, F79W, F79S, F79D; K80 : K80R,  
K80H, K80S, K80Q, K80I, K80E, K80N; E101: E101D, E101H,  
E101K, E101R, E101S ; K103: K103R, K103H, K103S, K103Q,  
K103I, K103E, K103V;

组 8: K68: K68R, K68H, K68S, K68Q, K68I, K68E, K68N ;  
R70: R70K, R70H, R70T, R70D, R70E, R70N ; I86: I86L,  
I86K, I86R, I86D ; E87: E87D, E87H, E87K, E87R, E87S,  
E87A; E96: E96D, E96H, E96K, E96R, E96S, E96L; K97 :  
K97R, K97H, K97S, K97Q, K97I, K97E;

组 9: G1 : G1N, G1H, G1K, G1M, G1Q, G1R ; G92: G92N, G92H, G92K, G92M, G92Q, G92R; D93: D93N, D93E, D93S, D93H, D93R, D93K ; T94: T94A, T94S, T94L, T94V, T94D, T94K, T94N; K123 : K123R, K123H, K123S, K123Q, K123I, K123E; G124: G124N, G124H, G124K, G124M, G124Q, G124R; D125: D125E, D125H, D125K, D125R, D125S, D125Y; H126: H126W, H126F, H126S, H126D; E127: E127D, E127H, E127K, E127R, E127S; K129: K129R, K129H, K129S, K129Q, K129I, K129E, K129N;

组 10: P35: P35G; Q36: Q36K, Q36R, Q36N, Q36H, Q36S, Q36I, Q36E; E60: E60H, E60K, E60M, E60Q, E60R; G61: G61N, G61H, G61K, G61M, G61Q, G61R ; P63: P63G; F64: F64H, F64W, F64S, F64D; K65: K65R, K65H, K65S, K65Q, K65I, K65E, K65N; Y66: Y66D, Y66G, Y66H, Y66I, Y66K, Y66V.

6. 权利要求 1 或 2 的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于下列特定氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

组 1: A130: A130V, A130G, A130I, A130L, A130S, A130H, A130T; K134: K134R, K134H, K134S, K134Q, K134I, K134E; A135: A135V, A135G, A135I, A135L, A135S, A135H, A135T; K137: K137R, K137H, K137S, K137Q, K137I, K137E; E138: E138D, E138H, E138K, E138R, E138S, E138N; E141: E141D, E141H, E141K, E141R, E141S; T142: T142A, T142S, T142L, T142V, T142D, T142K, T142N; R145: R145K, R145H, R145T, R145D, R145E;

组 2: V2: V2A, V2I, V2K, V2L, V2R, V2T; F3: F3H, F3W, F3S, F3D; N4: N4H, N4K, N4M, N4Q, N4R; Y5: Y5D, Y5G, Y5H, Y5I, Y5K, Y5V; E6: E6D, E6H, E6K, E6R, E6S; T7: T7P, T7S, T7L, T7V, T7D, T7K, T7N; K119: K119R, K119H, K119S, K119Q, K119I, K119E, K119N;

组 3: D27: D27E, D27H, D27K, D27R, D27S; Y41: Y41D, Y41G, Y41H, Y41I, Y41K, Y41V; E42: E42S, E42D, E42H, E42K, E42R; N43: N43H, N43K, N43M, N43Q, N43R; I44: I44L, I44K, I44R, I44D; E45: E45S, E45D, E45H, E45K, E45R; G46: G46N, G46H, G46K, G46M, G46Q, G46R; N47: N47H, N47K, N47M, N47Q, N47R; P50: P50G; G51: G51N, G51H, G51K, G51M, G51Q, G51R; K55: K55R, K55H, K55S, K55Q, K55I, K55E, K55N; D72: D72E, D72S, D72H, D72R, D72K; E73: E73D, E73S, E73H, E73R, E73K;

组 4: E8: E8D, E8H, E8K, E8R, E8S; T10: T10P, T10S, T10L, T10V, T10D, T10K, T10N; P108: P108G; D109: D109ND109E, D109S, D109H, D109R, D109K; I113: I113L, I113K, I113R, I113D, K115: K115R, K115H, K115S, K115Q, K115I, K115E, K115N;

组 5: H154: H154W, H154F, H154S, H154D; S155: S155T, S155L, S155V, S155D, S155K; D156: D156H, D156E, D156S, D156R, D156K; N159: N159H, N159K, N159M, N159Q, N159R, N159G, +160N;

组 6: D25: D25E, D25H, D25K, D25R, D25S; N28: N28H, N28K, N28M, N28Q, N28R, N28T; K32: K32Q, K32R, K32N, K32H, K32S, K32I, K32E;

组 7: H76: H76W, H76F, H76S, H76D; T77: T77A, T77S, T77L, T77V, T77D, T77K, T77N; N78: N78H, N78K, N78M, N78Q, N78R; K80: K80R, K80H, K80S, K80Q, K80I, K80E, K80N; E101: E101D, E101H, E101K, E101R, E101S; K103: K103R, K103H, K103S, K103Q, K103I, K103E, K103V;

组 8: K68: K68R, K68H, K68S, K68Q, K68I, K68E, K68N; R70: R70K, R70H, R70T, R70D, R70E, R70N; I86: I86L, I86K, I86R, I86D; E87: E87D, E87H, E87K, E87R, E87S, E87A; E96: E96D, E96H, E96K, E96R, E96S, E96L; K97: K97R, K97H, K97S, K97Q, K97I, K97E;

组 9: G1: G1N, G1H, G1K, G1M, G1Q, G1R; G92: G92N, G92H,

G92K, G92M, G92Q, G92R; T94: T94A, T94S, T94L, T94V, T94D, T94K, T94N; K123: K123R, K123H, K123S, K123Q, K123I, K123E; G124: G124N, G124H, G124K, G124M, G124Q, G124R; D125: D125E, D125H, D125K, D125R, D125S, D125Y; H126: H126W, H126F, H126S, H126D;

组 10: K65: K65R, K65H, K65S, K65Q, K65I, K65E, K65N; Y66: Y66D, Y66G, Y66H, Y66I, Y66K, Y66V.

7. 权利要求 1-3 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于下列特定氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

组 1: A130: A130V, A130G, A130I, A130L, A130S, A130H, A130T; K134: K134R, K134H, K134S, K134Q, K134I, K134E; A135: A135V, A135G, A135I, A135L, A135S, A135H, A135T; K137: K137R, K137H, K137S, K137Q, K137I, K137E; E138: E138D, E138H, E138K, E138R, E138S, E138N; E141: E141D, E141H, E141K, E141R, E141S; T142: T142A, T142S, T142L, T142V, T142D, T142K, T142N;

组 2: V2: V2A, V2I, V2K, V2L, V2R, V2T; F3: F3H, F3W, F3S, F3D; N4: N4H, N4K, N4M, N4Q, N4R; Y5: Y5D, Y5G, Y5H, Y5I, Y5K, Y5V; E6: E6D, E6H, E6K, E6R, E6S; T7: T7P, T7S, T7L, T7V, T7D, T7K, T7N; K119: K119R, K119H, K119S, K119Q, K119I, K119E, K119N;

组 3: D27: D27E, D27H, D27K, D27R, D27S; Y41: Y41D, Y41G, Y41H, Y41I, Y41K, Y41V; N43: N43H, N43K, N43M, N43Q, N43R; I44: I44L, I44K, I44R, I44D; E45: E45S, E45D, E45H, E45K, E45R; G46: G46N, G46H, G46K, G46M, G46Q, G46R; N47: N47H, N47K, N47M, N47Q, N47R; P50: P50G; G51: G51N, G51H, G51K, G51M, G51Q, G51R; K55: K55R, K55H, K55S, K55Q, K55I, K55E, K55N; D72: D72E, D72S, D72H, D72R, D72K; E73: E73D, E73S, E73H, E73R, E73K;

组 4: E8: E8D, E8H, E8K, E8R, E8S; P108: P108G; I113: I113L, I113K, I113R, I113D, K115: K115R, K115H, K115S, K115Q, K115I,

K115E, K115N;

组 5: H154: H154W, H154F, H154S, H154D; S155: S155T, S155L, S155V, S155D, S155K; N159: N159H, N159K, N159M, N159Q, N159R, N159G, +160N;

组 6: D25: D25E, D25H, D25K, D25R, D25S; N28: N28H, N28K, N28M, N28Q, N28R, N28T;

组 7: H76: H76W, H76F, H76S, H76D; N78: N78H, N78K, N78M, N78Q, N78R; K80: K80R, K80H, K80S, K80Q, K80I, K80E, K80N; E101: E101D, E101H, E101K, E101R, E101S; K103: K103R, K103H, K103S, K103Q, K103I, K103E, K103V;

组 8: K68: K68R, K68H, K68S, K68Q, K68I, K68E, K68N; R70: R70K, R70H, R70T, R70D, R70E, R70N; I86: I86L, I86K, I86R, I86D; E87: E87D, E87H, E87K, E87R, E87S, E87A; E96: E96D, E96H, E96K, E96R, E96S, E96L; K97: K97R, K97H, K97S, K97Q, K97I, K97E;

组 9: G1: G1N, G1H, G1K, G1M, G1Q, G1R; G92: G92N, G92H, G92K, G92M, G92Q, G92R; T94: T94A, T94S, T94L, T94V, T94D, T94K, T94N; G124: G124N, G124H, G124K, G124M, G124Q, G124R; D125: D125E, D125H, D125K, D125R, D125S, D125Y; H126: H126W, H126F, H126S, H126D;

组 10: Y66: Y66D, Y66G, Y66H, Y66I, Y66K, Y66V.

8. 权利要求 1-4 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于下列特定氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点:

组 1: A130: A130V, A130G, A130I, A130L, A130S, A130H, A130T; A135: A135V, A135G, A135I, A135L, A135S, A135H, A135T; K137: K137R, K137H, K137S, K137Q, K137I, K137E; E138: E138D, E138H, E138K, E138R, E138S, E138N; E141: E141D, E141H, E141K, E141R, E141S; T142: T142A, T142S, T142L, T142V, T142D, T142K, T142N;

组 2: F3: F3H, F3W, F3S, F3D; N4: N4H, N4K, N4M, N4Q, N4R; E6: E6D, E6H, E6K, E6R, E6S; T7: T7P, T7S, T7L, T7V, T7D, T7K, T7N; K119: K119R, K119H, K119S, K119Q, K119I, K119E, K119N;

组 3: D27: D27E, D27H, D27K, D27R, D27S; Y41: Y41D, Y41G, Y41H, Y41I, Y41K, Y41V; N43: N43H, N43K, N43M, N43Q, N43R; I44: I44L, I44K, I44R, I44D; G46: G46N, G46H, G46K, G46M, G46Q, G46R; N47: N47H, N47K, N47M, N47Q, N47R; P50: P50G; G51: G51N, G51H, G51K, G51M, G51Q, G51R; D72: D72E, D72S, D72H, D72R, D72K; E73: E73D, E73S, E73H, E73R, E73K;

组 4: E8: E8D, E8H, E8K, E8R, E8S; I113: I113L, I113K, I113R, I113D, K115: K115R, K115H, K115S, K115Q, K115I, K115E, K115N;

组 5: H154: H154W, H154F, H154S, H154D; S155: S155T, S155L, S155V, S155D, S155K; N159: N159H, N159K, N159M, N159Q, N159R, N159G, +160N;

组 7: H76: H76W, H76F, H76S, H76D; N78: N78H, N78K, N78M, N78Q, N78R; K80: K80R, K80H, K80S, K80Q, K80I, K80E, K80N; E101: E101D, E101H, E101K, E101R, E101S;

组 8: K68: K68R, K68H, K68S, K68Q, K68I, K68E, K68N; R70: R70K, R70H, R70T, R70D, R70E, R70N; 186: 186L, 186K, 186R, 186D; E87: E87D, E87H, E87K, E87R, E87S, E87A;

组 9: G1: G1N, G1H, G1K, G1M, G1Q, G1R; G92: G92N, G92H, G92K, G92M, G92Q, G92R; D93: D93N, D93E, D93S, D93H, D93R, D93K; G124: G124N, G124H, G124K, G124M, G124Q, G124R; H126: H126W, H126F, H126S, H126D;

组 10: Y66: Y66D, Y66G, Y66H, Y66I, Y66K, Y66V.

9. 权利要求 1 的重组 Bet v 1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N.

10. 权利要求 9 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: E8/K115, D125/H126,

E138/K137/E141 , D25/N28 , E87/K55 , S155/H154/N159 , N47/P50/H76/N43/I44/R70 , E87/K55 , E73/P50/D72 , A130 , N28/D25, P108, V2/K119/N4/E6/E96。

11. 权利要求 9 或 10 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: T10P, K65N, N28/D25/K32Q/E141/K137/E138, D125/K123I/H126, P108/D109N, E42S/K55/I44/N43, E73/D72, E87, E96/K119, A130, V2/E6, E8/K115, N47/P50/R70/H76/T77A, S155/D156H/N159, E6/V2。

12. 权利要求 1 的重组 Bet v 1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N。

13. 权利要求 12 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: E8/K115, D125/H126, E138/K137/E141 , E87/K55 , S155/H154/N159 。 N47/P50/H76/N43/I44/R70, K55, E73/P50/D72, A130, D25, P108, V2/K119/N4/E6/E96。

14. 权利要求 12 或 13 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: T10P, K65N, E141/K137/E138, D125/K123I/H126, P108/D109N, E42S/K55/I44/N43, E73/D72, E87, V2/E6, N47/P50/R70/H76/T77A。 E96/K119, A130, E8/K115, S155/D156H/H154/N159, E6/V2。

15. 权利要求 1 的重组 Betv1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, E87S, K97S, K103V, K134E, N159G, +160N。

16. 权利要求 15 的重组过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K55, A138/K137/E141, D125/H126, P108, V2/N4/K119/E6, S155/H154, N47/P50/H76, E73, R70, A130, E8/K115, E96。

17. 权利要求 15 或 16 的重组过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K65N, T10P, D125, K123I, P108, D109N, N47/P50/H76, E138/K137/E141, E42S/K55/I44/N43,

S155/D156H, E73/D72, E6/V2, E96。

18. 权利要求 1 的重组 Betv1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, P108G, D125Y, K134E, +160N。

19. 权利要求 18 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: E87, E141, K55, N47/N43/I44/H76, S155/HIS154, A130, E8, E73, V2/K119。

20. 权利要求 18 或 19 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K65N, T10P/E8, E87, S155/D156H, E141, E42S, A130, E8/T10P, N47, H76T, V2。

21. 权利要求 1 的重组 Bet v 1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N。

22. 权利要求 21 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K134, N78, E87, K119, E8, K55X, E141, N47, S155, E6, K103, A130, V2。

23. 权利要求 21 或 22 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K65N/K55, T10P/E8/E141, E138/K134, E87, E42S/K55/I44, S155/D156H, N78, K119/V2/N4, N47/P50, H76/T77A, A130, E6/K115/K103。

24. 权利要求 1 的重组 Bet v 1 过敏原, 其含有下述突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S, P108G, +160N。

25 权利要求 24 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: K134, N78, E87, K119, E8, K55X, E141, S155, N47, E6, K103, A130, V2, R70, D125。

26. 权利要求 24 或 25 的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一种下述取代, 其中最期望进行的取代被最先列出: N78/T77A, K103X, K134/E138, K65N/K55, T10P, D125/H126, E42S/K55, S155/D156H/HIS154, K119/V2, E87, N47/P50/H76, A130。

27. 前述任一权利要求的重组 Betv1 过敏原,其含有至少一种下述取代: Y5, N28, K32, E45, E96/K97, P108/D109, N159/+160, E60, T10, K103/K115, K65, K129, K134, E42/K55, S149/A153/L152, D125/K123, N47/L24, T77/N78, K119, E87, A16/K20/P14, Q36/G61/P63, E73, D93, V2。

28. 前述任一权利要求的重组 Betv1 过敏原,其含有至少一种下述取代: Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S/K97S, P108G/D109N, N159G/+160N, E60S, T10N, K103V/K115N, K129N, K134E, E42S/K55N, S149T/A153V/L152A, D125Y/K123I, N47K/L24A, T77N/N78K, K119N, E87A, A16G/K20S/P14G, Q36N/G61S/P63G, E73S, D93S, V2L。

29. 权利要求 1 的重组 Betv1 过敏原,其含有取代,所述取代选自下述 10 组中的至少 4 组:

组 1: A130V, K134E, E141N,

组 2: V2L, Y5V, E6S, K119N,

组 3: E42S, E45S, N47K, K55N, E73S, E73T, E73S,

组 4: E8S, T10P, P14G, P108G, D109N, K115N,

组 5: A16G, K20S, S149TL152AA153V, S155T, N159G, +160N,

组 6: L24A, D25E, N28T, K32Q,

组 7: T77A, T77N, N78K, K103V,

组 8: R70N, E87A, E96S, K97S,

组 9: D93S, K123I, D125Y, K129N,

组 10: Q36N, E60S, G61S, P63G。

30. 本发明进一步涉及根据权利要求 1 的重组 Betv1 过敏原,其含有选自下述 10 组中至少 4 组的取代:

组 1: K134E,

组 2: Y5V, K119N, V2L,

组 3: E45S, E42S, K55N, N47K, E73S,

组 4: E96S, K97S, P108G, D109N, T10N, K115N, P14G,

组 5: N159G, +160N, S149T, A153V, L152A, A16G, K20S,

组 6: N28T, K32Q, L24A,

组 7: K103V, T77N, N78K,

组 8: E96S, K97S, E87A,

组 9: K129N, D125Y, K123I, D93S,

组 10: E60S, Q36N, G61S, P63G。

31. 权利要求 1-30 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其至少含有 5 个, 优选 6 个, 更优选 7 个, 最优选 8-10 个一级突变。

32. 权利要求 1-31 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一个二级突变。

33. 权利要求 1-32 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有权利要求 1, 权利要求 2 或权利要求 3 所列各组的至少一个二级突变。

34. 权利要求 1-33 的任一项的重组 Bet v 1 过敏原, 其进一步含有至少一个额外突变, 其中该突变是表面暴露环氨基酸残基的增加或缺失。

35. 任一前述权利要求的重组 Bet v 1 过敏原作为药物的应用。

36. 权利要求 1-34 的任一重组过敏原在制备预防和/或治疗山毛榉 (Fagales) 花粉过敏的药物中的应用。

37. 权利要求 1-34 的任一重组过敏原在制备预防和/或治疗桦木花粉过敏的药物中的应用。

38. 组合物, 其包含两种或多种权利要求 1-34 的任一重组 Bet v 1 过敏原变体, 其中每个变体限定为具有至少一种一级突变, 该突变在至少另一变体中不存在。

39. 权利要求 38 的组合物, 其含有 2-12, 优选 3-10, 更优选 4-8, 最优选 5-7 种变体。

40 权利要求 38-39 的组合物用作药物的应用。

41. 权利要求 38-40 的组合物在制备预防和/或治疗山毛榉 (Fagales) 花粉过敏的药物中的应用。

42. 权利要求 38-40 的组合物在制备预防和/或治疗桦木花粉过敏

的药物中的应用。

43. 药物组合物，其特征在于其含有权利要求 1-34 的任一重组过敏原或权利要求 38-40 的组合物，还任选地含有药学上可接受的载体和/或赋形剂，以及任选的辅剂。

44. 权利要求 43 的药物组合物，其特征在于它是针对在患有桦木过敏反应的病人中由天然存在的 Bet v 1 过敏原诱发的过敏反应的疫苗形式。

45. 在个体中产生免疫应答的方法，包括给个体施用至少一种权利要求 1-34 中任一重组过敏原或权利要求 38-40 的组合物或权利要求 42-43 的药物组合物。

46. 对个体接种疫苗或进行治疗的方法，包括对个体施用至少一种权利要求 1-34 中任一重组过敏原或权利要求 38-40 的组合物或权利要求 42-43 的药物组合物。

47. 制备权利要求 42-43 的药用组合物的方法，包括将权利要求 1-34 中任一重组过敏原或权利要求 37-39 中任一项的组合物与药学上可接受的物质和/或赋形剂混合。

48. 权利要求 47 的方法所获的药物组合物。

49. 对个体进行治疗，预防或减轻过敏反应的方法，包括对个体施用权利要求 1-34 的任一重组 Bet v 1 过敏原或权利要求 38-40 的任一项的组合物或权利要求 43-44 和 48 的任一药物组合物。

50. 制备权利要求 1-34 的任一重组 Bet v 1 过敏原的方法，其中氨基酸的取代是通过定点突变进行。

51. 制备权利要求 1-34 的任一重组 Bet v 1 过敏原的方法，其中过敏原是通过 DNA 改组（分子育种）制备。

52. 制备权利要求 1-34 的任一重组 Bet v 1 过敏原文库的方法，其中该过敏原是使用含有至少 4 种氨基酸残基随机取代的寡核苷酸引物制备。

53. 权利要求 52 的方法，其中氨基酸残基选自：Y5, T10, K20, N28, K32, Q36, E42, E45, E73, K65, N78, E87, K97, K103,

P108, K123, K129, K134, S149, D156, 和+160。

54. 编码权利要求 1-34 的重组 Bet v 1 过敏原的 DNA 序列, 其衍生物, 其部分片段, 其简并序列或在严谨条件下能够与其杂交的序列, 其中所述衍生物, 部分片段, 简并序列或杂交序列编码具有至少一种 B 细胞表位的肽。

55. 权利要求 54 的 DNA 序列, 其为天然过敏原 DNA 编码序列的衍生物。

56. 权利要求 55 的 DNA 序列, 其中该衍生物是通过天然 Bet v 1 过敏原 DNA 编码序列进行定点突变获得。

57. 含有权利要求 54-56 任一项的 DNA 的表达载体。

58. 含有权利要求 57 的表达载体的宿主细胞。

59. 制备重组 Bet v 1 过敏原突变体的方法, 包括培养权利要求 58 的宿主细胞。

60. 权利要求 1-34 任一项的重组 Bet v 1 过敏原或权利要求 54-56 任一项的 DNA 序列所编码的重组 Bet v 1 过敏原, 包含至少一个 T 细胞表位, 所述表位能够刺激对天然 Bet v 1 过敏原特异的 T 细胞克隆或 T 细胞系。

61. 评价使用权利要求 1-34 任一项的重组 Bet v 1 过敏原突变体或权利要求 38-40 的组合物治疗个体的疗法的相关性, 安全度或效果的诊断试验, 其中将含有 IgE 的个体样品与所述突变体或所述组合物混合, 并评价所述样品中 IgE 和所述突变体之间的反应性水平。

## 重组 Bet. v. 1 过敏原突变体及其方法和制备

### 发明领域

本发明涉及过敏反应的诊断和治疗。更具体而言，本发明提供了获得突变过敏原分子的方法，所述分子可用于过敏反应的诊断和治疗。本发明还涉及新型重组过敏原及其应用，所述过敏原是天然存在的过敏原的突变体。另外，本发明还涉及含有重组过敏原混合物的药用组合物。本发明还涉及这种重组突变过敏原的制备方法以及含有该重组突变过敏原的药物组合物和疫苗。在一些实施方案中，本发明涉及在受试者中产生免疫应答，接种或治疗受试者的方法以及制备本发明组合物的方法。

### 发明背景

遗传上易感的个体可被个体所接触的各种环境来源产生的抗原或过敏原致敏（过敏）。当以前致敏的个体再接触相同或同源的过敏原时会发生过敏反应。过敏反应的范围包括枯草热、鼻传导疾病（rhinoconductivitis）、鼻炎、哮喘和全身性过敏病以及例如由于蜜蜂或大黄蜂螫伤或昆虫咬伤所引起的死亡。该反应是即时的且可由各种特异反应性过敏原引起，例如，来自草类，树木，杂草，昆虫，食物，药品，化学物质和香料等的化合物。

然而，当个体首次接触过敏原时不出现这类反应。开始的适应性应答需要时间且通常不引起任何症状。但当已产生能与过敏原反应的抗体和 T 细胞时，任何随后的接触都可能激发生症状。因此，过敏反应表明免疫应答本身可引起威胁生命的重大病理状态。

特异反应性过敏反应涉及的抗体主要属于 IgE 型免疫球蛋白。IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面上的特异性受体结合。特定的过敏原与结合于肥大细胞上的 IgE 形成复合物后，受体在细胞表面交联，导致通过该受体产生信号传导和形成靶细胞的生理反应。肥大细胞的脱

粒导致释放组胺，肝素，嗜酸性白细胞趋化因子，白三烯 C<sub>4</sub>、D<sub>4</sub> 和 E<sub>4</sub>，它们会引起支气管平滑肌细胞持续收缩。在自然情况下产生的效应可以是全身性的或是局部的。

抗体介导的过敏性反应可分成 4 类，即 I 型，II 型，III 型和 IV 型。I 型过敏反应是典型的即时过敏反应，在接触抗原后几秒或几分钟内发生。其症状由过敏原特异性 IgE 介导。

通常，观察到的过敏反应是对存在于诸如花粉，室内粉尘螨，动物毛发和头皮屑，毒液和食品中的蛋白质过敏原发生的反应。

为了减小或消除过敏反应，通常使用仔细控制和重复地施用过敏反应疫苗。传统上经过肠胃外、鼻内或舌下用药进行过敏反应疫苗接种，在相当长的时间期间内不断增加剂量，导致病人脱敏。尚未知道精确的免疫学机制，但有人认为在过敏原特异性 T 细胞表型方面诱导的差异特别重要。

#### 过敏反应的疫苗接种

疫苗接种的概念以免疫系统的两个基础特征，即特异性和记忆性为基础。疫苗接种会引发受体的免疫系统，当重复接触相似蛋白时，免疫系统会对诸如微生物感染之类的攻击发生更强烈的应答。疫苗是用于接种以在受体中产生这种保护性免疫反应的蛋白混合物。保护仅包括存在于疫苗中的成份和同源抗原。

与其它类型的疫苗接种相比，过敏反应接种由于在过敏反应病人中存在正进行的免疫反应从而更加复杂化。这种免疫反应的特征在于存在过敏原特异性 IgE，当接触过敏原时介导过敏反应症状出现。因此，使用来自天然来源的过敏原进行过敏反应接种具有固有的危险，其副作用的最坏后果可能会威胁患者的生命。

围绕该问题的研究方法可分成 3 类。在实际中常结合使用多类方法。第一类方法包括在较长的时间内施用一些小剂量以达到较大的累积剂量。第二类方法包括将过敏原掺入诸如氢氧化铝的凝胶物质中对过敏原进行物理修饰。氢氧化铝制剂具有佐剂效应和延缓过敏原释放以降低活性过敏原成份组织浓度的贮藏效应。第三类方法包括化学修

饰过敏原以降低过敏原性，即 IgE 的结合性。

成功的过敏反应接种的详细机制还存在争议。然而，已认可 T 细胞在免疫反应的总体调节中起关键作用。根据目前的共识，T 细胞的两种极端表型，Th1 和 Th2 之间的关系决定了个体的过敏反应状态。当用过敏原刺激时，Th1 细胞分泌白细胞介素，主要是干扰素- $\gamma$ ，导致保护性免疫，而该个体是健康的。另一方面，Th2 细胞主要分泌白细胞介素 4 和 5，导致 IgE 合成和嗜嗜红细胞增多，而该个体是过敏性的。体外研究表明，用含相关 T 细胞表位的肽衍生的过敏原攻击则有可能改变过敏原特异性 T 细胞的反应。因此目前对新的过敏反应疫苗的研究主要以针对 T 细胞为基础，目的在于使 T 细胞（过敏反应诱导）沉默或使反应从 Th2 表型转换为 Th1 表型。

#### 结合抗体的表位（B-细胞表位）

F<sub>ab</sub> 抗原复合物的 X-射线晶体学分析增进了对结合抗体的表位的了解。根据这类分析，结合抗体的表位可定义为含有 15-25 个氨基酸残基的原子的抗原表面部分，它们与能直接相互作用的抗体原子保持在一定的距离内。抗原-抗体相互作用的亲和性不能单独从范德华相互作用、氢键或离子键所产生的焓来推测。其能量贡献的大小相似于水分子从界面几乎完全脱离所需的焓。这意味着相互作用的分子外形之间的高度匹配是进行抗原-抗体高亲和性相互作用的主要因素。

在 WO 97/30150（参考文献 1）中要求保护一组蛋白质分子，该蛋白质分子与亲本蛋白质相比在氨基酸序列中分布着特定的突变。根据其说明书，似乎该发明涉及产生与亲本蛋白质相比修饰过的类似物，但它们与亲本蛋白质（天然存在的过敏原）以相同的方式被吸收、消化并呈递给 T 细胞。因此，获得有所改变的 T 细胞反应。修饰蛋白质的文库使用称为 PM（简约原则的诱变）的技术制备。

在 WO 92/02621（参考文献 2）中描述了重组的 DNA 分子，该分子包含编码具有山毛榉目中树的过敏原至少一个表位的多肽的 DNA，该过敏原选自 *Aln g 1*，*Cor a 1* 和 *Bet v 1*。文中描述的重组分子确实都具有相应于天然存在的过敏原序列的氨基酸序列或部分氨基酸

序列。

WO 90/11293 (参考文献 3) 涉及分离的豚草花粉过敏原多肽和修饰的豚草花粉肽。其中公开的多肽具有相应于天然存在的过敏原或其天然存在的同种型序列的氨基酸序列。

### 过敏原的化学修饰

对过敏原的化学修饰已进行了一些研究。七十年代早期的科学研究包括将过敏原化学偶联到多聚体上和使用甲醛等化学交联过敏原产生所谓的“过敏原类似物 (allergoids)”。这些研究的基本原理是经过附着化学配体随机破坏 IgE 结合表位从而降低 IgE 结合，同时因增加复合物的分子量而保持其免疫原性。与“过敏原类似物”生产的内在缺陷相关联的是难以控制化学交联过程和难以分析及标准化所得的高分子量复合物。“过敏原类似物”目前用于临床，且由于随机破坏了 IgE 结合表位，故与常规疫苗相比可施用更高的剂量，但相对于常规疫苗的使用并没有提高安全性和效力参数。

化学修饰过敏原的更近期的研究集中于总体破坏过敏原的三级结构，从而消除 IgE 结合，其中假定基本治疗靶是过敏原特异性 T 细胞。该疫苗含有来自过敏原序列的代表最小 T 细胞表位的合成肽，代表相连 T 细胞表位的较长肽，来自较长过敏原序列、代表免疫显性 T 细胞表位区域的合成肽，或以重组技术切成两半的过敏原分子。根据这一基本原理的另一方案是建议使用“低 IgE 结合”的重组同种型。在最近几年中，已清楚天然的过敏原是异源性的，其中含有同种过敏原 (isoallergen) 和具有多达大约 25% 氨基酸被取代的变体。已发现一些重组的同种过敏原在 IgE 结合中效率较低，这很可能是由于不可逆的变性且因此总体上破坏了三级结构。

### 体外诱变和过敏反应接种

使用一些过敏原经过体外定点诱变进行了降低过敏反应性的尝试。这些过敏原包括 Der f 2 (Takai 等, 文献 4), Der p 2 (Smith 等, 文献 5), 39KDa 美洲家刺皮螨过敏原 (Aki 等, 文献 6), 蜜蜂毒液磷脂酶 A2 (Förster 等, 文献 7), Ara h 1 (Burks 等, 文

献 8), Ara h 2 (Stanley 等, 文献 9), Bet v 1 (Ferreira 等, 文献 10 和 11), 桦木抑制蛋白 (Wiedemann 等, 文献 12), 和 Ory s 1 (Alvarez 等, 文献 13)。

同样, 这些方案的基本原理也是针对过敏原特异性 T 细胞, 同时经过破坏重组突变体过敏原的三级结构以减少或消除 IgE 结合来降低 IgE 介导的副作用风险。

Ferreira 等 (文献 11) 的文章描述了使用定点诱变以减少 IgE 结合。尽管在该文章中提到了 Bet v 1 的三维结构, 但作者没有使用该结构预测暴露于表面、可用于突变的氨基酸残基, 其中一半具有较低的溶剂暴露程度。相反他们使用用于预测蛋白质中功能性残基的方法。尽管作者确实讨论了  $\alpha$ -碳原子骨架三级结构的保守性, 但该概念不是治疗策略的一部分, 而仅仅用于体外评价 IgE 结合。而且, 提供的证据也不充分, 因为 CD-谱的标准化会妨碍对样品变性部分的评价, 这是一个共同的问题。所述的治疗策略旨在在过敏原特异性 T 细胞中诱导耐受性, 且未提及启动新的免疫应答。

Wiedemann 等 (文献 12) 的文章描述了使用定点诱变和肽合成来进行单克隆抗体表位的鉴定。该研究表明取代表面暴露的氨基酸具有修饰单克隆抗体结合特征的能力, 但这并不令人惊奇, 据认为是一种常识。所描述的实验没有设计成评价对诸如过敏反应患者血清 IgE 之类多克隆抗体的结合调节。其中所包含的一个实验确实应用了血清 IgE, 尽管该实验不适合于定量评价, 但 IgE 结合似乎不受所进行的突变的影响。

Smith 等 (文献 5) 的文章描述了使用定点诱变以实现单克隆抗体表位绘图和减少 IgE 结合。作者不了解三级结构且没有尝试评价  $\alpha$ -碳原子骨架三级结构的保守性。所用的算法不能保证选择用于突变的氨基酸确实暴露于分子表面。所述的突变体只有一个导致 IgE 结合明显减小。该突变体不能结合所试验的全部抗体, 表明其三级结构被破坏。作者没有限定治疗策略、也没有提及启动新的免疫应答。

Colombo 等 (文献 14) 的文章描述了使用定点诱变和肽合成研究

IgE 结合表位。作者根据同源蛋白质的晶体结构使用了一个三维计算机模型结构以阐明分子表面的表位存在。使用代表表位的合成肽证实了显示一级结构同源性的不同过敏原上也存在一个表位。治疗策略以使用代表单价 IgE 结合表位的合成肽进行治疗为基础。

Spangfort 等（文献 15）的文章描述了主要桦木过敏原的三维结构和保守的表面暴露部分。该文章没有提及定点诱变，也没有阐述治疗应用。

在上述研究中没有一个是经过取代表面暴露的氨基酸而保持  $\alpha$ -碳骨架的三级结构来减小 IgE 结合。上述研究均未提及启动一个新的保护性免疫应答的治疗理念。

W001/83559 公开了一种筛选具有改进的免疫原性蛋白变体的方法，利用抗体结合肽序列确定亲本蛋白三维结构中的表位序列。随后定义了一个表位区域，然后将定义该表位区域的一个或多个氨基酸突变。该发明利用可作为过敏原的工业酶进行举例说明。

W099/47680 提出向指定的关键位置中引入人工氨基酸取代，同时保持过敏原  $\alpha$ -碳骨架三级结构的保守性。W0 99/47680 还特别公开了一种重组过敏原，它是一种来自天然过敏原的非天然突变体，其中 B 细胞表位中至少一个暴露于表面的保守氨基酸残基被在所述天然过敏原起源的分类学目内任何已知同源性蛋白质的氨基酸序列中相同位置上都不出现的另一残基取代，所述的突变过敏原具有与所述天然过敏原基本上相同的  $\alpha$ -碳骨架三级结构，且特异性 IgE 与突变过敏原的结合比与所述天然过敏原的结合更小。

W099/47680 所公开的重组过敏原可经过如下方法获得：a) 鉴定天然过敏原中，在该天然过敏原起源的分类学目内所有已知同源蛋白质中具有超过 70% 相同性的保守氨基酸残基；b) 以具有至少 20% 的溶剂可接近性，确定在过敏原分子三维结构表面至少  $400\text{\AA}^2$  的范围内连贯连接的至少一块保守氨基酸残基区域，所述至少一块区域包含至少一个 B 细胞表位；c) 所述至少一块区域中的至少一个氨基酸残基被在该特定位置不保守的另一氨基酸取代，而基本上保留过敏原分子的

总体  $\alpha$ -碳骨架三级结构。

专利申请 PCT/DK01/00764 涉及天然过敏原的突变体。其中公开了  
下述特定 Bet v 1 突变体:

突变 A: Asn28Thr, Lys32Gln, Asn78Lys, Lys103Val, Arg145Glu,  
Asp156His, +160Asn.

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

突变 2628: Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu.

突变 2637: Ala16Pro, Asn28Thr, Lys32Gln, Lys103Thr,  
Pro108Gly, Leu152Lys, Ala153Gly, Ser155Pro.

突变 2724: N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H,  
+160N.

突变 2733: Tyr5Val, Lys134Glu, Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser,  
Lys65Asn, Asn78Lys, Lys103Val, Lys97Ser, Pro108Gly, Arg145Glu,  
Asp156His, +160Asn.

突变 2744: Tyr5Val, Lys134Glu, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys,  
Lys103Val, Lys123Ile, Asp156His, +160Asn.

突变 2753: Asn28Thr, Lys32Gln, Lys65Asn, Glu96Leu, Lys97Ser,  
Pro108Gly, Asp109Asn, Asp125Tyr, Glu127Ser, Arg145Glu.

突变 2744 + 2595: Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V,  
P108G, K123I, K134E, D156H, +160N.

突变 2744 + 2628: Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V,  
K123I, K134E, D156H, +160N.

突变 2744 + 2595 + 2628: Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N,  
N78K, K97S, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N.

附图的简要描述

图 1 显示了过敏原和肥大细胞之间通过 IgE 交联反应的理论模型。

图 2 (左) 用黑色和灰色区域显示的 Bet v 1 分子表面第 1-10 组的  
定位。(右) 构成第 1-10 组的氨基酸残基视图。各组被标记为 1-10。

图 3 显示了用于 Bet v 1 突变的突变体特异性寡聚核苷酸引物。突变的核苷酸下划线。

图 4 显示了为所有突变体而合成和使用的 2 个普遍适用的引物(称为“全有义”(all-sense)和“全无义”(all non-sense))。

图 5 显示了天然及一些突变 Bet v 1 过敏原的 DNA 和氨基酸序列。

图 6 显示用非生物素标记的 Bet v 1 和用 Bet v 1 Glu45Ser 突变体抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 7 显示用非生物素标记的 Bet v 1 和用 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 8 显示了用非生物素标记的 Bet v 1 和用 Bet v 1 Pro108Gly 突变体抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 9 显示了用非生物素标记的 Bet v 1 和用 Bet v 1 Glu60Ser 突变体抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 10 显示了重组及(Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly)突变体的 CD 谱, 接近等浓度下记录。

图 11 显示了用非生物素标记的 Bet v 1 和用(Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly)突变体抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 12 显示用于形成突变 Bet v 1 过敏原的 2 步法 PCR 突变技术图解。

图 13 显示形成克隆 Bet v 1 (3004), (3005), (3007) 和 (3009) 的 PCR 突变步骤图解。列出了用于导入点突变的引物。

图 14 显示形成克隆 Bet v 1 (3031) - (3045) 的 PCR 突变步骤图解。列出了用于在 10, 20, 36, 73, 87, 129 和 149 位导入随机突变的简并引物。在顶部显示了各位点可能形成的突变结果。

图 15 是用于产生突变的各引物的示意图。(I) 显示正义和反义引物。(II) 显示在指定位点带有突变的重组蛋白终产物。

图 16 显示 Bet v 1 突变体的构建说明及所用引物列单。该突变体含有 5-9 个氨基酸。

图 17 显示在 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 表面引入的点突变。在 Bet v 1 (2628) 突变体中, 在 Bet v 1 的一半区域引入了 5 个一级突变, 另一半区域维持不变。而在 Bet v 1 (2637) 突变体中, 在另一半区域引入了 5 个一级突变和 3 个二级突变, 另一半区域维持不变。

图 18 显示了 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2637) 突变体的圆二色性 (CD) 光谱, 接近等浓度下记录。

图 19 显示了用非生物素标记的 Bet v 1.2801 (野生型), 和用 Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637) 以及用 1: 1 混合的 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 抑制生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者群的血清 IgE 的结合。

图 20 显示 Bet v 1.2801 (野生型), Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637) 在人嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 21 显示 Bet v 1.2801 (野生型), Bet v 1 (2628), Bet v 1 (2637) 在人嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 22 显示 Bet v 1 (2744) 表面的点突变。

图 23 显示 Bet v 1 (2753) 表面的点突变。

图 24 显示 Bet v 1 (2744) 和 Bet v 1 (2753) 表面的点突变。

图 25 显示了 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2744) 的圆二色性 (CD) 谱, 接近等浓度下记录。

图 26 显示 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2744) 在人嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 27 显示 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2744) 在人嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 28 显示 Bet v 1 (2733) 表面的点突变。

图 29 显示不同 Bet v 1 制剂的表示为刺激指数 (SI) 的外周血淋巴细胞的增殖情况。

图 30-32 显示用不同 Bet v 1 制剂刺激的 T 细胞的细胞因子特征。图 30 显示具有 Th0 特征的患者, 特征 31 为 Th1 特征, 图 32 为 Th2 特征。

图 33 显示 rBet v 1.2801 (•) (野生型) 和带有 12 个突变的 rBet v 1.3007 突变体 [Δ] 的圆二色性 (CD) 谱, 接近等浓度下记录。显示了 15°C 下获得的圆二色性 (CD) 谱的覆盖图

图 34 显示用 rBet v 1.2801 (•) (野生型) 和带有 12 个突变的 rBet v 1 (3007) 突变体 [Δ] 抑制生物素标记的 rBet v 1.2801 与桦木过敏反应患者血清 IgE 集合的结合。

#### 发明目的

本发明的目的是提供改进的重组突变过敏原蛋白。

#### 本发明的基本原理

本发明以独特的原理为基础。根据该基本原理, 成功的过敏反应接种的机制不改变正在进行的 Th2 型免疫应答, 而同时启动涉及由 B 细胞识别的三级结构表位以及形成抗体的一种新的免疫应答。可以相信该新型免疫反应部分属于 Th1 型免疫应答。当疫苗 (或药用组合物) 通过非呼吸道的其它途径用药时, 假定新的免疫应答在身体上不同于正在进行 Th2 应答的部位发生, 从而使得两种应答同时存在。

另外, 本发明还基于发现了过敏症状是由具有至少两个特异性 IgE 的过敏原通过高亲合性 IgE 受体, FcεRI 而交联所引发的, 所述 IgE 与效应细胞, 即肥大细胞和嗜碱性粒细胞的表面结合。为进行说明, 我们参见图 1, 其描绘了一种过敏原具有 3 种 IgE 结合表位的理论模型。诱导介体从肥大细胞释放, 从而通过过敏原介导的肥大细胞表面的 IgE 交联引发过敏症状, 比较图 1A。在图 1B 所示的情况中, 表位的 2 个位点已被突变以减少其 IgE 结合能力, 从而避免了过敏原介导的交联。在这种连接情况下应该注意到过敏原通常含的 B 细胞表位都多于 3 个。

为了使突变过敏原能够产生包括 IgG 反应在内的一种新型免疫应

答，该突变过敏原必须包含至少一个完整的表位或仅被轻微改变的表位。轻微改变表位的表面构形优选类似原始表位，可以形成更多 IgG 抗体。这些新的 IgG 抗体具有特异性，能够竞争并若干程度地取代 IgE 结合天然过敏原。另外，可以假设：已被突变以消除或减少其 IgE 结合能力的表位越多，则过敏疫苗给药后过敏原介导的交联和所引起过敏症状的风险就越小。

根据这一基本原理，过敏原具有  $\alpha$ -碳骨架三级结构必需基本上类似于天然过敏原。

以前已假定适于突变的位点仅位于被认为含有主要的 IgE 结合表位的保守氨基酸残基的区域。但是，根据本发明，似乎适于突变的表面暴露氨基酸残基同时包含高度保守残基和不保守残基或者轻微保守的残基。这种氨基酸残基似乎分布于整个分子表面，倾向于形成小基团，覆盖着分子表面的特定区域。

因此，根据本发明，适于突变的表面暴露氨基酸可以分成若干组，如图 2 所示。分组是根据这些氨基酸残基形成分离区域的倾向性进行，分组还不依赖于氨基酸残基的保守程度。每组代表许多表面暴露的氨基酸残基，所述氨基酸是在过敏原表面的有限区域内发现。每个单独的组很可能含有至少一个表位的一部分或至少一个完整表位。每个单独的组还可能含有通过突变导致温和改变的表位的氨基酸位点以及通过突变成更剧烈改变的表位的氨基酸位点。如果原始氨基酸残基被化学性质类似的氨基酸取代（如用疏水氨基酸取代另一个疏水氨基酸），那么一个单独的氨基酸通常会形成温和改变的表位。总之，通过从指定各组的至少四组氨基酸残基中选择突变可以提供一种工具，从而可以获得本发明的突变过敏原，该过敏原是在几种 B 细胞表位进行突变并且具有与天然过敏原类似的  $\alpha$ -碳骨架结构。

本发明的另一重要方面是突变过敏原维持着连续表面区域，该区域面积大约为  $400-800\text{\AA}^2$ ，其中不含突变或仅含温和突变。据信过敏原含有大量潜在的针对特定 IgE 的结合区域，其中每个区域的面积大约为  $800\text{\AA}^2$ 。

本发明的发明理念基于对突变过敏原的下述认识：过敏原含有能够将 IgE 结合力减少的突变（该突变选自至少 4 个规定的组，每一组都含有表面暴露的适于突变的氨基酸），但是保留至少一个完整的或温和改变的表位，这种过敏原一方面能够减少过敏原介导的交联，另一方面可以产生有与 IgE 竞争的结合能力的 IgG 反应。因此，所述突变过敏原构成了非常有利的过敏原，因为过敏反应的风险被大大减少。该突变过敏原能够以相当高剂量用药以提高其在产生保护性免疫应答中的效力而不损失其安全性。

而且，本发明基于认识到含有不同的这种突变过敏原的疫苗在诱导对过敏症状的保护能力上与其天然过敏原等效，其中许多或全部表位理想地不发生变化或仅在不同突变过敏原发生温和改变。

#### 发明简述

本发明涉及向过敏原中导入氨基酸取代。该氨基酸取代选自至少 4 组适于进行氨基酸取代的氨基酸组。其目的是减少每个突变表位的特异性 IgE 结合能力但同时还在该突变过敏原上维持至少一个完整或仅温和改变的表位。

本发明具体涉及一种重组 Bet v 1 过敏原，其特征在于它是天然 Bet v 1 过敏原的突变体，其中：

突变维持了与所述天然过敏原基本上相同的  $\alpha$ -碳骨架三级结构，突变含有至少 4 个一级突变，与天然 Bet v 1 过敏原的 IgE 结合能力相比，每种突变都能够将突变过敏原的特异性 IgE 结合能力降低，每种一级突变都是一种表面暴露的氨基酸残基被另一种残基所取代，

该突变位点的放置方式应符合下述：在至少一块  $400-800\text{\AA}^2$  的面积内不含有突变或仅含有一个或多个温和突变，

该一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组，每组均含有适于氨基酸取代的表面暴露的氨基酸位点：

组 1: A130, E131, K134, A135, K137, E138, E141, T142, R145;

组 2: V2, F3, N4, Y5, E6, T7, K119 ;

组 3: D27, S39, S40, Y41, E42, N43, I44, E45, G46, N47, P50, G51, K55, D72, E73;

组 4: E8, T10, V12, P14, V105, A106, T107, P108, D109, G110, I113, K115 ;

组 5: A16, K20, S149, Y150, L152, A153, H154, S155, D156, Y158, N159, +160, 其中+160代表N-末端氨基酸的增加;

组 6: L24, D25, N28, K32;

组 7: H76, T77, N78, F79, K80, E101, K103 ;

组 8: K68, R70, I86, E87, E96, K97;

组 9: G1, G92, D93, T94, K123, G124, D125, H126, E127, K129;

组 10: P35, Q36, E60, G61, P63, F64, K65, Y66;

其前提条件是: 重组 Bet v 1 过敏原不是下述特定突变体:

(Asn28Thr, Lys32Gln, Asn78Lys, Lys103Val, Arg145Glu, Asp156His, +160Asn); (Tyr5Val, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, Lys123Ile, Lys134Glu, Asp156His) ; (Tyr5Val, Glu45Ser, Lys65Asn, Lys97Ser, Lys134Glu) ; (Ala16Pro, Asn28Thr, Lys32Gln, Lys103Thr, Pro108Gly, Leu152Lys, Ala153Gly, Ser55Pro) ; (N28T, K32Q, N78K, K103V, P108G, R145E, D156H, +160N); (Tyr5Val, Lys134Glu, Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Lys65Asn, Asn78Lys, Lys103Val, Lys97Ser, Pro108Gly, Arg145Glu, Asp156His, +160Asn) ; (Tyr5Val, Lys134Glu, Glu42Ser, Glu45Ser, Asn78Lys, Lys103Val, Lys123Ile, Asp156His, +160Asn) ; (Asn28Thr, Lys32Gln, Lys65Asn, Glu96Leu, Lys97Ser, Pro108Gly, Asp109Asn, Asp125Tyr, Glu127Ser, Arg145Glu) ; (Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, N78K, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N); (Y5V, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, K123I, K134E, D156H, +160N); 和 (Y5V, N28T, K32Q, E42S, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K123I, K134E, D156H, +160N)。

更具体地, 本发明涉及一种重组 Bet v 1 过敏原, 其中一级突变选自下述 10 组中的至少 4 组, 每组均含有适于下述氨基酸取代的表面

**暴露的氨基酸位点:**

组 1: A130: A130V, A130G, A130I, A130L, A130S, A130H, A130T;  
E131: E131 D, E131 H, E131 K, E131 R, E131 S ; K134: K134R,  
K134H, K134S, K134Q, K134I, K134E ; A135 : A135V, A135G, A135I,  
A135L, A135S, A135H, A135T; K137: K137R, K137H, K137S, K137Q,  
K137I, K137E; E138 : E138D, E138H, E138K, E138R, E138S, E138N;  
E141: E141D, E141H, E141K, E141R, E141S ; T142 : T142A, T142S,  
T142L, T142V, T142D, T142K, T142N ; R145: R145K, R145H, R145T,  
R145D, R145E;

组 2: V2: V2A, V2I, V2K, V2L, V2R, V2T; F3: F3H, F3W, F3S,  
F3D; N4: N4H, N4K, N4M, N4Q, N4R; Y5: Y5D, Y5G, Y5H, Y5I, Y5K,  
Y5V ; E6: E6D, E6H, E6K, E6R, E6S; T7: T7P, T7S, T7L, T7V,  
T7D, T7K, T7N; K119 : K119R, K119H, K119S, K119Q, K119I, K119E,  
K119N ;

组 3: D27: D27E, D27H, D27K, D27R, D27S; S39: S39T, S39L,  
S39V, S39D, S39K ; S40: S40T, S40L, S40V, S40D, S40K; Y41: Y41  
D, Y41G, Y41H, Y41I, Y41K, Y41V ; E42: E42S, E42D, E42H, E42K,  
E42R; N43: N43H, N43K, N43M, N43Q, N43R; I44 : I44L, I44K, I44R,  
I44D ; E45: E45S, E45D, E45H, E45K, E45R; G46: G46N, G46H,  
G46K, G46M, G46Q, G46R; N47: N47H, N47K, N47M, N47Q, N47R; P50:  
P50G; G51: G51 N, G51 H, G51 K, G51 M, G51 Q, G51 R ; K55: K55R,  
K55H, K55S, K55Q, K55I, K55E, K55N; D72: D72E, D72S, D72H,  
D72R, D72K; E73: E73D, E73S, E73H, E73R, E73K;

组 4: E8: E8D, E8H, E8K, E8R, E8S; T10 : T10P, T10S, T10L,  
T10V, T10D, T10K, T10N ; V12: V12A, V12I, V12K, V12L, V12R,  
V12T; P14: P14G; V105 : V105A, V105I, V105K, V105L, V105R,  
V105T; A106 : A106V, A106G, A106I, A106L, A106S, A106H, A106T;  
T107: T107A, T107S, T107L, T107V, T107D, T107K, T107N ; P108 :  
P108G ; D109: D109N D109E, D109S, D109H, D109R, D109K; G110:

G110N, G110H, G110K, G110M, G110Q, G110R; I113: I113L, I113K, I113R, I113D, K115: K115R, K115H, K115S, K115Q, K151, K115E, K115N;

组 5: A16: A16V, A16G, A16I, A16L, A16S, A16H, A16T; K20: K20R, K20H, K20S, K20Q, K20I, K20E, K20N; S149: S149T, S149L, S149V, S149D, S149K; Y150: Y150T, Y150L, Y150V, Y150D, Y150K; L152: L152A, L152V, L152G, L152I, L152S, L152H, L152T; A153: A153V, A153G, A153I, A153L, A153S, A153H, A153T; H154: H154W, H154F, H154S, H154D; S155: S155T, S155L, S155V, S155D, S155K; D156: D156H, D156E, D156S, D156R, D156K; Y158: Y158D, Y158G, Y158H, Y158I, Y158K, Y158V; N159: N159H, N159K, N159M, N159Q, N159R, N159G, +160N;

组 6: L24: L24A, L24V, L24G, L24I, L24S, L24H, L24T; D25: D25E, D25H, D25K, D25R, D25S; N28: N28H, N28K, N28M, N28Q, N28R, N28T; K32: K32Q, K32R, K32N, K32H, K32S, K32I, K32E;

组 7: H76: H76W, H76F, H76S, H76D; T77: T77A, T77S, T77L, T77V, T77D, T77K, T77N; N78: N78H, N78K, N78M, N78Q, N78R; F79: F79H, F79W, F79S, F79D; K80: K80R, K80H, K80S, K80Q, K80I, K80E, K80N; E101: E101D, E101H, E101K, E101R, E101S; K103: K103R, K103H, K103S, K103Q, K103I, K103E, K103V;

组 8: K68: K68R, K68H, K68S, K68Q, K68I, K68E, K68N; R70: R70K, R70H, R70T, R70D, R70E, R70N; I86: I86L, I86K, I86R, I86D; E87: E87D, E87H, E87K, E87R, E87S, E87A; E96: E96D, E96H, E96K, E96R, E96S, E96L; K97: K97R, K97H, K97S, K97Q, K97I, K97E;

组 9: G1: G1N, G1H, G1K, G1M, G1Q, G1R; G92: G92N, G92H, G92K, G92M, G92Q, G92R; D93: D93N, D93E, D93S, D93H, D93R, D93K; T94: T94A, T94S, T94L, T94V, T94D, T94K, T94N; K123: K123R, K123H, K123S, K123Q, K123I, K123E; G124: G124N, G124H, G124K,

G124M, G124Q, G124R; D125: D125E, D125H, D125K, D125R, D125S, D125Y; H126: H126W, H126F, H126S, H126D; E127: E127D, E127H, E127K, E127R, E127S; K129: K129R, K129H, K129S, K129Q, K129I, K129E, K129N;

组 10: P35: P35G; Q36: Q36K, Q36R, Q36N, Q36H, Q36S, Q36I, Q36E; E60: E60H, E60K, E60M, E60Q, E60R; G61: G61N, G61H, G61K, G61M, G61Q, G61R; P63: P63G; F64: F64H, F64W, F64S, F64D; K65: K65R, K65H, K65S, K65Q, K65I, K65E, K65N; Y66: Y66D, Y66G, Y66H, Y66I, Y66K, Y66V。

本发明还涉及一种重组 Bet v 1 突变过敏原，其含有选自下述 10 组中的至少 4 组的取代：

组 1: A130V, K134E, E141N,

组 2: V2L, Y5V, E6S, K119N,

组 3: E42S, E45S, N47K, K55N, E73S, E73T, E73S,

组 4: E8S, T10P, P14G, P108G, D109N, K115N,

组 5: A16G, K20S, S149T L152A A153V, S155T, N159G, +160N,

组 6: L24A, D25E, N28T, K32Q,

组 7: T77A, T77N, N78K, K103V,

组 8: R70N, E87A, E96S, K97S,

组 9: D93S, K123I, D125Y, K129N,

组 10: Q36N, E60S, G61S, P63G。

本发明还涉及一种重组 Bet v 1 突变过敏原，其含有选自下述 10 组中的至少 4 组的取代：

组 1: K134E,

组 2: Y5V, K119N, V2L,

组 3: E45S, E42S, K55N, N47K, E73S,

组 4: E96S, K97S, P108G, D109N, T10N, K115N, P14G,

组 5: N159G, +160N, S149T, A153V, L152A, A16G, K20S,

组 6: N28T, K32Q, L24A,

组 7: K103V, T77N, N78K,

组 8: E96S, K97S, E87A,

组 9: K129N, D125Y, K123I, D93S,

组 10: E60S, Q36N, G61S, P63G。

本发明还涉及下述:

可以用作药物以及用于预防和/或治疗桦木花粉过敏反应的药物的重组 Bet v 1 过敏原变体

含有两种或多种不同的本发明重组突变 Bet v 1 过敏原变体的组合物, 其中每种变体均具有至少一种一级突变, 该突变在至少另一变体中不存在。该组合物含有 2-12, 优选 3-10, 更优选 4-9, 最优选 5-8 种变体。本发明的组合物可用作药物并可用于制备预防和/或治疗桦木花粉过敏反应的药物。该药物组合物优选含有药学上可接受的载体, 和/或赋形剂, 以及任选的佐剂。

疫苗形式的药物组合物, 其针对桦木花粉过敏患者中由天然 Bet v 1 过敏原引起的过敏反应。

在个体体内产生免疫反应的方法, 包括对个体施用重组过敏原, 组合物或药物组合物。

个体的免疫接种或治疗, 包括对个体施用重组过敏原, 组合物或药物组合物。

制备药物组合物的方法, 包括将重组过敏原或组合物与药学上可接受物质和/或赋形剂混合。

治疗, 预防或减轻个体过敏反应的方法, 包括对个体施用重组 Bet v 1 过敏原, 组合物或药物组合物。

制备重组 Bet v 1 过敏原的方法, 特征在于氨基酸取代是通过定点突变, 或 DNA 改组 (shuffling) (分子育种) (Punnonen 等, 参考文献 25) 进行。

编码重组 Bet v 1 过敏原的 DNA 序列, 其衍生物, 其部分序列, 其简并序列或在严谨条件下能够与其杂交的序列, 其中所述衍生物, 部分序列, 简并序列或杂交序列编码具有至少一种 B 细胞表位的肽。

由编码天然过敏原的 DNA 序列所衍生的 DNA 序列。编码该衍生物的 DNA 序列是通过对天然 Bet v 1 过敏原的 DNA 编码序列进行定点突变获得。

含有重组 Bet v 1 变体的 DNA 编码序列的表达载体，含有该表达载体的宿主细胞，以及生产重组 Bet v 1 突变体的方法，其包括培养该宿主细胞。

重组 Bet v 1 过敏原或由下述 DNA 序列所编码的 Bet v 1 过敏原：含有至少一个 T 细胞表位的 DNA 序列，所述表位能够刺激对天然 Bet v 1 过敏原特异的 T 细胞克隆或 T 细胞系。

评价使用重组 Bet v 1 过敏原或组合物治疗患者的疗法的相关性，安全度或效果的诊断试验，其中将患者的含 IgE 样品与所述突变或组合物混合，评价所述样品中 IgE 和所述突变体之间的反应性水平。

#### 本发明的详细描述

在本发明中，“与天然过敏原的 IgE 结合能力相比，特异性 IgE 结合能力有所降低”是指这种减少在至少一种免疫试验中以统计学显著水平 ( $p < 0.05$ ) 被测量到，所述试验中使用对天然过敏原过敏的个体的血清。优选地，该 IgE 结合能力被降低至少 10%，更优选至少 30%，更优选至少 50%，最优选至少 70%。

“表面暴露的氨基酸”指氨基酸残基位于 3 维结构的表面，其方式是当过敏原在溶液中时，该氨基酸残基的至少一个原子的至少一部分可以被周围的溶剂接触到。优选该氨基酸残基在 3 维结构中具有至少 20% 的溶剂（水）可接近性，优选至少 30%，更优选至少 40%，最优选至少 50%。

“溶剂可接近性”定义为与半径同溶剂分子（水， $r = 1.4 \text{ \AA}$ ）相当的球体可接近的分子区域。“表面暴露”和“溶剂暴露”可互换使用。

“氨基酸的组”应理解为表面暴露的适于突变的氨基酸的集合。每组代表许多表面暴露的氨基酸残基，所述氨基酸是在过敏原表面的有限区域内发现。每个单独的组含有许多氨基酸，这些氨基酸是至少一个表位的一部分。每个单独的组还可能含盖一个包含一个完整表位

的区域。在一个组内的一个或多个突变被定义为一种一级突变。带有至少 4 个一级突变的突变过敏原能够确保几种表位对 IgE 结合亲和力有所降低。来自至少 4 组氨基酸的突变还可进一步确保突变在分子表面大约呈均匀分布，并确保几个表位产生突变从而导致几个表位与 IgE 结合亲和力有所降低(与所带有突变少于 4 个突变的突变体相比)。

“天然过敏原来源的分类学种”是指在所述天然过敏原起源的分类学属，优选亚科，更优选科，更优选超家族，更优选团 (legion)，更优选亚目，最优选目中的种。

“温和改变的表位”指维持着与相应未突变表位基本相同的三级结构和表面拓扑学的表位。温和改变通常是用与原始氨基酸化学特性类似的氨基酸取代该原始氨基酸而获得。一种获得方法是用天然过敏原所在的分类学目内可能发现的氨基酸取代一个或多个表面暴露的氨基酸。温和改变的表位还可能含有这样的氨基酸取代：其中一个或多个取代的氨基酸并未在天然过敏原所在的分类学目内发现，只要该取代可以轻微地影响表位的三级结构和/或 IgE 结合亲和力。该突变过敏原可以从结构和随后的 IgE 结合亲和力角度进行评价。与温和改变表位相反的是被剧烈改变的表位，如能够显著降低 IgE 结合亲和力的突变。通常，表位的剧烈改变包括用不同化学性质的氨基酸替换一个或多个氨基酸的取代。

另外，“具有与天然过敏原基本相同的  $\alpha$ -碳骨架三级结构的突变过敏原”指当比较突变和天然过敏原的结构时，原子坐标的平均均方根差优选小于  $2\text{\AA}$ 。通过在突变前和突变后进行 x 射线晶体照相术或 NMR 获得同一结构来精确地测定  $\alpha$ -碳骨架三级结构的保守性。如果与分析结构被测定分子所获的数据相比，在没有描述突变的结构数据时，无差别的 CD 光谱或免疫化学数据 (如抗体反应性) 可以认为  $\alpha$ -碳骨架三级结构的是保守的。

本发明中“突变”指与天然过敏原的氨基酸序列相比，存在氨基酸的缺失，取代或增加。该术语“突变”和“取代”可互换使用。本发明的重组突变 Bet v 1 还可进一步含有氨基酸插入或氨基酸缺失，

特别是在该分子的表面暴露区域，如“环区域”。环区域联系着二级结构元件，如 $\beta$ 折叠， $\alpha$ 螺旋和随机缠绕结构。Bet v 1 中的环区域为 Val12 到 ala16, val33 到 ser40, glu45 到 Thr52, pro54 到 tyr66, his76 到 asn78, gly89 到 glu96, val105 到 gly111, thr122 到 glu131。突变体在环区域可含有 1-5，优选 1-3，最优选 1-2 个取代。

一级突变定义为在表面暴露、适于突变的氨基酸的单个组内的一个或多个突变。至少一个突变氨基酸的各组会减少 IgE 结合亲和力(与不带突变的相同组相比)。优选本发明的重组过敏原含有 5-10，优选 6-10，更优选 7-10，最优选 8-10 个一级突变。

二级突变定义为单个组内额外的突变。该重组过敏原优选含有多个二级突变，与天然过敏原的结合能力相比，每个二级突变均会降低该突变过敏原与 IgE 的结合能力。因此，含有几个二级突变的一级突变在许多情况下其 IgE 结合亲和力可能比仅具有一种突变的一级突变更低。本发明的重组过敏原的每个一级突变含有 1-15，优选 1-10，最优选 1-5 个二级突变。

保守残基：天然过敏原中的保守残基与该过敏原起源物种内所有已知同源蛋白具有高于 70%，优选 80%，最优选 90%的同源性。高度溶剂暴露并保守的氨基酸残基构成了取代的靶位。

突变所致的 IgE 结合力减少和介导交联能力减少的另一评价方法是突变抑制组胺释放 (HR) 的能力。可通过几种组胺释放试验测定组胺的释放。突变体的组胺释放减少量来自于与细胞表面结合的 IgE 的特异亲和力的减少，以及其对交联促进作用能力的降低。与天然过敏原相比，优选本发明突变体的组胺被降低 5-100%，更优选 25-100%，更优选 50-100%，最优选 75-100%。

在本发明的优选实施例中，不含突变或仅含温和突变的表面区域面积为  $800\text{\AA}^2$ ，优选  $600\text{\AA}^2$ ，更优选  $500\text{\AA}^2$ ，最优选  $400\text{\AA}^2$ 。通常一个不含突变或仅含温和突变的  $800\text{\AA}^2$  面积表面区域内含有 15-25 个氨基酸残基的原子。

另一实施例中，至少一个要结合入过敏原突变体的氨基酸残基在

该天然存在的过敏原所属分类学属，优选亚科，更优选科，更优选超家族，更优选团 (legion)，更优选亚目且最优选目中任何已如同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上不出现。

根据本发明，将表面暴露的氨基酸残基按照溶剂可接近性排序，且溶剂可接近性较大的氨基酸中的至少 4 个氨基酸被取代。

另一实施例中，重组过敏原的特征在于将表面暴露的氨基酸残基按其在天然存在的过敏原的分类学种中的所有已知同源蛋白质中的保守程度而排序，且将处于较高保守程度的氨基酸中的一个或多个替换。

本发明所公开的原则包括将选自至少 4 组氨基酸的表面暴露氨基酸残基突变，其中每组代表该分子表面的分离区域。该原则还适用于 Bet v 1 之外的过敏原。本发明的重组过敏原可适当地为吸入性过敏原突变体，理论上来源于树、草、草本植物、真菌、屋尘螨、蟑螂和动物毛发和皮屑。来自树、草和草本植物的重要花粉过敏原是源自山毛榉 (Fagales)、木犀目 (Oleales) 和松目 (Pinales) 分类目的这些，理论上包括桦木 (桦木属 (Betula))、桤木 (桤木属 (Alnus))、榛树 (榛属 (Corylus))、角树 (鹅耳枥属 (Carpinus)) 和橄榄树 (齐墩果属 (Ole))，禾目 (Poales) 目理论上包括黑麦草属 (Lolium)、猫尾草属 (Phleum)、早熟禾属 (Poa)、狗牙根属 (Cynodon)、鸭茅属 (Dactylis) 和黑麦属 (Secale) 等属的草，菊目 (Asterales) 和荨麻目 (Urticales) 理论上包括豚草属 (Ambrosia) 和蒿属 (Artemisia) 的草本植物。来自真菌的重要吸入性过敏原理论上为源自链格孢属 (Alternaria) 和芽枝霉属 (Cladosporium) 的这些。其他重要吸入性过敏原来自嗜皮螨属的屋尘螨、来自蟑螂和来自哺乳动物如猫、狗和马。更进一步地，本发明的重组过敏原可为毒液过敏原的突变体，包括来自刺人的或咬人的昆虫，例如来自膜翅目，包括蜜蜂 (蜜蜂总科 (Apidae))，黄蜂 (胡蜂总科 (Vespidae)) 和蚂蚁 (蚁总科 (Formicoidae))。

特异的过敏原成分包括如山毛榉 (Fagales) 目的 Bet v 1 (白

桦 (*B. verrucosa*), 桦木), *Aln g 1* (胶桤木 (*Alnus glutinosa*) 桤木), *Cor a 1* (*Corylus avelana*, 榛子) 和 *Car b 1* (桦叶鹅耳枥 (*Carpinus betulus*) 角树)。其他的为 *Cry j 1* (松目), *Amb a 1* 和 2, *Art v 1* (菊目), *Par j 1* (荨麻目), *Ole e 1* (木犀目), *Ave e 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol l 1*, *Lol p 1* 和 5, *Pas n 1*, *Phl p 1* 和 5, *Poa p 1*, 2 和 5, *Sec c 1* 和 5, 及 *Sor h 1* (各种草的花粉), *Alt a 1* 和 *Cla h 1* (真菌), *Der f 1* 和 2, *Der p 1* 和 2 (屋尘螨, 分别为粉尘螨 (*D. farinae*) 和屋尘螨 (*D. pteronyssinus*)), *Eur m 1* (螨, *Euroglyphus maynei*), (*Lep d 1* 和 2 (*Lepidoglyphus destructor*; 贮藏螨 (storage mite), *Bla g 1* 和 2, *Per a 1* (蟑螂, 分别为德国小蠊 (*Blatella germanica*) 和美洲大蠊 (*Periplaneta americana*)), *Fel d 1* (猫), *Can f 1* (狗), *Equ c 1*, 2 和 3 (马), *Apis m 1* 和 2 (蜜蜂), *Ves v 1*, 2 和 5, *Pol a 1*, 2 和 5 (均为黄蜂) 和 *Sol i 1*, 2, 3 和 4 (火蚁)。

#### 向指定突变体中导入额外取代的一些实例

在本发明的一个实例中突变过敏原被进一步导入了取代, 该取代方式能够确保最终突变过敏原的取代可以均匀地分布在分子表面, 并且各组合有的导入突变的数目基本相同。这可用下述实施例说明, 其中含有特定取代的突变体优选被进一步导入了选自列表的取代, 该表中氨基酸的顺序反应出导入更多取代的优选顺序。这些实施例代表如何设计突变的一种应用, 而并非限制本发明, 本领域技术人员显而易见地可以对其进行改变以确保突变呈均匀分布。突变可以被设计成含有下述指定列表的一个或多个取代。

含有下述取代的 *Bet v 1* 突变体 (“3004A”) 过敏原: Y5V, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: E8 或 K115, D125 或 H126, E138 或 K137 或 E141, D25 或 N28, E87 或 K55, S155 或 H154 或 N159, N47 或 P50 或 H76 或 N43 或 I44 或 R70, E73 或 P50 或 D72, A130, N28 或 D25, P108, V2 或 K119 或 N4

或 E6 或 E96。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3004B") 过敏原: Y5V, E45S, L62F, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: T10P, K65N, N28 或 D25 或 K32Q 或 E141X 或 K137X 或 E138X, D125X 或 K123I 或 H126, P108X 或 D109N, E42S 或 K55X 或 I44X 或 N43X, E73X 或 D72X, E87X, E96X 或 K119, A130X, V2X 或 E6X, E8X 或 K115, N47X 或 P50X 或 R70X 或 H76X 或 T77A, S155X 或 D156H 或 N159X, E6X 或 V2X。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3005A") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: E8X 或 K115X, D125 或 H126, E138X 或 K137X 或 E141X, E87X 或 K55X, S155X 或 H154X 或 N159X, N47X 或 P50X 或 H76X 或 N43X 或 I44X 或 R70X, E73X 或 P50X 或 D72X, A130X, D25X, P108X, V2X 或 K119X 或 N4X 或 E6X 或 E96X。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3005B") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: T10P, K65N, E141X 或 K137X 或 E138X, D125X 或 K123I 或 H126X, P108X 或 D109N, E42S 或 K55X 或 I44X 或 N43X, E73X 或 D72X, E87X, E96X 或 K119X, A130X, V2X 或 E6X, E8X 或 K115X, N47X 或 P50X 或 R70X 或 H76X 或 T77A, S155X 或 D156H 或 N159X, E6X 或 V2X。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3006A") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, E87S, K97S, K103V, K134E, N159G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: K55, A138 或 K137 或 E141, D125 或 H126, P108, V2 或 N4 或 K119 或 E6, S155 或 H154, N47 或 P50 或 H76, E73, R70, A130, E8 或 K115, E96。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3006B") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, E87S, K97S, K103V, K134E, N159G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: K65N, T10P, D125, K123I, P108,

D109N, N47 或 P50 或 H76, E138 或 K137 或 E141, E42S 或 K55 或 I44 或 N43, S155 或 D156H, E73 或 D72, E6 或 V2, E96。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3007A") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, N78K, K97S, K103V, P108G, D125Y, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: E87, E141, E138, K55, N47 或 N43X 或 I44 或 H76, S155 或 H154, A130, E8, E73, V2 或 K119, D25。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3007B") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, N78K, K97S, K103V, P108G, D125Y, K134E, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: K65N, T10P 或 E8, E87, S155 或 D156H, E138, E141, E42S, A130, E8 或 T10P, N47, H76, R70, E96。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3008A") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: E134, N78, E87, K119, E8, K55, E138, E141, S155, N47, E6, K103, D25, A130, V2, R70。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3008B") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: K65N 或 K55, T10P 或 E8 或 E141, E138 或 K134, E87, E42S 或 K55 或 I44, S155 或 D156H, N78, K119 或 V2 或 N4, N47 或 P50, H76 或 T77A, A130, D25, E6 或 K115 或 K103。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3009A") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, E96S, P108G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: E134, N78, E87, K119, E8, K55, E138, E141, S155, N47, E6, K103, D25, A130, V2, R70。

含有下述取代的 Bet v 1 突变体 ("3009B") 过敏原: Y5V, N28T, K32Q, E45S, L62F, E96S, P108G, +160N。还可进一步含有一个或多个下述取代: N78 或 T77A, K103, E134 或 E138, K65N 或 K55, T10P, D125 或 H126, S155 或 D156H 或 H154, K119 或 V2, E87, N47 或 P50

或 H76, E42S 或 K55, I44 或 N43, A130。

### 环突变

在本发明突变过敏原的另一实施方案中还进一步含有氨基酸插入或氨基酸缺失，特别是在分子的表面暴露区域，如环区域。环区域联系着二级结构元件，如  $\beta$  折叠， $\alpha$  螺旋和随机缠绕结构。Bet v 1 中的环区域为：Val12 到 ala16, val33 到 ser40, glu45 到 Thr52, pro54 到 tyr66, his76 到 asn78, gly89 到 glu96, val105 到 gly111, thr122 到 glu131。本发明突变体在环区域可含有 1-5，优选 1-3，最优选 1-2 个取代。在一个优选实施方案中，突变过敏原含有选自 10 组的至少 4 个突变，以及一些额外的“环突变”。这种“环突变”（其中 x 代表加入的氨基酸残基）的实例为：

在残基 E60 和残基 G61 之间带有氨基酸插入的 Bet v 1 (3007-L1)：

```
GVFNVETETTSVIPAAARLFKAFILDGDTLFPQVAPQAISSVENISGNGGPGTI
KKISFPExGFPFKYVKDRVDEVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIVA
TGDGGSILKISNKYHTKGYHEVKAEQVEASKEMGETLLRAVESYLLAHSDA
YNN
```

在残基 D93 和残基 T94 之间带有氨基酸插入的 Bet v 1 (3007-L2)：

```
GVFNVETETTSVIPAAARLFKAFILDGDTLFPQVAPQAISSVENISGNGGPGTI
KKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDxTLESISNEIVIVA
TGDGGSILKISNKYHTKGYHEVKAEQVEASKEMGETLLRAVESYLLAHSDA
YNN
```

在残基 V12 和残基 113 之间带有氨基酸插入的 Bet v 1 (3007-L3)：

```
GVFNVETETTSVxIPAARLFKAFILDGDTLFPQVAPQAISSVENISGNGGPGT
IKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIVA
TGDGGSILKISNKYHTKGYHEVKAEQVEASKEMGETLLRAVESYLLAHSDA
YNN
```

在残基 156 和残基 S57 以及残基 K65 和残基 T66 之间带有氨基酸插入的 Bet v 1 (3007-L4) :

```
GVFNVETETTSVIPAAARLFKAFILDGDTLFPQVAPQAISSVENISGNGGPGTI
KKIxSFPExGFPFKYVKDRVDEVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIV
ATGDGGSILKISNKYHTKGYHEVKAEQVEASKEMGETLLRAVESYLLAHS D
AYNN
```

残基 G111 位点缺失的 Bet v 1 (3007-L5) :

```
GVFNVETETTSVIPAAARLFKAFILDGDTLFPQVAPQAISSVENISGNGGPGTI
KKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIVAT
GDGSILKISNKYHTKGYHEVKAEQVEASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYN
N
```

#### 根据本发明制备重组过敏原的方法

依照本发明适合于替换的表面暴露的氨基酸可以其溶剂（水）可接近性的信息为基础进行确定，该信息表达了其表面暴露的程度。本发明方法的一个优选实施方案特征在于以溶剂可接近性对其中确定的氨基酸残基进行排序，且在具有较大溶剂可接近性的氨基酸中替换一个或多个。

此外，本发明方法的特别优选的一个实施方案特征在于关于以在该天然存在的过敏原所属物种中所有已知同源蛋白质中的保守程度来对其中确定的氨基酸残基进行排序，并在具有较大保守性的氨基酸中替换一个或多个。

本发明方法更进一步优选的实施方案包含选择确定的氨基酸以形成突变体过敏原，它具有与天然存在的过敏原基本上相同的  $\alpha$  碳主链三级结构。

本发明方法的另一个优选实施方案特征在于对氨基酸残基的替换通过定点突变来实现。

本发明方法的另一个优选实施方案特征在于对氨基酸残基的替换通过 DNA 改组来实现，或通过建立含有适当位点及其优选取代的文库来实现。

### 取代的标准

对于三级结构已经确定的分子（例如通过 X-射线晶体学或 NMR 电子显微镜方法）带有取代氨基酸的突变体优选应满足下列标准：

1. 分子的总体  $\alpha$ -碳骨架三级结构优选保守。保守定义为当比较突变和天然过敏原的结构时，原子坐标的平均均方根差小于  $2\text{\AA}$ 。其重要性有 2 个原因：可预期该天然过敏原的整个表面组成潜在抗体结合表位的重叠连续体。该分子表面的大部分不受取代的影响，从而保留了其抗体结合特性，这对于产生针对也存在于天然过敏原上的表位的新保护性抗体特异性是重要的。b) 稳定性，涉及保存期和注射进体液两方面的稳定性。

通过在突变前和突变后进行 x 射线晶体照相术或 NMR 获得同一结构来精确地测定  $\alpha$ -碳骨架三级结构的保守性。如果与分析结构被测定分子所获的数据相比，在没有描述突变的结构数据的情况下，无差别 CD 光谱或免疫化学数据（如抗体反应性）可以认为  $\alpha$ -碳骨架三级结构的是保守的。

2. 待取代的氨基酸优选位于表面，并因此对于抗体结合是可接近的。位于表面的氨基酸通常具有至少 20% 的溶剂（水）可接近性，合适的是 20-80%，更合适的是 30-80% 的溶剂可接近性。溶剂可接近性定义为同半径与溶剂分子（水， $r=1.4\text{\AA}$ ）相当的球体可接近的分子区域。

3. 取代的氨基酸选自至少 4 组。每组代表许多表面暴露的氨基酸残基，所述氨基酸是在过敏原表面的有限区域内发现。在一个组内的一个或多个突变被定义为一个一级突变。每个单独的组含有许多氨基酸，这些氨基酸是至少一个表位的一部分。每个单独的组还可能包含一个完整表位。带有至少 4 个一级突变的突变过敏原能够确保几种表位对 IgE 结合亲和力有所降低。来自至少 4 组氨基酸的突变还可进一步确保突变在分子表面大约呈均匀分布，并确保几个表位产生突变从而导致几个表位与 IgE 结合亲和力有所降低。

为基本维持过敏原的 3 维结构，可在与该过敏原同源结构蛋白进

行比较的基础上选择导入的氨基酸，如与过敏原属于相同分类学目的蛋白，并且该蛋白与该过敏原不存在任何交联反应。

### 疫苗

疫苗的制备为本领域众所周知。疫苗一般以可注射的液体溶液或悬浮液的形式制备。这样的疫苗也可以乳化或配制成能够经鼻及经口给药的形式，包括口腔和舌下给药。正被讨论的免疫原性成分（如在此处所限定的重组过敏原）可适当地与药物学上可接受且进一步与活性成分相容的赋形剂混合。适当的赋形剂的实例为水、盐、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合。疫苗另外可含有其他的物质，如润湿剂、乳化剂、缓冲剂或增强疫苗效力的佐剂。

疫苗最通常通过皮下或肌肉注射以肠胃外方式给药。适合于通过其他途径给药的制剂包括口服制剂和栓剂。经口给药的疫苗可适当地用通常用于这种制剂的赋形剂来调配，如药物等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠（sodium saccharine）、纤维素、碳酸镁等。组合物可被制备成溶液、悬浮液、乳剂、片剂、药丸、胶囊、缓释制剂、气溶胶、粉末或颗粒。

疫苗的给药途径应与剂量配方相容，并且其量有治疗有效性且具免疫原性。在疫苗中包含的活性成分的量依赖于治疗对象、理论上被试者响应于治疗的免疫系统对治疗的应答能力、给药途径及被试者的年龄和体重。适当的剂量范围在  $0.0001\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$ 。

如上所述，通过向制备物中添加佐剂可获得增加的作用。这样的佐剂的实例为在磷酸缓冲盐溶液中以  $0.05\% \sim 0.1\%$  溶液存在的氢氧化铝和磷酸盐（明矾），以  $0.25\%$  的溶液使用的合成糖类聚合物或聚交酯已交酯（polylactid glycolid）（PLG）。也可采用与细菌细胞诸如小棒杆菌（*C. parvum*）、革兰氏阴性细菌的内毒素或脂多糖成份的混合物，在诸如缩甘露醇（mannide monoaleate）（AracelA）的生理学上可接受的油类载体中的乳剂，或含有  $20\%$  全氟化碳（例如，Fluosol-DA）的溶液的乳剂用作封闭取代物。油乳剂，诸如 MF-59 也可用。也可使用其它佐剂，如弗氏完全和不完全佐剂以及 QuilA, Qs-21

和 ISCOM, RIBI。

最经常地, 疫苗的多重给药对确保其作用是必需的。疫苗经常以初次给药后伴随后续接种或其他给药的方式来给药。疫苗接种的数量一般为 1~50 次, 通常不超过 35 次疫苗接种。疫苗接种通常双周到月地进行 3 个月到 5 年的时间。预期这将达到预防或治疗效果的期望水平。

重组过敏原可被用作药物制备物, 在症状出现所在年的期间适合于提供某些对抗过敏反应的保护(预防)。通常, 必须每年重复治疗以维持保护作用。配制为鼻、口和舌下应用的制备物特别适合于这个目的。

#### 本发明的 DNA

本发明的 DNA 序列是天然 Bet v 1 过敏原编码 DNA 的突变体。天然 Bet v 1 分子的实例为 SEQ ID NO 1 (数据库登录号 Z80104) 和 SEQ ID NO 2 (数据库登录号 P15494)。其他的 Bet v 1 变体包含具有下述数据库登录号的 Bet v 1 序列: 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, 和 S47249。

优选地, 该 DNA 衍生物是通过对天然过敏原编码 DNA 进行定点或随机或半随机突变产生。

“突变文库”是过敏原突变体的文库。该文库是通过用简并的 DNA 寡核苷酸引物构建而成, 该引物可以在每个位点导入 0 个、1 个或几个不同的氨基酸残基。这样的文库方法可以使氨基酸残基被保守或非保守取代。因为保守取代可以在特定位置导入这种“轻微”或温和突变, 不会过多地影响结构的整体性, 因此可以增加形成稳定突变体的

机会。构建这种突变体文库可以克服由单一或特定结合的突变所引起的突变过敏原蛋白质稳定性缺陷。“半随机文库”指待突变的位点被限制在表面暴露的那些氨基酸残基之中。该方法还可提高获得稳定突变过敏原的可能性。“半随机”还意味着设计的引物可以允许在选定位置用选定数目的氨基酸进行取代。这两种半随机方法可独立应用，或组合应用。理论上，本发明的文库含有许多 rBet v 1 突变过敏原，与未突变的 Bet v 1 相比，每个突变过敏原都具有至少 4 个氨基酸取代。

在一个实施例中，构建了一个基于 rBet v 1 (2744) (突变位点 Y5, E42, E45, N78, K103, K123, K134, D156, +160) 和 rBet v1 (2628) (位点位点 Y5, E45, K65, K97, K134) 的半随机文库，并在过敏原表面靶定额外 7 个位点：T10, K20, Q36, E73, E87, K129 和 S149。这 7 个位点选自位于 Fagales 过敏原中共有的外部连贯表面区域的表面区域。该文库是基于简并 DNA 寡核苷酸引物的应用，该引物能够在各位点导入不同氨基酸残基。另外，在 rBet v 1 (2744) 和 rBet v1 (2628) 中的几个突变氨基酸残基位点可以继续维持，或突变回 WT rBet v1. 2801 中发现的残基。

另一实施例中构建了基于 rBet v 1 (2744) 和 rBet v1 (2628) 及 rBet v 1 (2595) 即 N28, K32, E45, P108 的半随机文库，其中在过敏原表面靶定了额外 7 个靶位点：T10, K20, Q36, E73, E87, K129 和 S149。

## 突变体

以下列出了本发明特定 Bet v 1 过敏原突变体的实例。突变的氨基酸位点用黑体小写字体显示：

Bet v 1 ("3004") (SEQ ID NO 3):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPQAIS**S**vNIEGNGGGPGTIK  
KISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNY**S**VIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPD  
GG**S**ILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYNn

Bet v 1 ("3005") (SEQ ID NO 4):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAIS**S**VENIsGNGGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNY**S**VIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPDG  
GSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYNn

Bet v 1 ("3007") (SEQ ID NO 5):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAIS**S**VENIsGNGGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNY**S**VIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKgyHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYNn

Bet v 1 ("3009") (SEQ ID NO 6):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAIS**S**VENIsGNGGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNY**S**VIEGGPIGDTLsKISNEIKIVATgD  
GG**S**ILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYNn

Bet v 1 ("3006") (SEQ ID NO 7):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAIS**S**VENIsGNGGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNY**S**VIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPDG  
GSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYgn

Bet v 1 ("3008") (SEQ ID NO 8):

GVFNvETETTSVIPAARLFKAFILDGDtLFPKVAPQAIS**S**VENIsGNGGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVdsVDHTNFKYNY**S**VIEGGPIGDTLsKISNEIKIVATgDG  
GSILKISNKYHTKgyHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYgn

**本发明还包括下述特定突变体:**

Bet v 1 ("3005-7") (SEQ ID NO 9):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N, E8S, D125Y,  
E141S, D25T, E87A, S155T, N47K, K55N.

GVFNvETsTTsvIPAARLFKAFILtGDILFPqVAPQAISsVENIsGkGGPGTIKnIS  
FPEGLPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATPDGG  
SILKISNKYHTKGyHEVKAEQVeASKEMGsTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3005-12") (SEQ ID NO 10):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N, E8S, D125Y,  
E141S, D25T, E87A, S155T, N47K, K55N, E73T, A130V, P108G, V2L.

GIFNvETsTTsvIPAARLFKAFILtGDtLFPqVAPQAISsVENIsGkGGPGTIKnIS  
FPEGLPFKYVKDRVdVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDGGs  
ILKISNKYHTKGyHEVKvEQVeASKEMGsTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3005-22") (SEQ ID NO 11):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N, T10K, K65N,  
E141N, K123I, D109N, E42S, E73T, E87A, V2L, N47K.

GIFNvETETpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISsVsNIsGkGGPGTIKKI  
SFPEGLPFnYVKDRVdVDHTtFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATPnGG  
SILKISNKYHTiGDHEVKAEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHsDAYNn

Bet v 1 ("3005-27") (SEQ ID NO 12):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, K134E, +160N, T10K, K65N,  
E141N, K123I, D109N, E42S, E73T, E87A, K119N, A130V, V2L, E8S, N47K,  
D156H, E6S.

GIFNvsTsTpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISsVsNIsGkGGPGTIKKIS  
FPEGLPFnYVKDRVdVDHTtFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATPnGGsI  
LKISNKYHTiGDHEVKAEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHShAYNn

Bet v 1 ("3007-6") (SEQ ID NO 13):

Y5V, N28T, K32S, E45S, N78K, K97S K103V, P108G, D125Y, K134E,  
+160N, E87A, E141N, K55N, N47K, S155T.

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGkGGPGTIKnl  
SFPEGLPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVKAEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3007-10") (SEQ ID NO 14):

Y5V, N28T, K32S, E45S, N78K, K97S K103V, P108G, D125Y, K134E,  
+160N, E87A, E141N, K55N, N47K, S155T, A130V, E8S, E73T, V2L.

GIFNvETsTTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGkGGPGTIKnlS  
FPEGLPFKYVKDRVDtVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDGGS  
ILKISNKYHTKGyHEVKvEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3007-17") (SEQ ID NO 15):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, P108G, D125Y, K134E,  
+160N, K65N, T10P E87A, D156H, E141N, E42S.

GVFNvETETpSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVsNIsgNGGPGTIKK  
ISFPEGLPFnYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVKAEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHShAYNn

Bet v 1 ("3007-22") (SEQ ID NO 16):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, N78K, K97S, K103V, P108G, D125Y, K134E,  
+160N, K65N, T10P E87A, D156H, E141N, E42S, A130V, E8S, N47K,  
H76T, V2L.

GIFNvETsTpSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVsNIsgkGGPGTIKKIS  
FPEGLPFnYVKDRVDEVDtTkFKYNYSVlaGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDGGS  
ILKISNKYHTKGyHEVKvEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHShAYNn

Bet v 1 ("3008-8") (SEQ ID NO 17):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N,  
K134E, N78K, E87A, K119N, E8S, K55N, E141N, N47K.

GVFNvETsTTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVENIsGkGGPGTIKnl  
SFPEGLPFKYVKDRVDsVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIKIVATgDG  
GSILKISNnYHTKGyHEVKAEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHSDAYgn

Bet v 1 ("3008-13") (SEQ ID NO 18):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N,  
K134E, N78K, E87A, K119N, E8S, K55N, E141N, N47K, S155T, E6S,  
K103V, A130V, V2L.

GIFNvsTsTTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVENIsGkGGPGTIKnlS  
FPEGLPFKYVKDRVDsVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIIVATgDGG  
SILKISNnYHTKGyHEVKvEQVeASKEMGnTLLRAVESYLLAHtDAYgn

Bet v 1 ("3008-20") (SEQ ID NO 19):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N,  
K65N, T10P, E138N, E87A, E42S, D156H, N78K.

GVFNvETETpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVsNIsGNNGPGTIKK  
ISFPEGLPFnYVKDRVDsVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIKIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVKAEQVKASKnMGETLLRAVESYLLAHShAYgn

Bet v 1 "3008-25") (SEQ ID NO 20):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E73S, E96S, P108G, D125Y, N159G, +160N,  
K65N, T10P, E138N, E87A, E42S, D156H, N78K, K119N, N47K, T77A,  
E130V, K115N.

GIFNvsTETpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVsNIsGNNGPGTIKKI  
SFPEGLPFnYVKDRVDsVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVKvEQVKASKnMGETLLRAVESYLLAHthAYgn

Bet v 1 ("3009-9") (SEQ ID NO 21):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S, P108G, +160N, K134E, N78K, E87A, K119N, E8S, K55N, E138N, E141N, S155T, N47K, E6S, K103V, A130V, V2L, R70N, D125Y.

GVFNvETsTTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVENIsGkGGPGTIKnl  
SFPEGLPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIKIVATgDG  
GSILKISNnYHTKGDHEVKAEQVvASKnMGnTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3009-15") (SEQ ID NO 22):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S, P108G, +160N, K134E, N78K, E87A, K119N, E8S, K55N, E138N, E141N, S155T, N47K, E6S, K103V, A130V, V2L, R70N, D125Y.

GIFNvsTsTTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVENIsGkGGPGTIKnlS  
FPEGLPFKYVKDnVDEVDHTkFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIvIVATgDGG  
SILKISNnYHTKGyHEVKvEQVvASKnMGnTLLRAVESYLLAHtDAYNn

Bet v 1 ("3009-22") (SEQ ID NO 23):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S, P108G, +160N, T77A, K103V, E138N, K65N, T10P, D125Y, E42S.

GVFNvETETpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVsNIsGNNGPGTIKK  
ISFPEGLPFnYVKDRVDEVDHnFKYNYSVIEGGPIGDTLsKISNEIvIVATgD  
GGSILKISNKYHTKGyHEVKAEQVKASKnMGETLLRAVESYLLAHSDAYNn

Bet v 1 ("3009-28") (SEQ ID NO 24):

Y5V, N28T, K32Q, E45S, E96S, P108G, +160N, T77A, K103V, E138N, K65N, T10P, D125Y, D156H, K119N E87A, E42S, A130V.

GVFNvETETpSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSEVsNIsGNNGPGTIKK  
ISFPEGLPFnYVKDRVDEVDHnFKYNYSVlaGGPIGDTLsKISNEIvIVATgDG  
GSILKISNnYHTKGyHEVKvEQVKASKnMGETLLRAVESYLLAHShAYNn

Bet v 1 克隆 ("3031") (SEQ ID NO 25):

GVFNVETETASVIPAAARLFNAFILDGDTLFPQVAPQAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3032") (SEQ ID NO 26):

GVFNVETETASVIPAAARLFLAFILDGDTLFPQVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDPVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3033") (SEQ ID NO 27):

GVFNVETETPSVIPAAARLFHAFILDGDTLFPQVAPKAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3034") (SEQ ID NO 28):

GVFNVETETTSVIPAAARLFHAFILDGDNLFPKVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3035") (SEQ ID NO 29):

GVFNVETETPSVIPAAARLFMAFILDGDTLFPQVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEAYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3036") (SEQ ID NO 30):

GVFNVETETPSVIPAAARLFLAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDTV DHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3037") (SEQ ID NO 31):

GVFNVETETPSVIPAAARLFQAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3038") (SEQ ID NO 32):

GVFNVETETASVIPAAARLFLAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3039") (SEQ ID NO 33):

GVFNVETETASVIPAAARLFLAFILDGDTLFPQVAPEAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVA  
TPDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEAYLLAHSHAY  
NN

Bet v 1 克隆 ("3040") (SEQ ID NO 34):

GVFNVETETPSVIPAAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVETYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 "3041") (SEQ ID NO 35):

GVFNVETETPSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3042") (SEQ ID NO 36):

GVFNVETETPSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3043") (SEQ ID NO 37):

GVFNVETETPSVIPAARLFLAFILDGDTLFPQVAPKAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3044") (SEQ ID NO 38):

GVFNVETETPSVIPAARLFLAFILDGDTLFPQVAPKAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVA  
TPDGGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVETYLLAHSHAY  
NN

Bet v 1 克隆 ("3045") (SEQ ID NO 39):

GVFNVETETPSVIPAARLFMAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 (3010) (SEQ ID NO 40)

Y5V, N28T, K32Q, E45S, K97S, P108G, +160N, E60S, T10N, K103V, K65N,  
K129N, D125Y, E42S, S149T.

GVFNVETETnSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISVSNIsgNGGPGTIKK  
ISFPsGLPFnYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVnAEQVKASKEMGETLLRAVEtYLLAHSDAYNn

Bet v 1 (3011) (SEQ ID NO 41)

Y5V, N28T, K32Q, E45S, K97S, P108G, +160N, E60S, T10N, K103V, K65N,  
K129N, D125Y, E42S, S149T, K134E, N47K, T77N, V2L.

GIFNVETETnSVIPAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISVSNIsgkGGPGTIKKI  
SFPsGLPFnYVKDRVDEVDHnNFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKGyHEVnAEQVeASKEMGETLLRAVEtYLLAHSDAYNn

Bet v 1 (3012) (SEQ ID NO 42)

Y5V, N28T, K32Q, E45S, K97S, P108G, +160N, E60S, T10N, K103V, K65N,  
K129N, D125Y, E42S, S149T, K134E, N47K, T77N, V2L, E87A, A16G,  
Q36N, E73S, D93S.

GIFNVETETnSVIPAgRLFKAFILDGDtLFPqVAPnAISVSNIsgkGGPGTIKKIS  
FPsGLPFnYVKDRVDSVDHnNFKYNYSVlaGGPIGsTLEsISNEIvIVATgDGGS  
ILKISNKYHTKGyHEVnAEQVeASKEMGETLLRAVEtYLLAHSDAYNn

## 诊断试验

此外，根据本发明的重组过敏原突变体具有诊断可能性和优点。当前领域中的过敏反应疫苗基于天然存在的过敏原来源的提取物，因而代表了多种同种型。过敏反应个体最初针对一种或多种存在的同种型过敏并产生 IgE。由于同源性及随后与使个体发生过敏反应的同种型的交叉反应性，一些同种型关于过敏反应个体的过敏反应是相关的，然而其他同种型由于不具有任何过敏反应个体对其具有特异性 IgE 的 IgE 结合抗原决定表位而不相关。由于 IgE 群体特征性的异质性，一些同种型因而可安全地给药，即它们不导致经由 IgE 的过敏反应，然而其他的同种型可能有害地导致不良的副作用。

因而，打算治疗性给药的本发明突变体和本发明组合物也可被用作体内或体外诊断测定以监控使用这种突变体或组合物进行治疗的适当性、安全性或结果。应用的诊断样品包括人体样品，如血液或血清。

因而，本发明也涉及用本发明的重组过敏原突变体或本发明的组合物来估计对个体的治疗的适当性、安全性或结果的诊断测定，其中将个体的含 IgE 样品与该突变体或该组合物混合并评估该样品中或该突变体中 IgE 之间的反应性的水平。对该样品中或该突变体中 IgE 之间的反应性的水平的评估可用任何已知的免疫测定来实施。

本发明通过以下非限制性实施例进一步地进行阐明。

### 实施例

#### 实施例 1

该实施例描述了 IgE 结合亲和力降低的重组 Bet v 1 过敏原突变体的特征。PCT/DK 01/00764 也公开了该特定突变过敏原。以下代表如何制备本发明突变体的说明性实施例。

### 山毛榉 (Fagales) 花粉过敏原中共同表位的鉴定

主要桦木花粉过敏原 Bet v 1 与来自分类学相关的树木花粉的主要过敏原具有约 90% 的氨基酸序列相同性，即，Fagales (例如榛子和角树) 和桦木花粉过敏患者对这些 Bet v 1 同源蛋白质常显示出过敏交叉反应的临床症状。

Bet v 1 也显示与某些水果（例如苹果和樱桃）和蔬菜（如芹菜和胡萝卜）中存在的过敏反应蛋白质显示出大约 50-60% 的序列相同性，且有临床证据显示 Bet v 1 和这些食物相关蛋白之间存在过敏反应交叉反应性。

另外，Bet v 1 与一组被称为病理相关蛋白质（PR-10）的植物蛋白具有明显的序列相同性（20-40%），然而对这些 PR-10 蛋白还没有过敏交叉反应性的报道。

分子模型表明山毛榉目（Fagales）和食品过敏原及 PR-10 蛋白质的结构与 Bet v 1 的结构近似相同。

过敏反应性 Bet v 1 交叉反应性的结构基础在（Gajhede 等，1996，文献 17）中报道，因此，识别 Bet v 1 上这些区段的任何 IgE 可与其它山毛榉目主要花粉过敏原发生交叉反应并与其结合，产生过敏反应症状。

#### 选择氨基酸残基用于定点诱变

用于定点突变的氨基酸残基选自 Bet v 1 上的表面暴露残基。根据它们的原子坐标计算各氨基酸残基的相对定位和溶剂暴露百分数。具有较低溶剂暴露程度（<20%）的残基由于可能会破坏结构或缺乏抗体相互作用而被视为与诱变无关。剩下的残基根据其溶剂暴露程度进行排序。

#### 序列对比

与所述序列（Bet v 1 No. 2801，WHO IUIS 过敏原命名小组委员会）同源的序列通过 BLAST 检索得自 GenBank 和 EMBL 序列数据库（Altschul 等，文献 18）。考虑 BLAST 报道概率小于 0.1 的所有序列，将含无冗余序列的同源序列制成列表。通过 CLUSTAL W（Higgins 等，文献 19）进行序列对比，针对全部序列或仅分类学上有亲缘关系的种类计算序列中各位置的相同百分数。总共有 122 个序列与 Bet v 1 No. 2801 同源，其中 57 个序列来自分类学相关的种类。

#### 克隆编码 Bet v 1 的基因

通过酚提取和 LiCl 沉淀从白桦（*Betula verrucosa*）花粉

(Allergon, Sweden) 制备 RNA。在微量离心管中分批进行寡聚 (dT)-纤维素亲和层析, 使用市售试剂盒 (Amersham) 合成双链 cDNA。编码 Bet v 1 的 DNA 经 PCR 扩增和克隆。简单地说, 使用 cDNA 作模板, 和设计成与分别相应于 Bet v 1 氨基端和 3'-非翻译区位置的 cDNA 序列匹配的引物进行 PCR。引物在 5'端延伸以提供限制性位点 (NcoI 和 HindIII) 用于定向克隆进 pKK233-2。

#### 亚克隆进 pMAL-c

编码 Bet v 1 的基因随后被亚克隆进麦芽糖结合蛋白融合载体 pMAL-c (New England Biolabs) 中。PCR 扩增基因并与 male 符合读框地亚克隆以产生麦芽糖结合蛋白 (MBP)-Bet v 1 蛋白融合操纵子, 其中 MBP 和 Bet v 1 由因子 Xa 蛋白酶裂解位点分开, 该裂解位点所处位置使得在裂解后可恢复 Bet v 1 真正的氨基端序列, 如文献 15 所述。简单地说, 使用插入了 Bet v 1 的 pKK233-3 作模板, 分别相应于该蛋白质氨基和羧基端的引物进行 PCR。启动子近端引物在 5'端延伸以包含编码符合读框的因子 Xa 蛋白酶裂解位点的 4 个密码子。两个引物均在 5'端进一步延伸以包含限制性位点 (KpnI) 用于克隆。使用 20 个循环的 PCR 亚克隆编码 Bet v 1 的基因以降低 PCR 假象的频率。

#### 体外诱变

使用带有 Bet v 1 插入片段的重组 pMAL-c 作模板经 PCR 进行体外诱变。各突变的 Bet v 1 基因使用 4 个引物经 3 个 PCR 反应产生。下述突变实例是根据现有技术 PCT/DK 01/00764。本发明的突变体可以类似方式制备并测试。

合成 2 个包含每个突变的突变特异性寡核苷酸引物, 每条引物针对一条 DNA 链, 见图 3 和 4。以突变的核苷酸作起点, 两条引物均在 5'-端延伸 7 个核苷酸, 在 3'-端延伸 15 个核苷酸。延伸的核苷酸在序列上与 Bet v 1 基因实际区域相同。

还合成了两个通用引物 (在图 4 中称为“全有义”和“全无义”) 并用于所有突变体。这些引物长 15 个核苷酸, 在序列上与 pMAL-c 载

体中 Bet v 1 上游和下游大约 1 千碱基对处区域的序列相应。上游引物的序列来自有义链，下游引物的序列来自无义链，见图 4。

除了只进行 20 个温度循环以减少 PCR 假象的频率以外，基本上按照标准方法 (Saiki 等, 1988, 文献 20) 进行 2 个独立的 PCR 反应。各 PCR 反应使用插入了 Bet v 1 的 pMAL-c 作模板，以及一个突变特异引物和一个通用引物所形成的有意义组合。

按照上面所述的逐步方法在突变体中导入 4 个氨基酸取代 (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly)。分别使用插入了 Bet v 1 第 2801, Bet v 1 (Glu45Ser), Bet v 1 (Glu45Ser, Pro108Gly) 的 pMAL-c 作模板，首先导入 Glu45Ser 突变，然后导入 Pro108Gly 突变，最后导入 Asn28Thr, Lys32Gln 突变。

经过琼脂糖凝胶电泳并电洗脱，随后乙醇沉淀纯化 PCR 产物。使用来自前两次 PCR 反应的混合 PCR 产物作模板和 2 个通用引物进行第 3 次 PCR 反应。同样，使用 20 个循环的标准 PCR。经琼脂糖凝胶电泳和电洗脱，随后进行乙醇沉淀纯化 PCR 产物，用限制性酶 (Bs/WI/EcoRI) 切割并定向连接进用相同限制性酶消化的插入了 Bet v 1 的 pMAL-C 中。

图 5 显示了所有 9 个 Bet v 1 突变的概述，这 9 个突变如下：Thr10Pro, Asp25Gly, Asn28Thr + Lys32Gln, Glu45Ser, Asn47Ser, Lys55Asn, Glu60Ser, Thr77Ala 和 Pro108Gly。还制备了具有 4 处突变的另外一个突变体 (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108my)。其中，选择 5 个突变体用于进一步的试验：Asn28Thr +Lys32Gln, Glu45Ser, Glu60Ser, Pro108Gly 和 Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly 突变体。

### 核苷酸测序

亚克隆之前、之后和体外诱变之后分别对 Bet v 1 编码基因的核苷酸序列进行了测定。

将 10ml 来自在补充了 0.1g/l 氨卞青霉素的 LB 培养基中过夜培养至饱和的细菌培养物的质粒 DNA 用 Qiagen-tip 20 柱纯化，并按照厂

商的建议使用 Sequenase version 2.0 DNA 测序试剂盒 ( USB ) 测序。

### 重组 Bet v 1 和突变体的表达与纯化

融合到麦芽糖结合蛋白上的重组 Bet v 1 ( Bet v 1 第 2801 和突变体 ) 在大肠杆菌 DH 5 a 中过表达并按文献 15 所述纯化。简单地说, 重组大肠杆菌细胞在 37 °C 下生长至 436nm 下光密度为 1.0, 此时加入 IPTG 诱导 Bet v 1 融合蛋白表达。诱导后 3 小时离心收获细胞, 重悬于裂解缓冲液中并经超声处理破碎。超声处理和再次离心后, 经淀粉亲和色谱分离重组融合蛋白并随后经过与因子 Xa 温育裂解(文献 15)。因子 Xa 裂解后, 经凝胶过滤分离重组 Bet v 1, 如果有必要, 进行另一轮淀粉亲和色谱以去掉痕量的麦芽糖结合蛋白。

重组 Bet v 1 经超滤浓缩纯化至大约 5mg/ml 并贮存于 4°C。纯化的重组 Bet v 1 制品的最终产率为每升大肠杆菌细胞培养物 2-5mg。

纯化的重组 Bet v 1 制品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳银染后出现具有 17.5kDa 表观分子量的单一带, N-端测序显示出来自 cDNA 核苷酸序列的预期序列, 定量氨基酸分析显示出预期的氨基酸组成。

我们以前已表明(文献 15)重组 Bet v 1 第 2801 与天然存在的 Bet v 1 在免疫化学上不可区别。

### 使用兔多克隆抗体的免疫电泳

以重组 Bet v 1 蛋白的形式产生了 7 种突变体 Bet v 1 并按上文所述纯化, 试验其与针对从桦木花粉分离的 Bet v 1 产生的多克隆兔抗体的反应性。当在非变性条件下免疫电泳(火箭免疫电泳)分析时, 兔抗体能沉淀所有的突变体, 表明这些突变体具有保守的  $\alpha$ -碳原子三级结构。

为了分析对人多克隆 IgE-反应的影响, 选择突变体 Glu45Ser, Pro108Gly, Asn28Thr + Lys32Gln 和 Glu60Ser 进行进一步的分析。

### Bet v 1 Glu45Ser 突变体

在 45 位的谷氨酸显示高度溶剂暴露性(40%)。在一些 Bet v 1 同源的 PR-10 蛋白质中发现丝氨酸残基占据位置 45, 表明谷氨酸可被丝氨酸取代而不会破坏  $\alpha$ -碳骨架的三级结构。另外, 由于没有一个已

知的山毛榉目过敏原序列在位置 45 具有丝氨酸,因此用丝氨酸取代谷氨酸产生非天然存在的 Bet v 1 分子。

#### 使用重组 Glu45Ser Bet v 1 突变体进行 T 细胞增殖试验

按 Spangfort 等, 1996a 所述进行分析。发现重组 Bet v 1 Glu45Ser 突变体能诱导来自 3 种不同桦木花粉过敏患者的 T 细胞系增殖, 其刺激指数相似于重组的和天然存在的过敏原。

#### 重组 Glu45Ser Bet v 1 的结晶和结构测定

基本上按 ( Spangfort 等 1996b, 文献 21 ) 所述在 25°C 经蒸气扩散形成重组 Glu45Ser Bet v 1 晶体。5mg/ml 浓度的 Glu45Ser Bet v 1 与等体积的 2.0M 硫酸铵, 0.1M 柠檬酸钠, 1% (V/V) 的二氧杂环己烷, pH6.0, 混合, 并用 100 倍体积的 2.0M 硫酸铵, 0.1M 柠檬酸钠, 1% (V/V) 的二氧杂环己烷, pH6.0 平衡。平衡 24 小时后, 使用重组野生型 Bet v 1 晶体作晶种来源, 应用文献 21 所述的加晶种技术诱导晶体生长。

大约 2 个月后, 收获晶体并按文献 21 所述使用 Rigaku 旋转正极产生的 X-射线进行分析, 使用分子取代解析结构。

#### Bet v 1 Gln45Ser 突变体的结构

通过 3 维生长 Bet v 1 Glu45Ser 蛋白晶体来解析突变对结构的影响, 该晶体当用旋转正极产生的 X-射线分析时分衍射出分辨率为 3.0Å, 以 Bet v 1 Glu45Ser 结构电子密度图证实在 45 位的谷氨酸取代成丝氨酸, 该电子密度图也显示总体  $\alpha$  碳骨架三级结构是保守的。

#### Bet v 1 Gln45Ser 突变体的 IgE 结合特性

使用来自桦木过敏反应患者血清 IgE 库进行液相 IgE-抑制试验, 比较 Bet v 1 Glu45Ser 突变体与重组 Bet v 1 的 IgE 结合特性。

以 1: 5 的摩尔比 ( Bet v 1 第 2801: 生物素 ) 用生物素标记重组 Bet v 1 第 2801。抑制试验按下述方法进行: 血清样品 ( 25 $\mu$ l ) 与固相抗 IgE7 保温, 洗涤, 重悬并进一步与生物素标记的 Bet v 1 第 2801 ( 3.4nM ) 和给定突变体 ( 0-28.6nM ) 的混合物保温。根据与吡啶酯标记的链霉抗生素蛋白保温后测定的 RLU 评价结合到固相上

的生物素标记的 Bet v 1 第 2801 的量。以使用缓冲液和突变体作抑制剂获得的 RLU 之间的比率计算抑制的程度。

图 6 显示了由无生物素标记的 Bet v 1 和由 Bet v 1 Glu45Ser 突变体对生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者血清 IgE 的结合的抑制。

对血清库中存在的血清 IgE 的结合达到 50% 抑制所需的各重组蛋白的量有明显的区别。重组 Bet v 1 在大约 6.5ng 达到 50% 的抑制, 而 Bet v 1 Glu45Ser 突变体的相应浓度是大约 12ng。这说明在 Bet v 1 Glu45Ser 突变体中导入的点突变将对特异性血清 IgE 的亲合性大约降低了 2 倍。

用 Bet v 1 Glu45Ser 突变体所达到的最大抑制水平比重组 Bet v 1 明显更低。这表明 Glu45Ser 取代后, 存在于血清库中的一些特异性 IgE 不能识别 Bet v 1 Glu45Ser 突变体。

#### Bet v 1 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln

28 位和 32 位的天冬氨酸和赖氨酸分别显示出高度的溶剂暴露性 (分别为 35% 和 50%)。在结构上, 天冬氨酸 28 和赖氨酸 32 在分子表面上互相靠近, 且最有可能通过氢键相互作用。在一些 Bet v 1 同源性 PR-10 蛋白质中发现苏氨酸和谷氨酸残基分别占据位置 28 和 32, 表明天冬氨酸和赖氨酸可分别被苏氨酸和谷氨酸所取代而不破坏  $\alpha$ -碳骨架三级结构。另外, 由于没有一个天然存在的同种过敏原序列分别在 28 和 32 位具有苏氨酸和谷氨酸, 因此这种取代产生了天然不存在的 Bet v 1 分子。

#### Bet v 1 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 的 IgE 结合特性

使用上文所述来自桦木过敏反应患者血清 IgE 库在液相 IgE 抑制试验中比较突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 与重组 Bet v 1 的 IgE 结合特性。

图 7 显示了由非生物素标记的 Bet v 1 和由 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 对生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者血清 IgE 的结合的抑制作用。

对血清库中存在的血清 IgE 的结合达到 50% 抑制作用所需的各重组蛋白质的量有明显的区别。重组 Bet v 1 在大约 6.5ng 时达到 50% 的抑制，而 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 的相应浓度是大约 12ng。这表明 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 中导入的点突变将对特异性血清 IgE 的亲和力降低了大约 2 倍。

用 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln 突变体达到的最大抑制水平与重组 Bet v 1 相比明显更低。这可能表明 Asn28Thr + Lys32Gln 取代后，一些存在于血清库中的特异性 IgE 不能识别 Bet v 1 突变体 Asn28Thr + Lys32Gln。

#### Bet v 1 突变体 Pro108Gly

位置 108 的脯氨酸显示出高度的溶剂暴露性 (60%)。在一些 Bet v 1 同源的 PR-10 蛋白中发现甘氨酸残基占据 108 位，这表明脯氨酸可被甘氨酸取代而不破坏  $\alpha$ -碳原子三级结构。另外，由于没有一个天然存在的同种过敏原序列在 108 位具有甘氨酸，因此用甘氨酸取代脯氨酸产生了非天然存在的 Bet v 1 分子。

#### Bet v 1 突变体 Pro108Gly 的 IgE 结合特性

使用上述来自桦木过敏反应患者的血清 IgE 库在液相 IgE-抑制试验中比较 Bet v 1 Pro108Gly 突变体与重组 Bet v 1 的 IgE-结合特性。

图 8 示了由非生物素标记的 Bet v 1 和由 Bet v 1 Pro108Gly 突变体对生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者血清 IgE 的结合的抑制作用。

对血清库中存在的血清 IgE 的结合达到 50% 抑制所需的各重组蛋白质的量有明显的区别。重组 Bet v 1 在大约 6.5ng 时达到 50% 的抑制，而 Bet v 1 Pro108Gly 的相应浓度为 15ng。这表明在 Bet v 1 Pro108Gly 中导入的单个点突变降低了对特异性血清 IgE 的亲和性大约 2 倍。

与重组 Bet v 1 相比，Bet v 1 Pro108Gly 突变体达到的最大抑制水平有一定程度的降低。这可能表明，Pro108Gly 取代后，血清库中存在的一些特异性 IgE 不能识别 Bet v 1 Pro108Gly 突变体。

### Bet v 1 突变体 Glu60Ser

位置 60 的谷氨酸显示出高度的溶剂暴露性 (60%)。在一些 Bet v 1 同源的 PR-10 蛋白中发现丝氨酸残基占据 60 位, 这表明谷氨酸可被丝氨酸取代而不破坏  $\alpha$ -碳原子三级结构。另外, 由于没有一个天然存在的同种过敏原序列在 60 位具有丝氨酸, 因此用丝氨酸取代谷氨酸可产生非天然存在的 Bet v 1 分子。

### Bet v 1 突变体 Glu60Ser 的 IgE 结合特性

使用上述来自桦木过敏反应患者的血清 IgE 库在液相 IgE-抑制试验中比较 Bet v 1 Glu60Ser 突变体与重组 Bet v 1 的 IgE-结合特性。

图 9 显示了由非生物素标记的 Bet v 1 和由 Bet v 1 Glu60Ser 突变体对生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者血清 IgE 的结合的抑制作用。与 Glu45Ser, Pro108Gly 和 Asn28Thr + Lys32Gln 突变体相反, 谷氨酸 60 取代成丝氨酸对其 IgE-结合特性没有显示任何明显的影响。

### Bet v 1 Glu45Ser, Asn28Thr+Lys32Gln 和 Pro108Gly 突变体的结构分析

以圆二色性 (CD) 谱学分析纯化蛋白的结构完整性。图 10 显示了在接近等浓度时记录的重组突变体和重组天然蛋白的 CD 光谱。两个重组蛋白 CD 光谱的峰振幅和位置重叠, 表明两制品含有等量的二级结构, 这有力地表明  $\alpha$ -碳原子三级结构不受导入的氨基酸取代的影响。

### Bet v 1 Glu45Ser, Asn28Thr+Lys32Gln 和 Pro108Gly 突变体的 IgE 结合特性

使用上文所述来自桦木过敏反应患者的血清 IgE 库在液相 IgE 抑制试验中比较突变体与重组 Bet v 1 的 IgE 结合特性。

图 11 显示了由非生物素标记的 Bet v 1 和由 Bet v 1 突变体对生物素标记的重组 Bet v 1 与过敏反应患者血清 IgE 的结合的抑制作用。与本文所述的单一突变体相反, 突变体的抑制曲线不再与重组体相似。这表明, 与重组体相比, 突变体中导入的取代改变了 IgE 结合

特性和表位情况。缺乏相似性使得难以定量评估突变体与特异性血清 IgE 亲和性的降低。

重组 Bet v 1 在大约 6ng 达到 50% 抑制，而 Bet v 1 突变体 (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly) 的相应浓度是 30ng，即亲和性降低 5 倍。然而，为了达到 80% 抑制，相应的值分别是 20ng 和 400ng，即降低 20 倍。

#### 使用重组 Bet v 1Glu45Ser, Asn28Thr+Lys32Gln 和 Pro108Gly 突变体的 T 细胞增殖试验

按文献 15 所述进行分析。发现重组 Bet v 1 突变体能以与重组和天然存在 Bet v 1 相似的刺激指数诱导来自三种不同桦木花粉过敏反应患者的 T 细胞系增殖。这表明突变体可启动抗体产生所必需的细胞免疫应答。

#### 实施例 2

#### 本发明突变体的体外诱变

使用插入了 Bet v 1 的重组 pMAL-c 作为模板进行 PCR，实现体外诱变。重组突变过敏原的制备包括两个 PCR 步骤：步骤 I 和 II。首先，使用包含各突变的正义和反义突变特异性寡核苷酸引物，和包含上游或下游邻近突变或 Bet v 1 N 末端/C 末端的正义和反义寡核苷酸引物，将每个单独突变（如果在 DNA 序列中定位很紧密，也可为几个突变）导入 Bet v 1. 2801 衍生物连续 DNA 序列内，即 Bet v 1 (2595) 或 Bet v 1 (2628) 或 Betv 1 (2733)，分别如图 12 (I) 所示。其次，纯化 PCR 反应 I 的 PCR 产物，混合，作为模板，与含有 Bet v 1 N 末端/C 末端的寡核苷酸引物一起进行另一 PCR 反应 (II)，如图 13 (II) 所示。琼脂糖凝胶电泳，PCR 凝胶纯化 (Life Technologies)，然后乙醇沉淀纯化该 PCR 产物，用限制性酶 (SacI/EcoRI) 或 (SacI/XbaI) 切割并定向连接进用相同限制性酶消化的 pMAL-c 中。

图 13 显示了合成的寡核苷酸引物以及 Bet v 1 突变体的构建示意图。下述 Bet v 1 突变体被克隆并测序（核酸分子的测序在实施例 1 中描述）：

Bet v 1 (3004)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDNLFPKVAPQAISSVsNIEGNGGPGTIK  
KISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPD  
GGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYNn

Bet v 1 (3005)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGNGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPDG  
GSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYNn

Bet v 1 (3007)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGNGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATgDG  
GSILKISNKYHTKgyHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYNn

Bet v 1 (3009)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGNGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTNFKNYSVIEGGPIGDTLsKISNEIKIVATgD  
GGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYNn

Bet v 1 (3006)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPqVAPQAISSVENIsGNGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDEVDHTkFKYNYSVIEGGPIGDTLEsISNEIvIVATPDG  
GGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVeASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYgn

Bet v 1 (3008)

GVFNvETETTSVIPAAARLFKAFILDGDtLFPkVAPQAISSVENIsGNGGPGTIKK  
ISFPEGfPFKYVKDRVDSVDHTNFKNYSVIEGGPIGDTLsKISNEIKIVATgDG  
GGSILKISNKYHTKgyHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHS DAYgn

### 根据本发明制备的其他突变体

向 Bet v 1 突变体中导入多个点突变可以潜在地破坏分子的  $\alpha$  碳骨架折叠模式。导入随机氨基酸取代会提高形成稳定 Bet v 1 突变体分子的机会。因此我们构建了含有 Bet v 1 突变体的 Bet v 1 突变体文库，所述突变体带有 17-20 个点突变，其中有 7 个位点是随机的氨基酸取代。该文库含有上百个不同的克隆。被称为 Bet v 1 (3031)-(3045) 的 15 个 Bet v 1 突变体获自这个使用简并寡核苷酸引物生成的 Bet v 1 突变体文库。这些引物在 Bet v 1 的 T10, K20, Q36, E73, E87, K129 和 S149 位点含有随机氨基酸残基取代(图 14 和 15)。这些位点并不会覆盖已经导入 Bet v 1 (3002) 和 Bet v 1 (2595) 中的点突变，所述 Bet v 1 (3002) 和 Bet v 1 (2595) 用作 DNA 模板用于进行定点突变 PCR 反应，如图 15 所示。

克隆过程与图 12 所示相同，只是在第一轮 PCR 中所用的引物在特定位点被简并，这些位点在图 15 中用 G, C, T 或 A 之外的字母表示。G, C, T 或 A 之外的字母表示该引物在这些位点含有几种不同的核苷酸。制备了 8 种覆盖 Bet v 1 基因的 PCR 产物，并在第一轮 PCR 中纯化，然后使用末端引物 (3076s 和 3067a) 在第二轮 PCR 中进行组装，其中使用来自第一轮 PCR 的 8 种产物作为模板。

如同对 Bet v 1 3004, 3005, 3007 和 3007 突变体所述，对 Bet v 1 突变体 3031-3045 进行 DNA 测序，以鉴定导入点突变的数目和性质：

Bet v 1 克隆("3031") (SEQ ID NO 25):

GVFNVETETASVIPAARLFNAFILDGDTLFPQVAPQAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3032") (SEQ ID NO 26):

GVFNVETETASVIPAARLFLAFILDGDTLFPQVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDPVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3033") (SEQ ID NO 27):

GVFNVETETPSVIPAARLFHAFILDGDTLFPQVAPKAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIEGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3034") (SEQ ID NO 28):

GVFNVETETTSVIPAARLFHAFILDGDNLFQVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3035") (SEQ ID NO 29):

GVFNVETETPSVIPAARLFMAFILDGDTLFPQVAPPAISVSNSISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEAYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3036") (SEQ ID NO 30):

GVFNVETETPSVIPAAARLFLAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDTVHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3037") (SEQ ID NO 31):

GVFNVETETPSVIPAAARLFQAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3038") (SEQ ID NO 32):

GVFNVETETASVIPAAARLFLAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3039") (SEQ ID NO 33):

GVFNVETETASVIPAAARLFLAFILDGDTLFPQVAPEAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDGVDHTNFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVA  
TPDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEAYLLAHSHAY  
NN

Bet v 1 克隆 ("3040") (SEQ ID NO 34):

GVFNVETETPSVIPAAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDSVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLEISISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVETYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆 ("3041") (SEQ ID NO 35):

GVFNVETETPSVIPAAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3042") (SEQ ID NO 36):

GVFNVETETPSVIPAAARLFKAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVERYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3043") (SEQ ID NO 37):

GVFNVETETPSVIPAAARLFLAFILDGDTLFPQVAPKAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVDRVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEPYLLAHSHAYN  
N

Bet v 1 克隆("3044") (SEQ ID NO 38):

GVFNVETETPSVIPAAARLFLAFILDGDTLFPQVAPKAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVGDVDHTKFKYNYSVIGGGPIGDTLESISNEIVIVA  
TPDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVETYLLAHSHAY  
NN

Bet v 1 克隆("3045") (SEQ ID NO 39):

GVFNVETETPSVIPAAARLFMAFILDGDNLFPKVAPPAISSVSNISGNGGPGTI  
KKISFPEGLPFNYVKDRVGDVDHTKFKYNYSVIDGGPIGDTLESISNEIVIVAT  
PDGGSILKISNKYHTIGDHEVEAEQVEASKEMGETLLRAVEGYLLAHSHAYN  
N

### 实施例 3

#### 鉴定和筛选用于取代的氨基酸

用溶剂可接近性和保守程度参数来确定和选择适合于对过敏原 Bet v 1、Der P 2 和 Ves v 5 进行替换的表面暴露的氨基酸。

#### 溶剂可接近性

溶剂可接近性用软件 InsightII 版本 97.0 (MSI) 和 1.4Å 的探测半径 (Connolly Surface) 来计算。

通过使用软件 PASS (推定的球体活性位点) 以探针充满而从分析中排除内部腔。随后手动去除表面的探针。

#### 保守性

##### Bet v 1

3-D 结构基于登录号 Z80104 (1bv1.pdb)。

包括在保守残基分析中的 38 个其他的 Bet v 1 序列包含登录号:

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.

##### Bet v 1

59 个高度溶剂暴露的氨基酸:

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.

### 57 个高度溶剂暴露并保守 (> 70%) 的氨基酸:

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-154, N-43, A-106, K-115, P-14, Y-5, K-137, E-141, E-87, E-73.

表 1 是以降序显示 Bet v 1 氨基酸溶剂暴露程度的列表。第 1 列列出了起始于氨基末端的氨基酸号码, 第 2 列以单字母缩写列出了氨基酸, 第 3 列列出标准化的溶剂暴露指数, 第 4 列列出已知序列在该位置具有保守氨基酸的百分比数。

表 1 : Bet v 1

NO	AA	Solv_ex	Cons %
		p	
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
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
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
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

#### 实施例 4

该实施例描述重组 Bet v 1 过敏原突变体的制备和特征，这些突变体带有多于 4 个突变，并且具有与现有技术 PCT/DK 01/00764 相比降低的 IgE 结合亲和力。本发明的突变体被相应制备和测试。

##### 用于 Bet v 1 定点突变的氨基酸残基的选择

按实施例 1 所述选择氨基酸残基。

##### 体外诱变

体外诱变用插入了 Bet v 1 的重组 pMAL-c 作为模板通过 PCR 来进行。包含 5~9 个一级突变的重组过敏原突变体的制备包括两个 PCR 步骤：步骤 I 和 II。首先，使用包含各突变的正义和反义突变特异性寡核苷酸引物，和包含上游或下游邻近突变或 Bet v 1 N 末端/C 末端的正义和反义寡核苷酸引物，将每个单独突变（如果在 DNA 序列中定位很紧密，也可为几个突变）导入 Bet v 1. 2801 或 Bet v 1. 2801 衍生物的连续 DNA 序列内，分别如图 15 (I) 所示。其次，纯化 PCR 反应 I 的 PCR 产物，混合，作为模板，用含有 Bet v 1 的 N 末端/C 末端的寡核苷酸引物一起进行另一 PCR 反应 (II)，如图 15 (II) 所示。琼脂糖凝胶电泳，PCR 凝胶纯化 (Life Technologies)，然后乙醇沉淀纯化该 PCR 产物，用限制性酶 (Sacl/EcoRI) 或 (Sacl/XbaI) 切割并定向连接进用相同限制性酶消化的 pMAL-c 中。

图 16 表示合成的寡核苷酸引物和具有大于 4 个一级突变的 Bet v 1 突变体的构建示意图。突变的氨基酸优选地选自特征在于如实施例 3 所述具有高度溶剂暴露和保守性的氨基酸。Bet v 1 突变体如下：

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

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

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

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

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

#### 重组 Bet v 1 和突变体的核苷酸测序及表达和纯化

重组蛋白的测序和表达如实施例 1 所述进行。

#### Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体

图 17 显示了在 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 分子表面导入的点突变。

#### 重组 Bet v 1 (2628) 突变蛋白的结晶和结构确定。

结构确定如实施例 1 所述进行。

#### Bet v 1 (2628) 突变体的结构

突变的结构作用通过生长三维 Bet v 1 (2628) 蛋白质晶体而解析, 当用旋转阳极生成的 X-射线进行分析时该晶体衍射为 2.0Å 的分辨率。Tyr5Val、Gln45Ser、Lys65Asn、Lys97Ser、Lys134Glu 取代通过 Bet v 1 (2628) 的结构电子密度图证实, 该图也显示总的  $\alpha$ -碳骨架三级结构是保守的。

#### Bet v 1 (2637) 突变体的结构分析

纯化的 Bet v 1 (2637) 突变体的结构完整性用圆二色 (CD) 谱分析。图 18 显示以近乎相同的浓度记录的重组 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2637) 突变体的 CD 谱。来自 2 个重组蛋白质的 CD 谱中峰幅和位置的交迭显示这 2 种制备物含有相同量的二级结构, 这强有力地暗示  $\alpha$ -碳骨架三级结构没有受到氨基酸替换引入的影响。

#### Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体的 IgE 结合特性

在液相 IgE 抑制测定中比较 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 以及 Bet v 1 (2628) 与 Bet v 1 (2637) 的 1:1 混合物同重组野生型 Bet v 1.2801 的 IgE 结合性质, 该测定使用衍生自桦木过敏反应患者的血清 IgE 库。

如在实施例 1 中所述, 重组 Bet v 1.2801 以摩尔比为 1: 5 进行生物素化 (Bet v 1 第 2801: 生物素)。抑制测定如下进行: 将血清样品 (25 $\mu$ l) 与固相抗 IgE 温育, 洗涤, 重悬并进一步同生物素化的 Bet v 1.2801 和给定的突变体或两种突变体的 1: 1 混合物温育。根据与吡啶酯标记的链霉抗生素蛋白保温后测定的 RLU 评价结合到固相上的生物素标记的 Bet v 1.2801 的量。以使用缓冲液和突变体作抑制剂获得的 RLU 之间的比率计算抑制的程度。

图 19 表示由非生物素化的 Bet v 1.2801 和由 Bet v 1 (2628)、Bet v 1 (2637) 以及 Bet v 1 (2628) 与 Bet v 1 (2637) 的 1: 1 混合物对生物素化的重组 Bet v 1.2801 与来自过敏反应患者库的血清 IgE 的结合的抑制作用。

对血清库中存在的血清 IgE 的结合达到 50% 抑制所需的各重组蛋白的量有明显的区别。重组 Bet v 1.2801 在大约 5ng 达到 50% 的抑制, 而 Bet v 1 (2628) 突变体的相应浓度是大约 15-20ng。这说明在 Bet v 1 (2628) 突变体中导入的点突变将对特异性血清 IgE 的亲合性大约降低了 3-4 倍。

用 Bet v 1 (2628) 突变体所达到的最大抑制水平比重组 Bet v 1.2801 明显更低。这表明导入点突变后, 存在于血清库中的一些特异性 IgE 不能识别 Bet v 1 (2628) 突变体。

Bet v 1 (2637) 在约 400-500 ng 达到 50% 的抑制, 显示在 Bet v 1 (2637) 突变体中引入的点突变使其与 Bet v 1.2801 相比将对特异血清 IgE 的亲合力降低了 80-100 倍。在 IgE 结合中的巨大差异进一步由 Bet v 1.2801 抑制曲线与 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质抑制曲线相比后所得的显著倾角差别所支持。不同的倾角提供证据表明 IgE 结合的减少归因于该突变体 (与 Bet v 1.2801 相比) 截然不同的表位模式。

除用单独修饰的过敏原进行抑制测定之外, 对分别与 Bet v 1 (2628) 或 Bet v 1 (2637) 的样品具有等摩尔浓度的 Bet v 1 的 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 的 1: 1 混合物进行检验, 它们显示

能彻底抑制 rBet v 1.2801 对 IgE 的结合 (100%)。彻底抑制 IgE 结合的能力清楚表明所有存在于 Bet v 1.2801 上的活性表位也存在于 1:1 的过敏原混合物中。进一步的证明来自 Bet v 1.2801 和过敏原混合物两种抑制曲线的相当的倾角。混合的过敏原样品减少的 IgE 反应性通过为得到 50% 的 IgE 结合抑制需要比 Bet v 1.2801 时高 4 倍浓度的过敏原混合物来证明。

#### 用突变的重组 Bet v 1 过敏原进行 T 细胞增殖测定

该分析如参考文献 15 所述方法进行。Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 两者均能够诱导来自桦木花粉过敏患者中的 T 细胞系的增殖, 其刺激指数与重组体和天然存在的情况相似。这表明 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质均能起始对抗体生产所必需的细胞免疫反应。

#### 人嗜碱性粒细胞的组胺释放测定

嗜碱性白细胞组胺释放如下进行。从每个桦木花粉过敏患者取肝素化的血液 (20ml), 贮存于室温, 并在 24 小时内使用。将 25 微升肝素化的全血置于玻璃纤维覆盖的微量滴定孔中 (Reference Laboratory, Copenhagen, 丹麦) 并与 25 微升的过敏原或抗 IgE 于 37°C 温育 1 小时。然后漂洗平板并去除干扰物质。最后, 结合到微纤维上的组胺进行荧光分光光度测量。

#### Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质的组胺释放性质

组胺释放的数据在图 20 和图 21 中显示。测定了 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质在来自两个桦木花粉过敏患者的人嗜碱性粒细胞中诱导组胺释放的潜能。与 Bet v 1.2801 的释放曲线相比, 两种突变过敏原的释放曲线都明显地右移。该移动表明 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 的潜能减少了 3~10 倍。

#### 突变体 Bet v 1 (2744) 和突变体 Bet v 1 (2753)

同样构建了 Bet v 1 (2744) 和 Bet v 1 (2753) 突变体用作混合过敏原疫苗。如图 22 和 23 所示, 在这些突变过敏原中, 点突变被调

整分布于整个表面, 并还分别在两个分子中被设计为影响不同的表面, 如图 24 所示。然而, 这些修饰的过敏原也可单独用作单一过敏原疫苗。

#### Bet v 1 (2744) 突变体蛋白的结构分析

纯化的 Bet v 1 (2744) 突变体的结构完整性用圆二色 (CD) 谱分析。图 25 显示以近乎相同的浓度记录的重组 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2744) 突变体的 CD 谱。来自 2 个重组蛋白质的 CD 谱中峰幅和位置的交迭显示 2 种制备物含有相同量的二级结构, 这强有力地表明  $\alpha$ -碳骨架三级结构没有受到导入的氨基酸取代的影响。

#### Bet v 1 (2744) 的组胺释放性质

从来自 5 种不同花粉过敏患者的嗜碱性白细胞的 5 个实验中得来的组胺释放数据在图 26 和图 27A-D 中显示。测定了 Bet v 1 (2744) 突变体蛋白质在人嗜碱性粒细胞中诱导组胺释放的潜能。与 Bet v 1.2801 的释放曲线相比, 突变过敏原的释放曲线明显地右移。该移动表明 Bet v 1 (2744) 的潜能减少了 3~5 倍。

#### 突变体 Bet v 1 (2733)

构建并重组表达了突变体 Bet v 1 (2733)。Bet v 1 (2733) 突变体中点突变的分布保留了几个  $> 400\text{\AA}^2$  的表面区域未被改变。图 28 表示在 Bet v 1 (2733) 分子表面引入的点突变。

#### 实施例 5

该实施例描述重组 Bet v 1 过敏原突变体的特征, 这些突变体带有多于 4 个突变, 并且具有与现有技术 PCT/DK 01/00764 相比降低的 IgE 结合亲和力。本发明的突变体被相应制备和测试。

#### 重组和突变 Bet v 1 的 T 细胞反应性

##### 目的

通过增殖和细胞因子产量研究突变过敏原的体外 T 细胞反应。

##### 方法:

在下述研究中使用来自过敏患者的 PBL (外周血淋巴细胞)。

为了维持 T-细胞所呈递的 bet v 1 同种型的种类, 用天然纯化的 bet v 1 从 PBL 建立了 8 个 bet v 1 特异性 T 细胞系, 如以前公开的方

法所述(26)。

用桦木提取物(Bet v 1)、天然纯化的 bet v 1 (nBet v 1)、重组 Bet v 1 (rBet v 1 或 wt; 27) 和 rBet v 1 的 4 种不同突变体(在别处所述): 2595、2628、2637、2744、2773 刺激 10 个 PBL 和 8 个 T-细胞系。随后发现 2637 突变体部分解折叠, 将不予讨论。

简单说: 在一个 96 孔圆底平板上每孔加入  $2 \times 10^5$  的 PBL。以 3 种不同浓度一式四份加入不同的桦木样品并使其生长 6 天。在第 6 天, 收获具有最高浓度桦木的各孔的半数体积 ( $100 \mu\text{l}$ ) 细胞, 以用于细胞因子的生产。将放射性标记的胸苷加入到孔中。第二天(第 7 天)在滤器中收获细胞。将闪烁液加入到滤器中, 其放射性用闪烁计数器进行测量。

同样地, 在一个 96 孔圆底平板上, 每孔加入  $3 \times 10^4$  的 T-细胞, 并用自身辐射的 PBL ( $1 \times 10^5$  细胞/孔) 和 3 种不同浓度的不同桦木样品进行刺激。1 天后, 收获来自具有最高浓度桦木的各孔细胞以用于细胞因子的生产。将放射性标记的胸苷加入到孔中。在第 2 天在滤器中收获细胞并如对 PBL 所述进行计数。

收集来自四份的上清液, 并用来自 Becton Dickinson 的 CBA (细胞因子珠阵列 (cytokine bead array)) 试剂盒来测量细胞因子。

#### 结果:

10 个 PBL 培养物显示出对桦木的特异性刺激。通常, 对不同桦木样品的 PBL 增殖比较相似, 尽管可看到变化。在 3 个 PBL 中, nBet v 1 能比 rBet v 1 和突变体更好刺激增殖。突变桦木样品与 rBet v 1 几乎一样地刺激 PBL (图 29)。图 29 表示上述 Bet v 1 制备物的刺激指数。刺激指数 (SI) 是被刺激样品的增殖 (cpm: 每分钟的读数) 除以培养基 (medium) 对照的增殖 (cpm) 来计算的。PPD 指来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的纯化蛋白质衍生物, 它充当阳性对照。

细胞因子的产量受  $\text{IFN-}\gamma$  的控制且随 PBL 的增殖按比例增加。Th1/Th2 替换的信号不明显 (图 30-32)。图 30 表示具有 Th0 特征的

患者,图 31 表示 Th1 特征而图 32 表示 Th2 特征。细胞因子产量用 pg/ml 测量(如条形图所示), IL-5/IFN- $\gamma$  之间的比率是靠下方的虚线(右侧的 Y 轴)。用 cpm 测量增殖,如右侧 Y 轴上所示,表示为实线。以培养基 (medium) 和 MBP (麦芽糖结合蛋白质) 作为背景对照。

在 nBet v 1 上建立 8 个 T-细胞系,除一个之外,其余的全部对所有桦木样品具有同等优良程度的增殖。4 个 T 细胞系基于 IL-5 和 IFN- $\gamma$  的比率 (Th2 > 5, 5 > Th0 > 0.2, 0.2 > Th1) 而分泌 Th0 样细胞因子。3 个 T 细胞系分泌 Th1 细胞因子,1 个 T 细胞系分泌 Th2 细胞因子。IL-5/IFN- $\gamma$  的比率不受不同桦木样品的影响。

#### 结论:

对 nBet v 1 显示特异性刺激的所有 PBL 培养物和 7/8 个 T 细胞系也对 rBet v 1 和突变体起反应。这些数据表示对于 T 细胞的刺激,单一的 Bet v 1 的同种型或这 4 个突变体可替换在天然过敏原制备物中发现的单独同种型的混合物。因而,基于重组过敏原或这 4 个突变体的疫苗将针对现存的 Bet v 1 特异性 T 细胞群体。

#### 实施例 6

该实施例描述重组 Bet v 1 过敏原突变体的特征,这些突变体带有多于 4 个突变,并且具有与现有技术 PCT/DK 01/00764 相比降低的 IgE 结合亲合力。本发明的突变体被相应制备和测试。

#### 在用重组和突变体 Bet v 1 蛋白质免疫接种后诱导 Bet v 1 特异性 IgG 抗体和阻断抗体

在本部分中,术语“阻断抗体”定义为与人 IgE 抗体不同的抗体,它能够结合抗原并阻止人 IgE 抗体对该抗原的结合。

在小鼠免疫接种实验中检验重组 Bet v 1 2227 野生型蛋白质(rBet v 1) 和 Bet v 1 2595, 2628, 2744 及 2773 突变体蛋白质诱导 Bet v 1 特异性 IgG 抗体和阻断抗体的能力。

用重组 Bet v 1 2227 野生型蛋白质或 4 个突变体蛋白质对 BALB/cA 小鼠(每组 8 个)腹膜内注射进行免疫接种。该小鼠以 14 天的剂量间隔免疫接种 4 次。将不同的蛋白质连接到 1.25 mg/ml 的

Alhydrogel 上 (氢氧化铝凝胶, 1, 3% pH 8.0-8.4, Superfos Biosector)。该小鼠用 1 $\mu$ g 蛋白/剂量或 10 $\mu$ g 蛋白/剂量免疫接种。血液样品在第 0, 14, 35, 21, 49 和 63 天从眼眶采血获取。

用 rBet v 1 包被的微量滴定板和生物素化兔抗小鼠 IgG 抗体 (Jackson) 作为探测抗体, 通过直接 ELISA 分析特异性 IgG 抗体水平。重组 Bet v 1 2227 野生型蛋白质或 4 种突变体蛋白质的免疫接种诱导了很强的 rBet v 1 特异性 IgG 反应。该发现证明 4 种突变的蛋白质能够诱导与 Bet v 1 2227 野生型蛋白质高度交叉反应的抗体。

为了评价阻断抗体的诱导, 将来自桦木过敏患者的血清样品与包被了单克隆小鼠抗人 IgE 抗体的顺磁珠温育。温育后, 将珠子洗涤并重悬于缓冲液或来自未免疫接种小鼠 (对照) 或上述免疫接种小鼠的小鼠血清的稀释样品 (1: 100) 中。然后将生物素化的 rBet v 1 加入到该珠和小鼠血清抗体的混合物中。温育之后, 洗涤珠子, 用吖啶 (acridinium) 标记的链霉抗生素探测其结合的生物素化 rBet v 1。珠子和来自未免疫接种小鼠血清的温育并没有改变 rBet v 1 与珠子的结合。相反的, 珠子与来自用重组 Bet v 1 1227 野生型蛋白质或 4 种突变体蛋白质免疫接种的小鼠血清的温育显著地减少了 Bet v 1 与珠子的结合, 这证明了在血清样品中存在 Bet v 1 特异性阻断抗体。结果, 在第 63 天, 来自所有高剂量 (10 $\mu$ g/剂量) 免疫接种组的一种或多种血清样品能够将 Bet v 1 与珠子的结合减少 80% 以上。这些发现证明 4 种突变的蛋白质能够诱导可充当 Bet v 1 特异性阻断抗体的抗体。

### 实施例 7

该实施例描述重具有 12 个突变的本发明突变体的结构特征和 IgE 结合特性。在突变体 3007 中导入的突变在实施例 2 中描述。

### Bet v 1 (3007) 突变体蛋白的结构分析

如实施例 1 所述, 纯化的 Bet v 1 (3007) 突变体的结构完整性用圆二色 (CD) 谱分析。图 33 显示以近乎相同的浓度记录的重组 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (3007) 突变体的 CD 光谱。来自 2

个重组蛋白质的CD光谱中峰幅和位置的交迭显示这2种制备物含有相同量的二级结构,这强有力地表明 $\alpha$ -碳骨架三级结构没有受到氨基酸替换引入的影响。

#### Bet v 1 (3007) 突变蛋白的 IgE 结合特性

图 34 表示由非生物素化的 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (3007) 根据实施例 4 所述方法对生物素化重组 Bet v 1.2801 与来自过敏反应患者库的血清 IgE 的结合的抑制作用。对血清库中存在的血清 IgE 的结合达到 50% 抑制所需的各重组蛋白的量有明显的区别。重组 Bet v 1.2801 在大约 5ng 达到 50% 的抑制, 而 Bet v 1 (3007) 突变体的相应浓度是大约 200ng。Bet v 1 (3007) 突变体达到的抑制水平明显低于重组 Bet v 1.2801。这说明在 Bet v 1 (3007) 突变体中导入的 12 个点突变降低了对特异性血清 IgE 的亲合性。

## 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)
4. Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, Okudaira H, Okumura Y: "Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy". *Nat Biotechnol* 15, 754-758 (1997).
5. Smith AM, Chapman MD: "Localization of antigenic sites on Der p 2 using oligonucleotide-directed mutagenesis targeted to predicted surface residues". *Clin Exp Allergy* 27, 593-599 (1997).
6. Aki T, Ono K, Hidaka Y, Shimonishi Y, Jyo T, Wada T, Yamashita M, Shigeta S, Murooka Y, Oka S: "Structure of IgE epitopes on a new 39-kD allergen molecule from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*". *Int Arch Allergy Immunol* 103, 357-364 (1994).
7. Förster E, Dudler T, Gmachl M, Aberer W, Urbanek R, Suter M: "Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with Hymenoptera allergy". *J Allergy Clin Immunol* 95, 1229-1235 (1995).

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 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).
13. Alvarez AM, Fukuhara E, Nakase M, Adachi T, Aoki N, Nakamura R, Matsuda T: "Four rice seed cDNA clones belonging to the alpha-amylase/trypsin inhibitor gene family encode potential rice allergens". *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 1304-1308 (1995).

14. Colombo P, Kennedy D, Ramsdale T, Costa MA, Djro G, Izzo V, Salvadori S, Guerrini R, Cocchiara R, Mirisola MG, Wood S, Geraci D, Journal of Immunology Vol. 160, No. 6, 15 March 1998, 2780-2875.
15. Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, Aasmul-Olsen S, Larsen MR, Mørtz E, Roepstorff P, Larsen JN: "Characterization of Purified Recombinant *Bet v 1* with Authentic N-terminus, Cloned in Fusion with Maltose-Binding Protein". *Prot Exp Purification* 8, 365-373 (1996a).
16. Ipsen H, Wihl J-Å, Petersen BN, Løwenstein H: "Specificity mapping of patients IgE response towards the tree pollen major allergens *Aln g I*, *Bet v I* and *Cor a I*." *Clin. Exp. Allergy* 22, 391-9, (1992)
17. Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, 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).
20. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239, 487-491 (1988).

21. Spangfort MD, Larsen JN, Gajhede M: "Crystallization and Preliminary X-ray Investigation at 2.0 Å Resolution of *Bet v 1*, a Birch Pollen Protein Causing IgE-Mediated Allergy". *PROTEINS, Struc Func Genet* 26, 358-360 (1996b).
22. Monsalve RI, Lu G, and King TP: "Recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*) by expression in bacteria or yeast" (1999) Submitted.
23. Fang KSF, Vitale M, Fehlner P and King TP: "cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 895 (1988).
24. Lu G, Villalba M, Coscia MR, Hoffman DR and King TP: "Sequence Analysis and Antigenic Cross-reactivity of a Venom Allergen, Antigen 5, from Hornets, Wasps, and Yellow Jackets". *Journal of Immunology* 150, 2823-2830 (1993).
25. Punnonen J: "Molecular Breeding of Allergy Vaccines and Antiallergic Cytokines". *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:173-182.
26. P.A. Würtzen, M. Wissenbach, H. Ipsen, A. Bufe, J. Arnved, 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.

图1

定点突变在具有3个表位的主要IgE表位假定模型中的作用

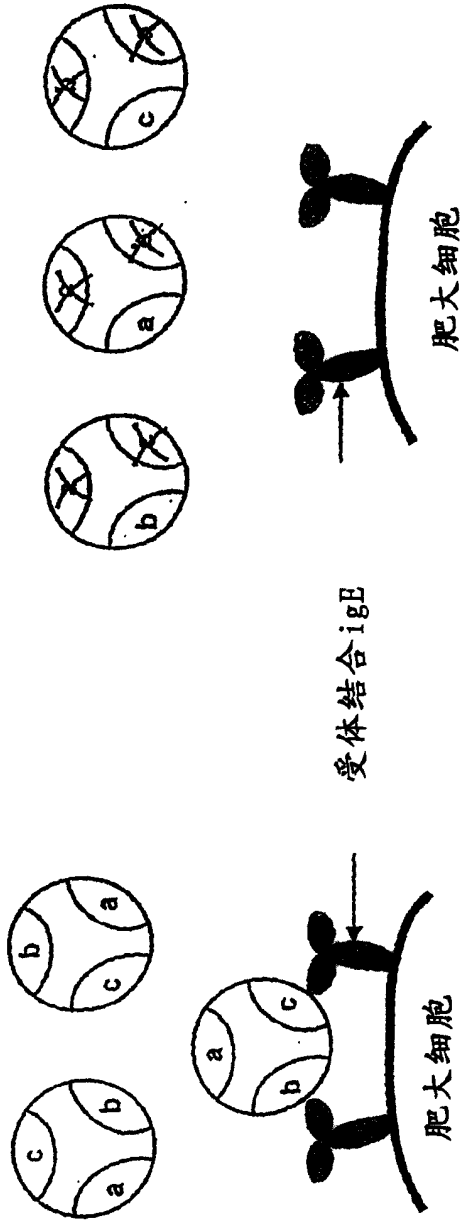


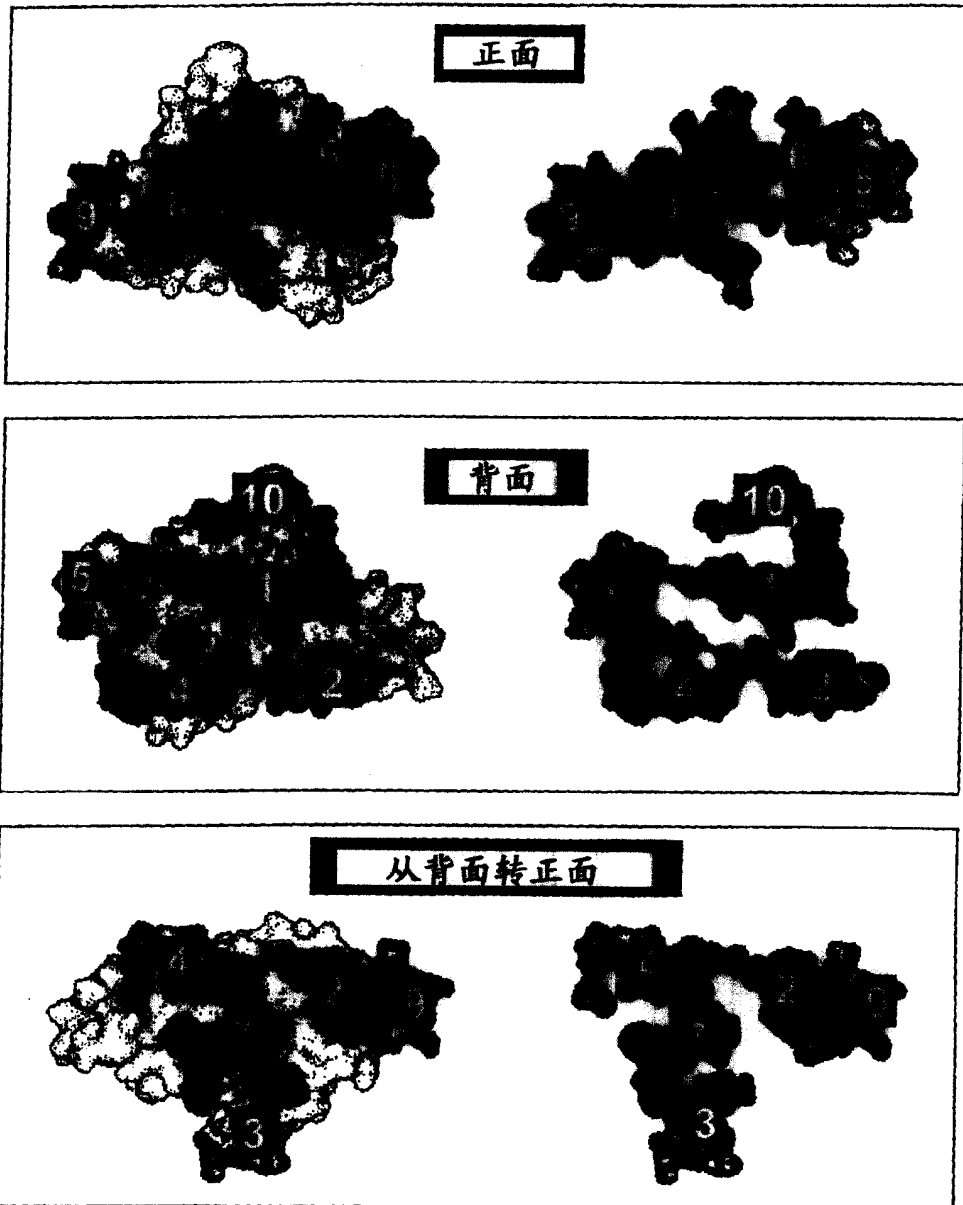
图1A

交联

图1B

未交联

图2



## 图 3

用于1号突变体的突变特异性寡核苷酸引物。突变的核苷酸有下划线

Bet VI有义	5'- AATTATGAGACTGAGACC <u>C</u> CTCTGTTATCCGAGCAGCTCG	-3'
Bet VI无义	3'- TTAATACTCTGACTCTGG <u>T</u> GGAGACAATAGGGTCGTCGAGC	-5'
有义引物	5'- TGAGACCC <u>C</u> CTCTGTTATCCAG	-3'
无义引物	3'- A TACTCTGACTCTGG <u>G</u> GGAGACA	-5'

## 图4

## 用于Bet V1 (No. 2801) 定点突变的寡核苷酸引物

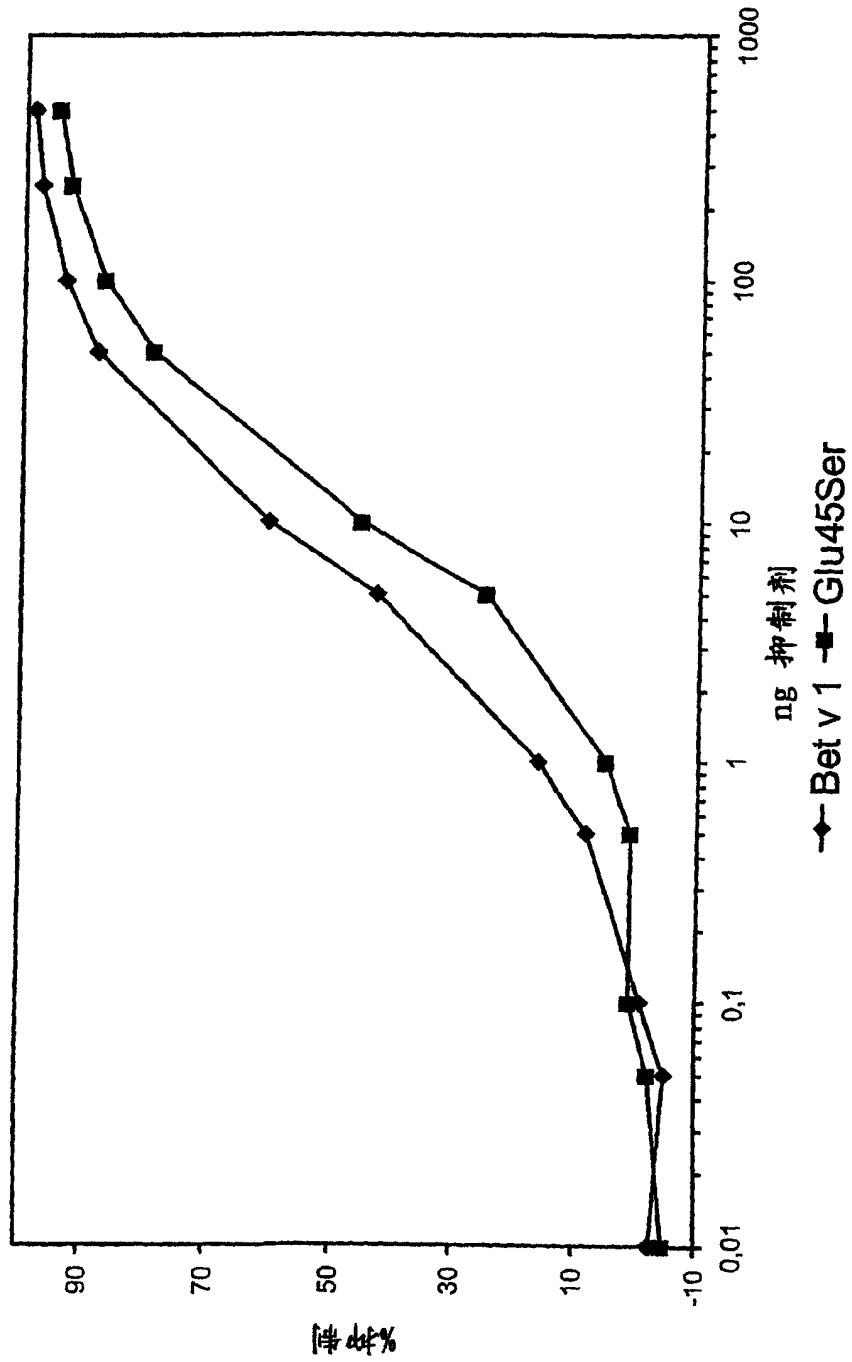
全有义	1: 183Bv, 15-mer 5'-GTTGCCAACGATCAG
1 有义	2: 184Bv, 23-mer 5'-TGAGACCCCCTCTGTTATCCCAG
1 无义	3: 185Bv, 23-mer 5'-ACAGAGGGGGTCTCACTCTCATA
2 有义	4: 186Bv, 31-mer 5'-GATACCCTCTTCCACAGGTTGCACCCCAAG
2 无义	5: 187Bv, 31-mer 5'-ACCTGTGAAAGAGGGTATCGCCATCAAGGA
3 有义	6: 188Bv, 23-mer 5'-AACATTTGAGGAAATGGAGGGCC
3 无义	7: 189Bv, 23-mer 5'-TTTCCTGAAATGTTTTCAACACT
4 有义	8: 190Bv, 23-mer 5'-TTAAGAACATCAGCTTTCCCGAA
4 无义	9: 191Bv, 23-mer 5'-AGCTGATGTTCTTAATGGTTCCA
5 有义	10: 192Bv, 23-mer 5'-GGACCATGCAAACCTCAAATACA
5 无义	11: 193Bv, 23-mer 5'-AGTTTGCATGGTCCACCTCATCA
6 有义	12: 194Bv, 23-mer 5'-TTTCCCTCAGGCCTCCCTTTCAA
6 无义	13: 195Bv, 23-mer 5'-AGGCCTGAGGGAAGCTGATCTT
7 有义	14: 196Bv, 24-mer 5'-TGAAGGATCTGGAGGGCCTGGAAC
7 无义	15: 197Bv, 24-mer 5'-CCCTCCAGATCCTTCAATGTTTTTC
8 有义	16: 198Bv, 24-mer 5'-GGCAACTGGTGATGGAGGATCCAT
8 无义	17: 199Bv, 24-mer 5'-CCATCACAGTTGCCACTATCTTT
全无义	18: 200Bv, 15-mer 5'-CATGCCATCCGTAAG

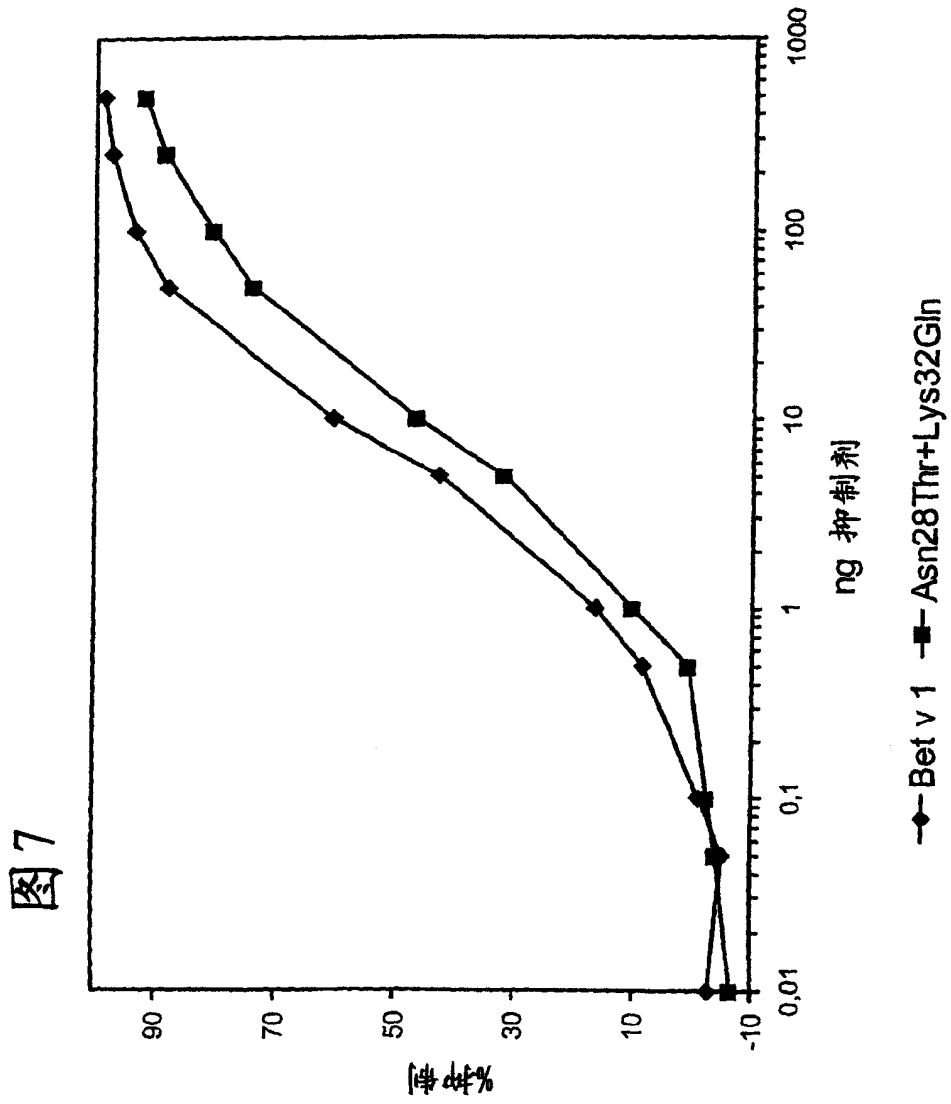
## 图5

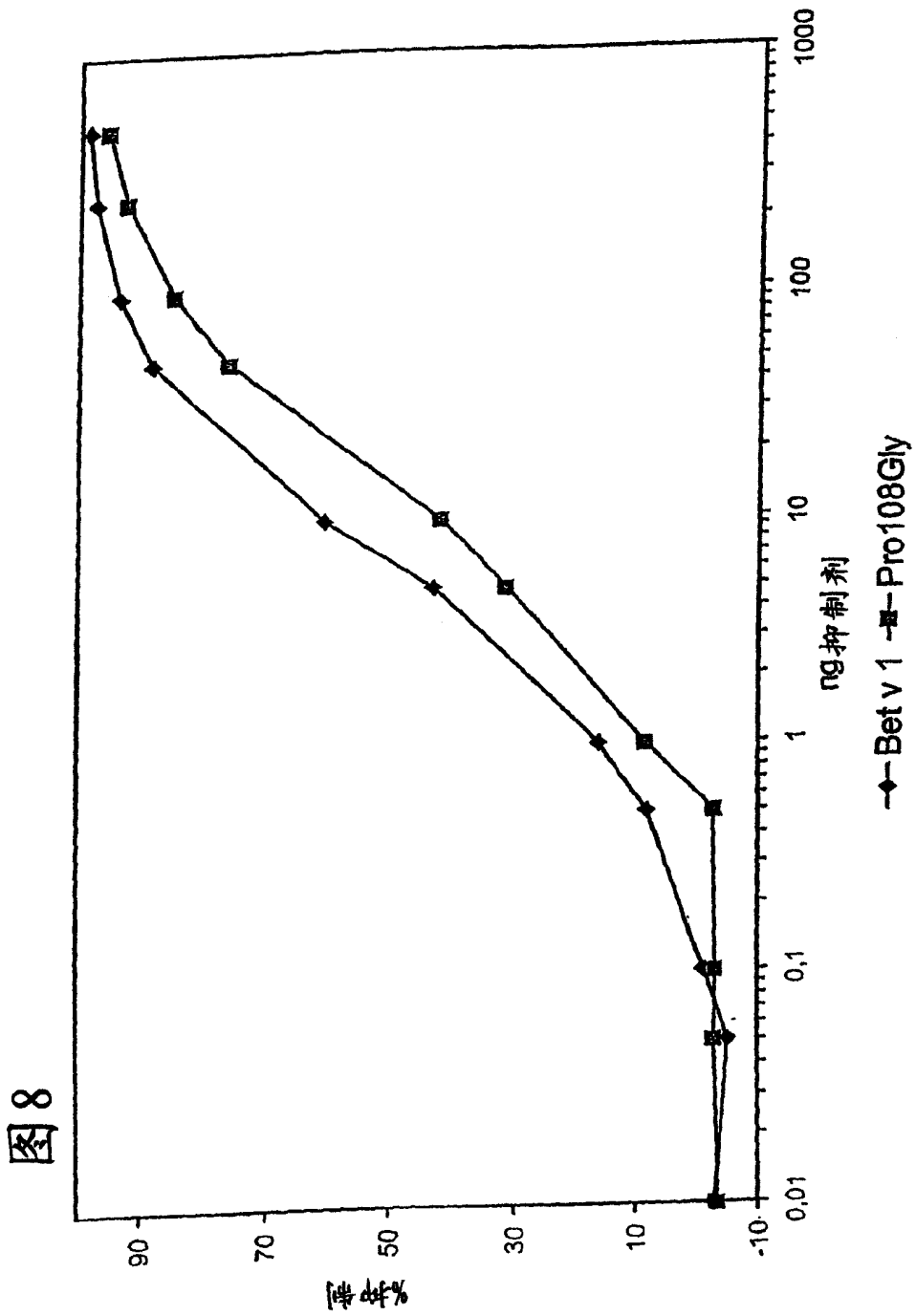
## 全部Bet V1突变体的总览

1 (A-C)		
GGTGTGTTTAAATTATGAGACTGAGACCACCTCTGTTATCCCAGCAGCTCGACTGTTCAAG	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)		
GCCTTTATCCTTGATGGCGATAACCTCTTTCCAAAGTTGCACCCCAAGCCATTAGCAGT	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)		
GTTGAAAACATTGAAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTTCCCGAA	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)		
GGCTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACAACTTCAAA	240	
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K	80	
TACAATTACAGCGTGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGGCAGACATTGGAGAAGATCTCCAAC	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)		
GAGATAAAGATAGTGGCAACCCCTGATGGAGGATCCATCTTGAAGATCAGCAACAAGTAC	360	
E I K I V A T P-G D G G S I L K I S N K Y	120	
CACACCAAAGGTGACCATGAGGTGAAGGCAGAGCAGGTTAAGGCAAGTAAAGAAATGGGC	420	
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G	140	
GAGACACTTTTGAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAATAA	480	
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N 停止	159	

图6







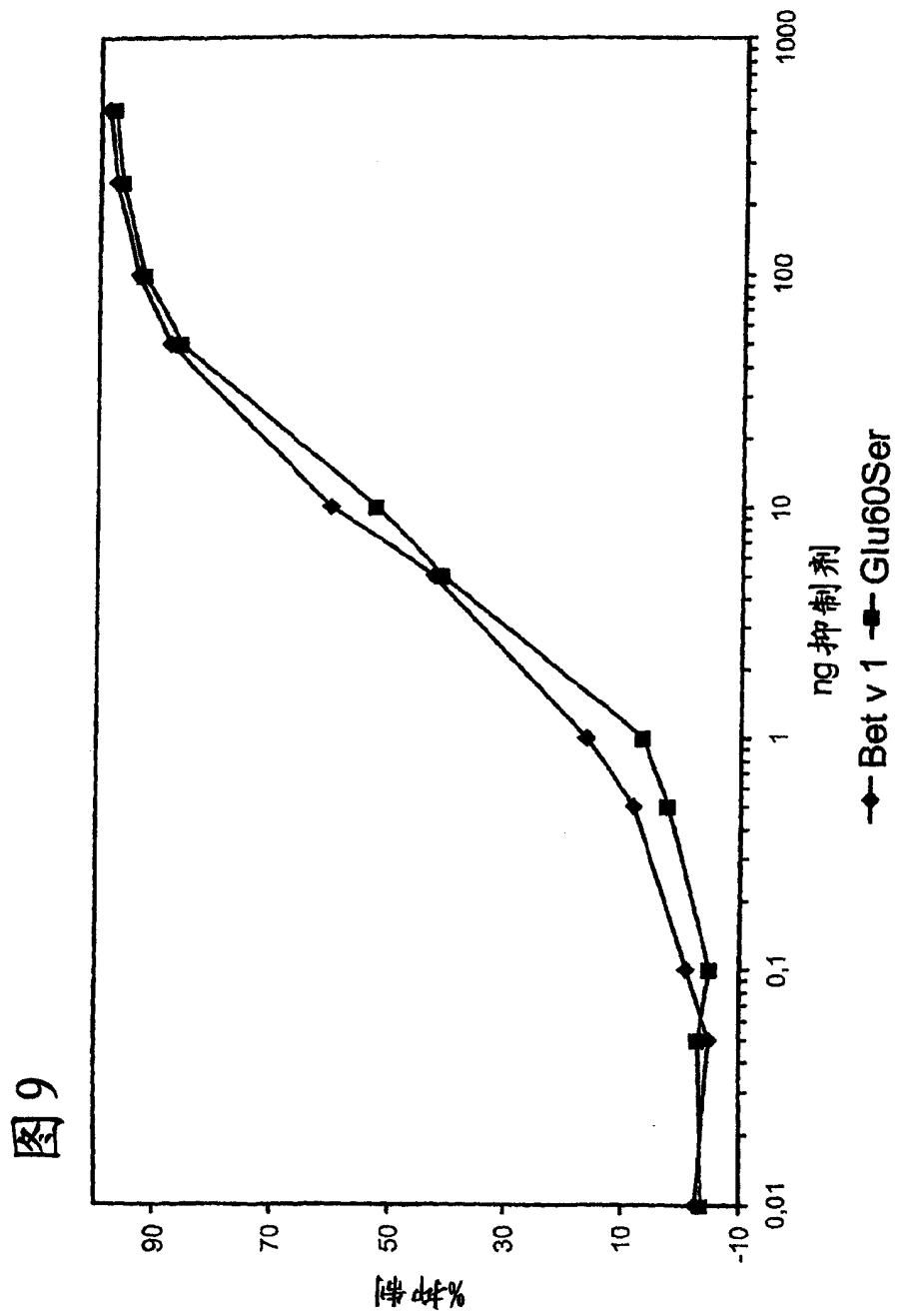
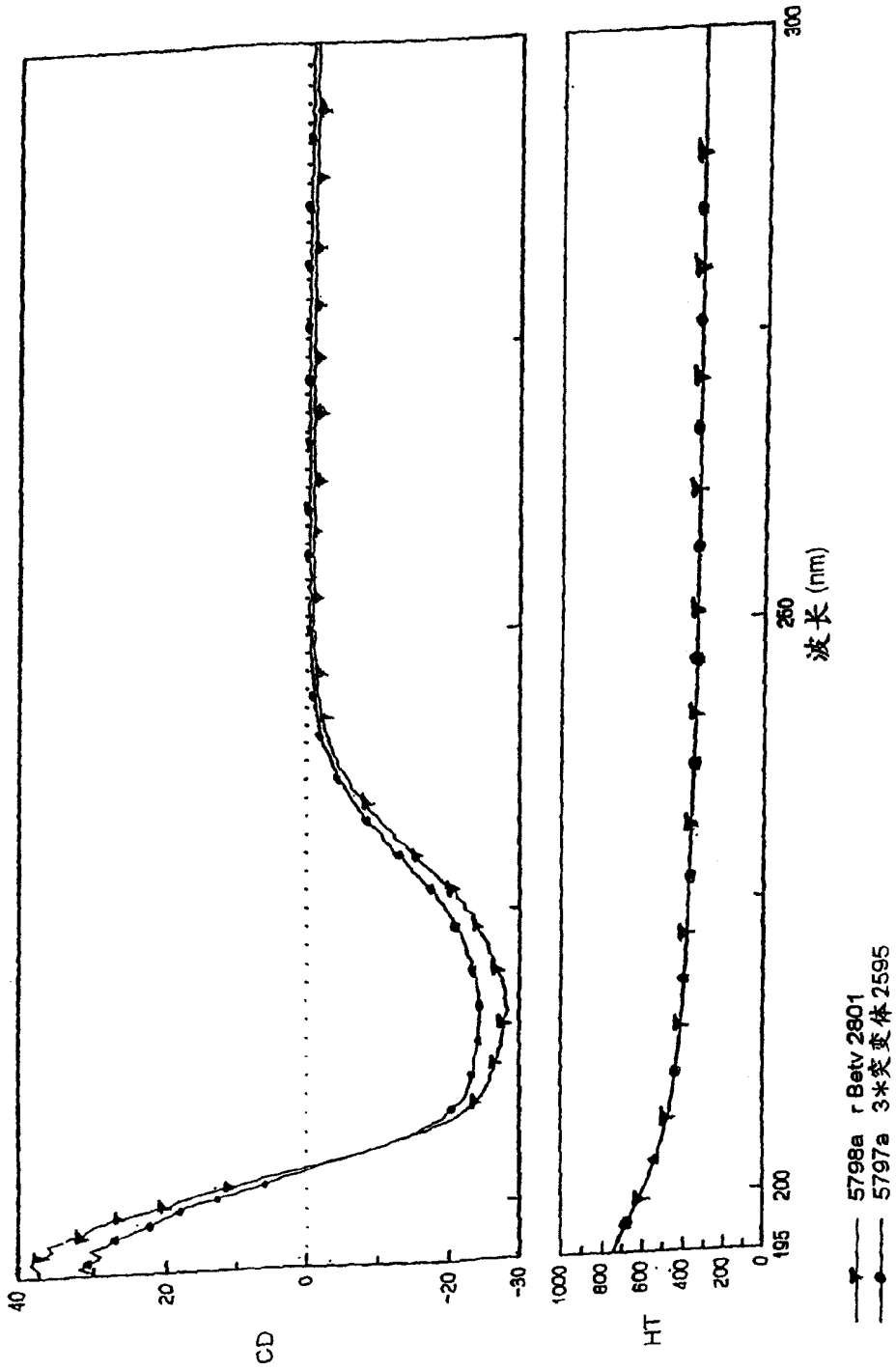


图 10

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02%Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub>



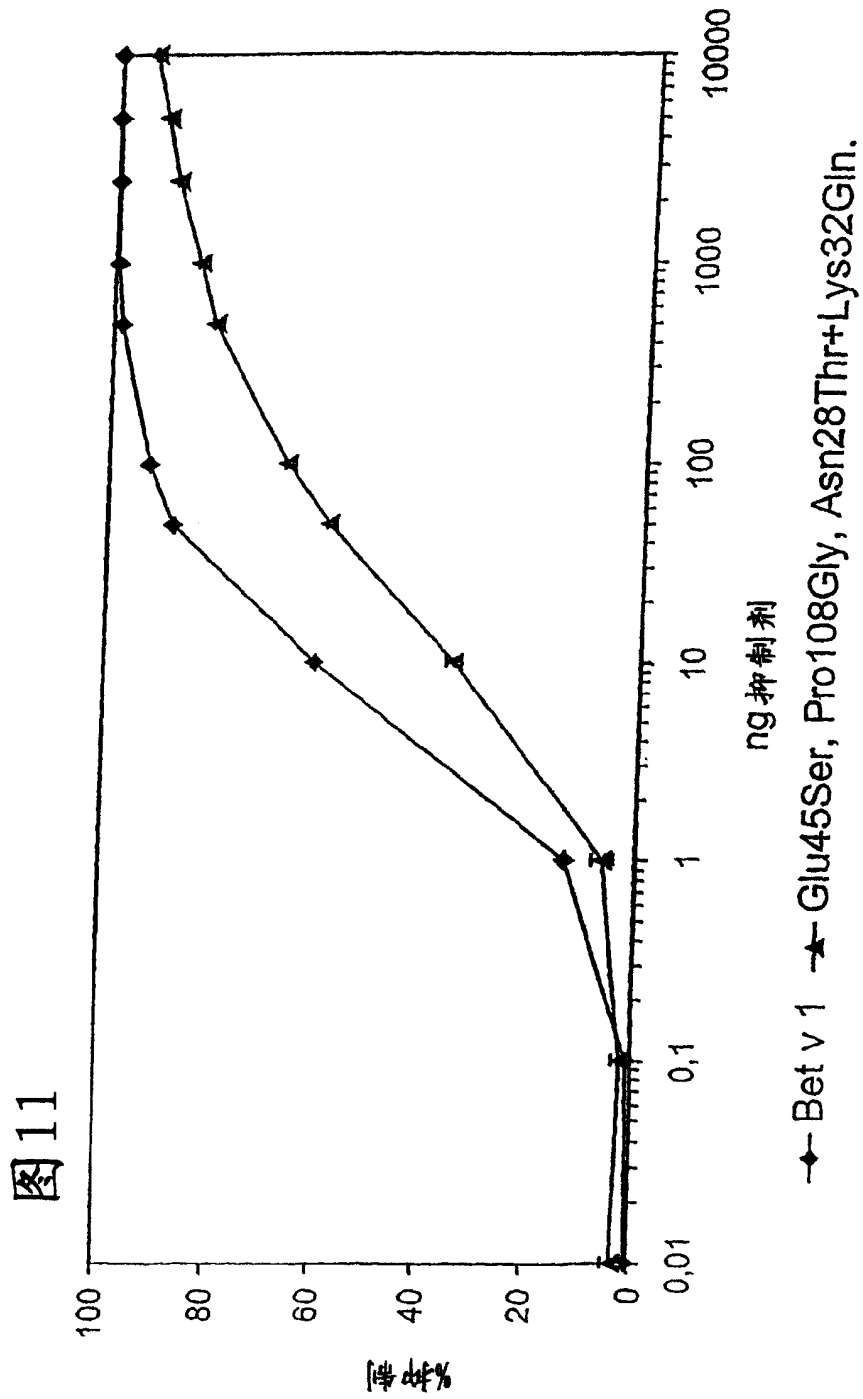
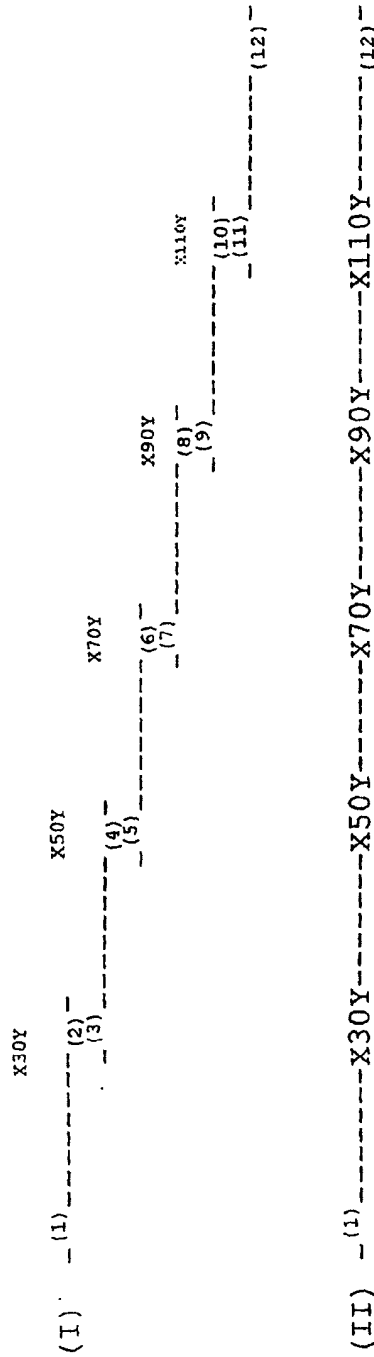


图12



线代表DNA序列。  
 线上方括号内的数字代表有义寡核苷酸引物：(1), (3), (5), (7), (9), (11)。  
 线下方括号内的数字代表无义寡核苷酸引物：(2), (4), (6), (8), (10), (12)。  
 注释X (位点) Y代表突变。  
 (1) 代表含有蛋白N-末端的有义寡核苷酸引物。  
 (2) 代表含有蛋白C-末端的无义寡核苷酸引物。

图 13

## Bet v 1 (3004)

<sup>1</sup>{bet v 1 (2628)}  
<sup>4</sup>331s <sup>2</sup>(Y5V, E42S) <sup>3</sup>[L62F]  
 3055a {bet v 1 (2733)}  
 3054s (N78K, K97S, K103V) [P108G]  
 3063a {bet v 1 (2628)}  
 3062s (K134E) [+160N]  
 3072a

## Bet v 1 (3005)

{bet v 1 (2733)}  
 331s (Y5V, N28T, K32Q, E42S) [L62F]  
 3055a {bet v 1 (2733)}  
 3054s (N78K, K97S, K103V) [P108G]  
 3063a {bet v 1 (2628)}  
 3062s (K134E) [+160N]  
 3072a

## Bet v 1 (3007)

{bet v 1 (2733)}  
 331s (Y5V, N28T, K32Q, E42S) [L62F]  
 3055a {bet v 1 (2733)}  
 3054s (N78K, K97S, K103V, P108G) [D125Y]  
 3065a {bet v 1 (2628)}  
 3064s (K134E) [+160N]  
 3072a

## Bet v 1 (3009)

{bet v 1 (2733)}  
 331s (Y5V, N28T, K32Q, E42S) [L62F]  
 3055a {bet v 1 (2595)}  
 3054s [E96S]  
 3061a {bet v 1 (2595)}  
 3060s (P108G) [+160N]  
 3072

<sup>1</sup>{bet v 1(xxxx)}=用于突变的 DNA 模板。

<sup>2</sup>(字母 ID, 位点, 字母 ID)=预先被插入 DNA 模板的氨基酸取代, 并被转移到新的 Bet v 1 突变体分子内。

第 1 个字母 ID 相应于 Bet v 1.2801 中存在的氨基酸残基。第 2 个字母 ID 相应于用作突变的 DNA 模板的氨基酸残基。

位点相应于 Bet v 1 多肽链中的氨基酸位点。

<sup>3</sup>(字母 ID, 位点, 字母 ID)-通过覆盖延伸进行定点突变而导入的额外突变。第 1 个字母 ID 相应于 Bet v 1.2801 中存在的氨基酸残基。第 2 个字母 ID 相应于使用特定引物<sup>4</sup>进行定点突变所导入 Bet v 1 的氨基酸残基。

位点相应于 Bet v 1 多肽链中的氨基酸位点。

<sup>4</sup>用于导入如[]所示的额外定点突变的引物。

331s : CAGACTAATTCGAGCTCGGTACCC  
 3054s : GAAGGCTTTCTTTCAAATACGTG  
 3055a : TTTGAAAGGGAGGCCTTCGGGAAA  
 3060s : GACACATTGCTGAAGATCTCCAAC  
 3061a : GGAGATCTTCAGCAATGTGTCGCC  
 3062s : GTGGCAACCCGGATGGAGGATCC  
 3063a : TCCTCCATCCGGGGTTGCCACTAT  
 3064s : ACCAAAGGTTATCATGAGGTGAAG  
 3065a : CACCTCATGATAACCTTTGGTGTG  
 3072a : GCCGAATTCATTAGTTGTTGTAGGCATCGGAGTGTGC

图14

<u>3076s</u>	[T10X]	T, P, A	
<u>3037a</u>		K20 到 L, S, I, M, Q, N, K	
<u>3036s</u>	[K20X]	Q36 到 P, O, T, K, A, E	
<u>3039a</u>		E73 到 G, S, R, A, T, P	
<u>3038s</u>	[Q36X]	E87 到 D, E, G	
		K129 到 N, K, D, E	
		S149 到 G, S, R, A, T, P	
	<u>3041a</u>		
	<u>3040s</u>	[E73X]	
	<u>3071a</u>		
	<u>3070s</u>	[E87X]	
		3045a	
		<u>3044s</u>	[K129X]
		<u>3047a</u>	
		<u>3046s</u>	[S149]
		<u>3049a</u>	
		<u>3048s</u>	
			<u>3067a</u>

<u>3076s</u>	[T10X]	
<u>3037a</u>		
<u>3036s</u>	[K20X]	
<u>3039a</u>		
<u>3038s</u>	[Q36X]	
<u>3041a</u>		
<u>3040s</u>	[E73X]	
<u>3071a</u>		
<u>3070s</u>	[E87X]	
	3045a	
	<u>3044s</u>	[K129X]
	<u>3047a</u>	
	<u>3046s</u>	[S149]
	<u>3049a</u>	
	<u>3048s</u>	
		<u>3067a</u>

引物:

3036S	ACTGAGACCCVCTCTGTATCCCA	3049A	CAAGAGGTARSBCTCACGGCCCT
3037A	GATAACAGASGBGTCTCAGTCTC	3070S	AGAGTTGATVSYGTGGACCACACA
3038S	CGACTGTTGKWKGCCTTTATCCTT	3071A	GTGGTCCACRSRATCAACTCTCTC
3039A	GATPAAAGGCMWKGAAACAGTCGAGC	3067A	CGTCCCAGCTTTCATTAGTTGTGTAGGC
3040S	GTTCACCCVNRGCCATTAGCAGT	3076S	CGGATTCATATGGATATTAAGATGGTGTCTTAAAT
3041A	GCTAATGSCYKBBGGTGCAACCTT		
3044S	AGCGTATCGRWGGGGTCCCNPA		
3045A	GGACCCGWCYCGATCACGCTGTA		
3046S	ATTGGTACCATGAGGTGRWGCAGAG		
3047A	WTYCACTCATGGTCCACCAATGGTCTG		
3048S	GCCGTTGAGVSYTACCTCTTGGCA		



图 16

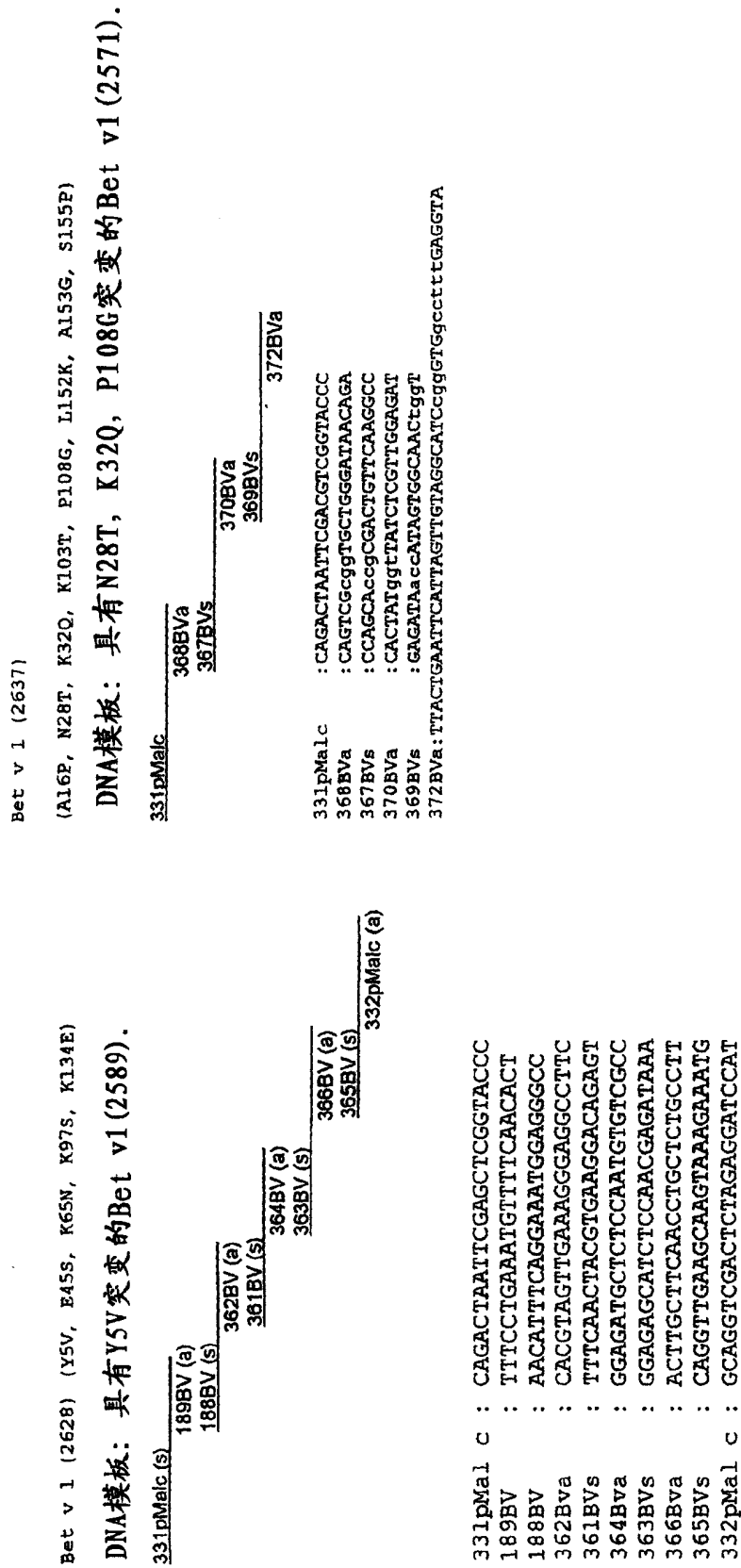
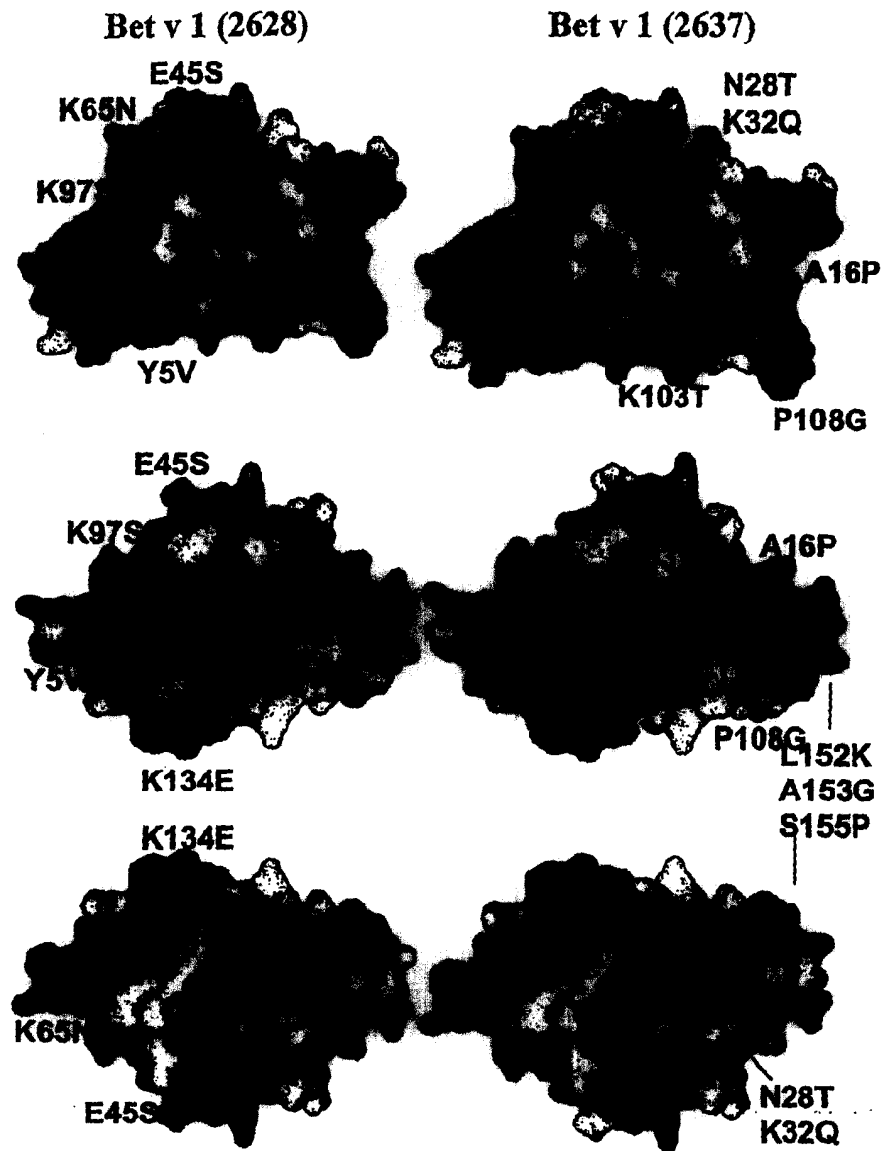


图 17



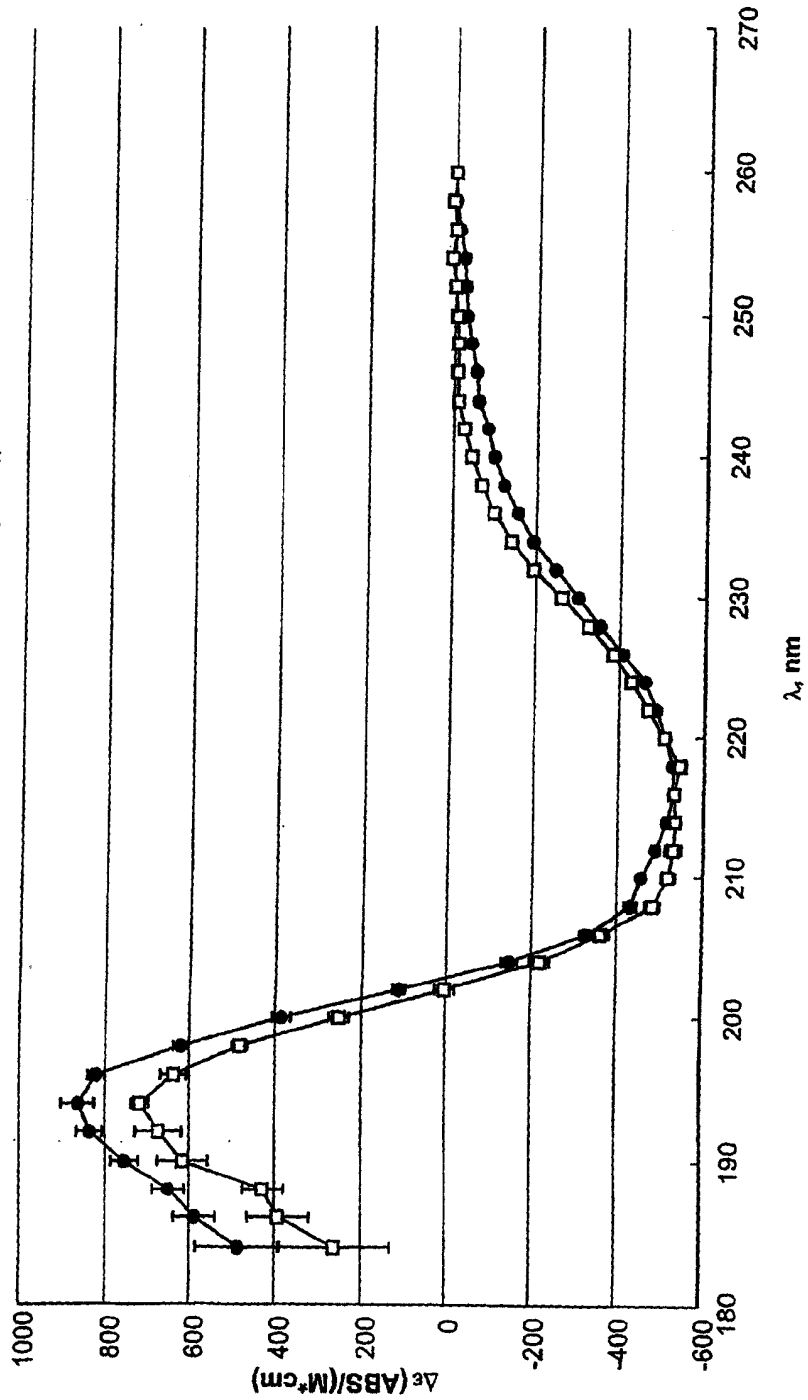
Bet v1的分子表面

左侧: bet v1(2628), 右侧: Bet v1 (2637)

灰色: 骨架+山毛榉中 95%-100%保守的氨基酸

黑色: 导入的定点突变

图18 Bet v1.2801和突变体Bet v1(2637)的CD谱



Bet v1(2637)的CD谱, 开放区, 以及天然折叠的Bet v1.2801的CD谱, 闭合的环, 均为20℃获得

图19 用Bet v1.2801和突变的Bet v1过敏原抑制Bet v1.2801与人血清IgE的结合

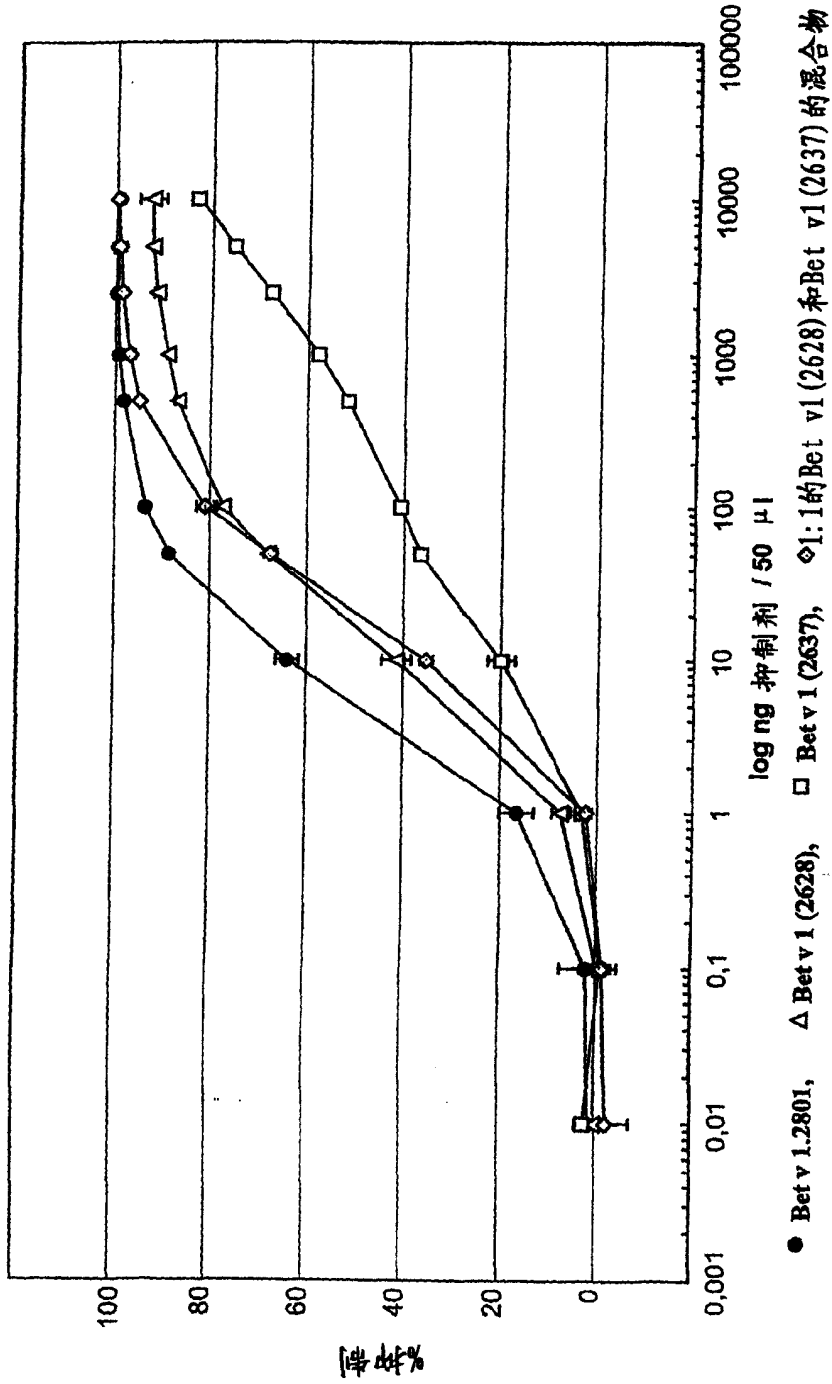


图20 组胺释放, 供体 MCDS, Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1 (2637)

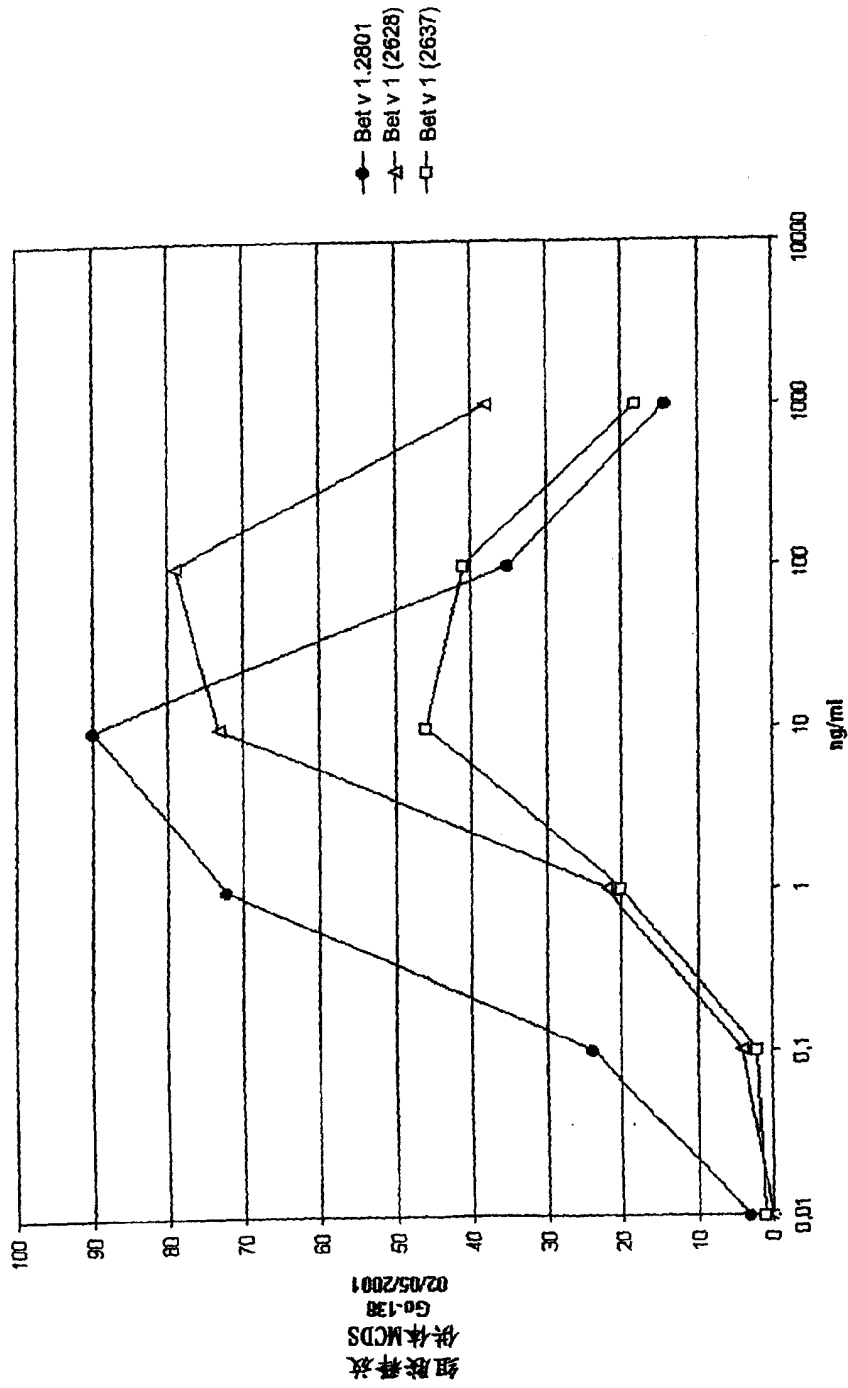


图 21 组胺释放, 供体 MDH, Bet v 1.2801, Bet v 1(2628), Bet v 1 (2637)

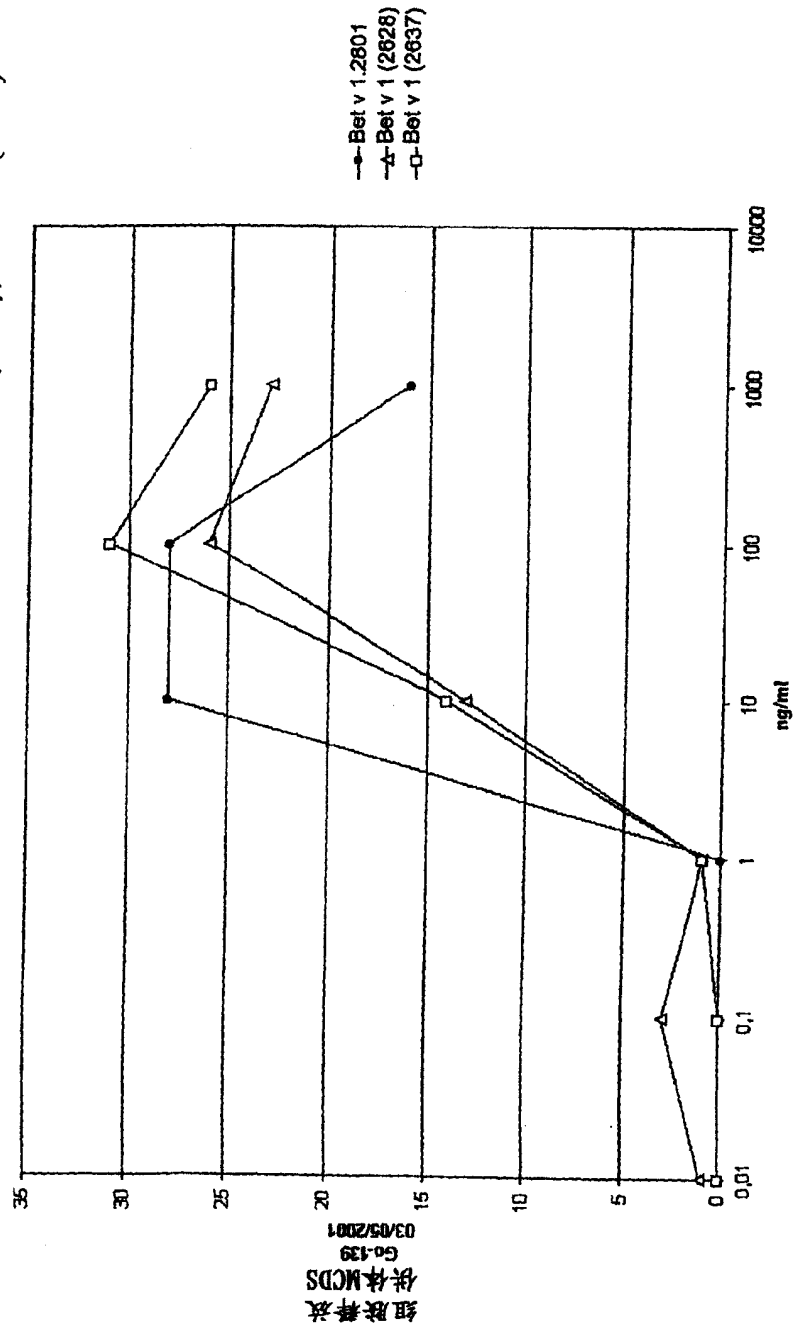
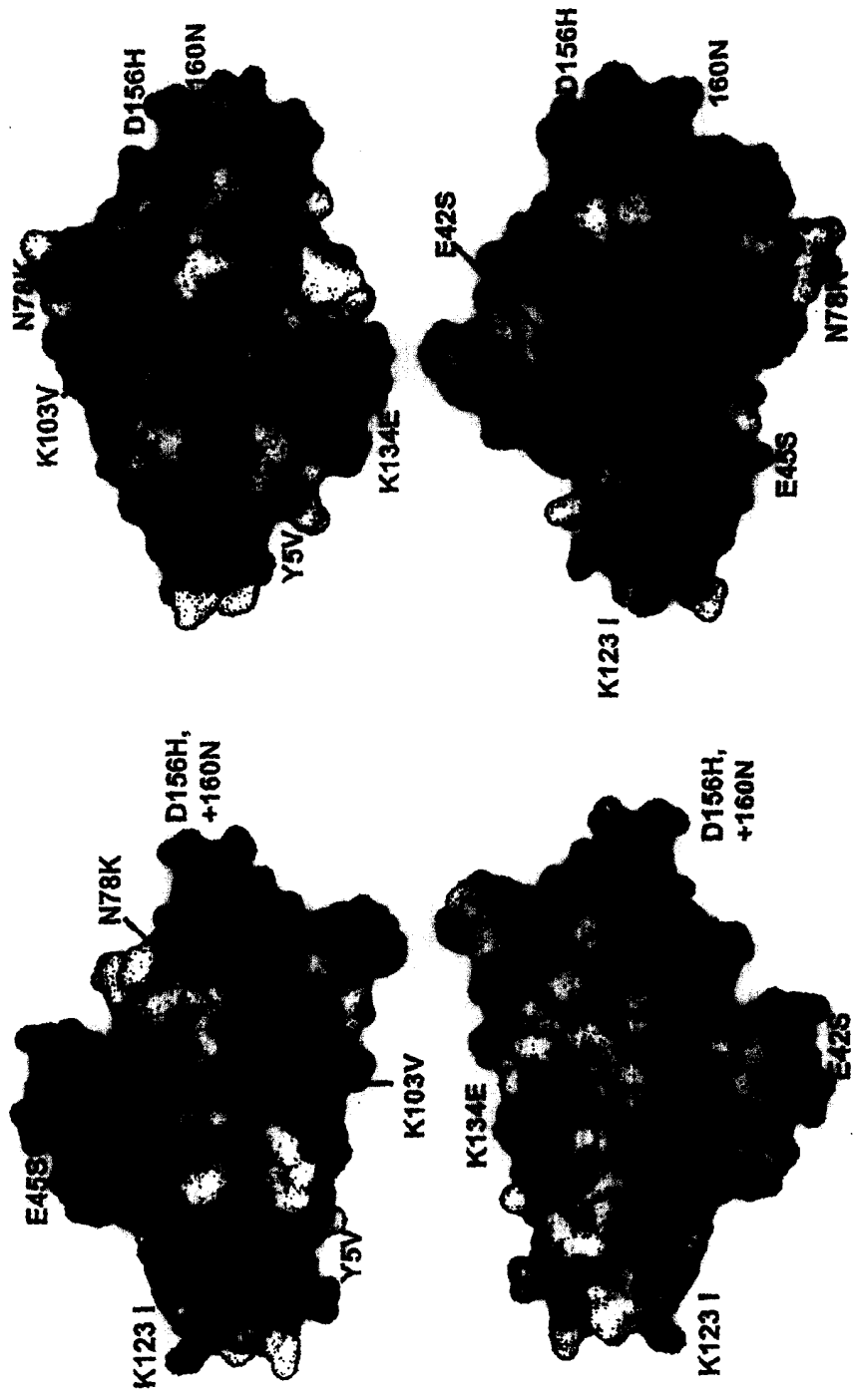


图 22

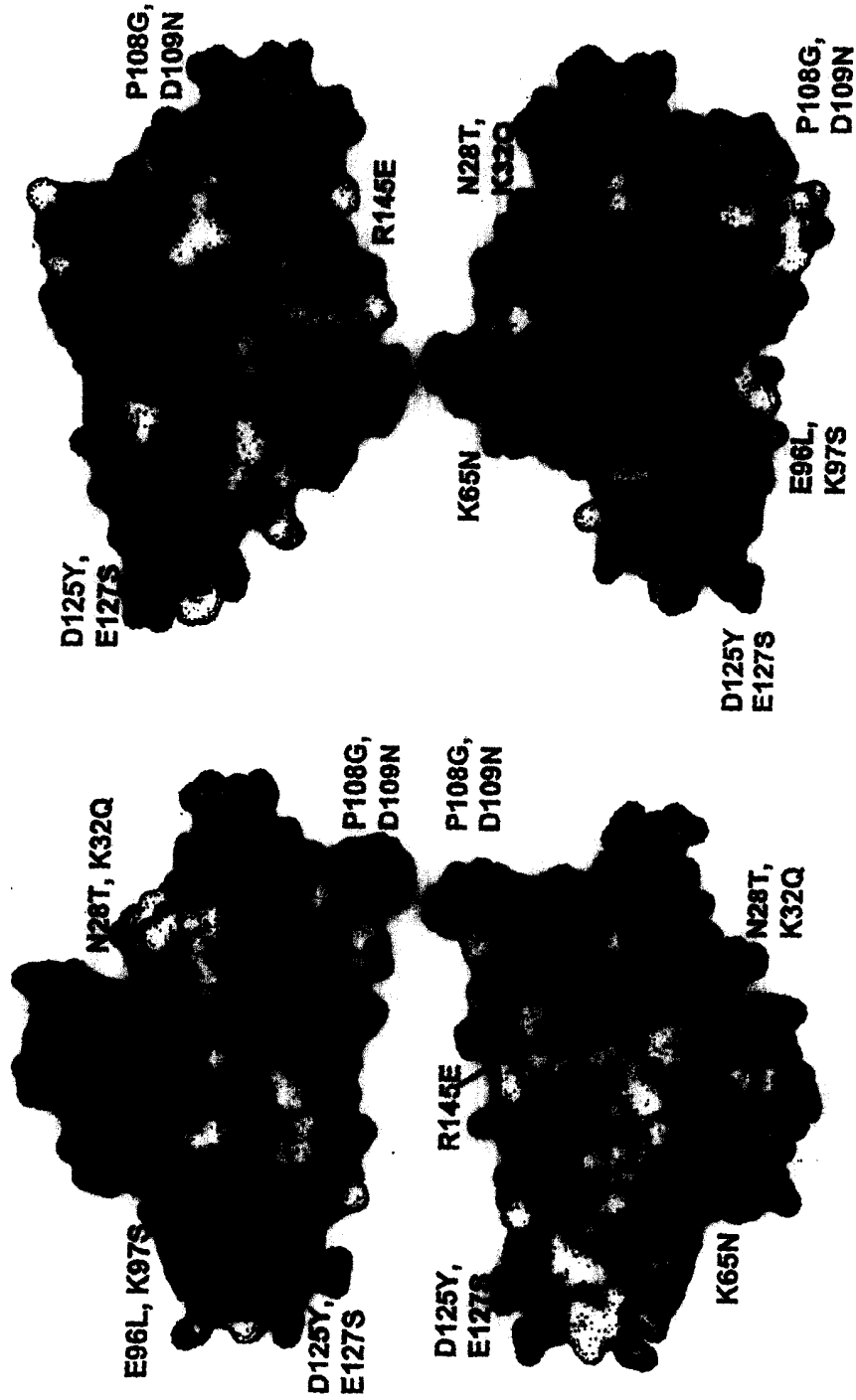
Bet v1 (2744) 分子表面的定点突变



灰色: 骨架+山毛榉中95-100%保守的氨基酸残基, 黑色: 定点突变

图 23

bet v1 (2753) 分子表面的定点突变



灰色: 骨架+山毛榉中95-100%保守的氨基酸残基, 黑色: 定点突变

图 24

Bet v1 (2744) (白色) 和 Bet v1 (2753) (黑色) 分子表面的定点突变分布



灰色: 分子表面; 山毛榉中95-100%保守的氨基酸残基,  
 黑色: 突变 (Y5V, K134E), (E42S, E45S), (N78K, K103V), K123 I, (D156H, +160N)  
 白色: 突变 (N28T, K32Q), K65N, (E96L, K97S), (P108G, D109N), (D125Y, E127S), R145E

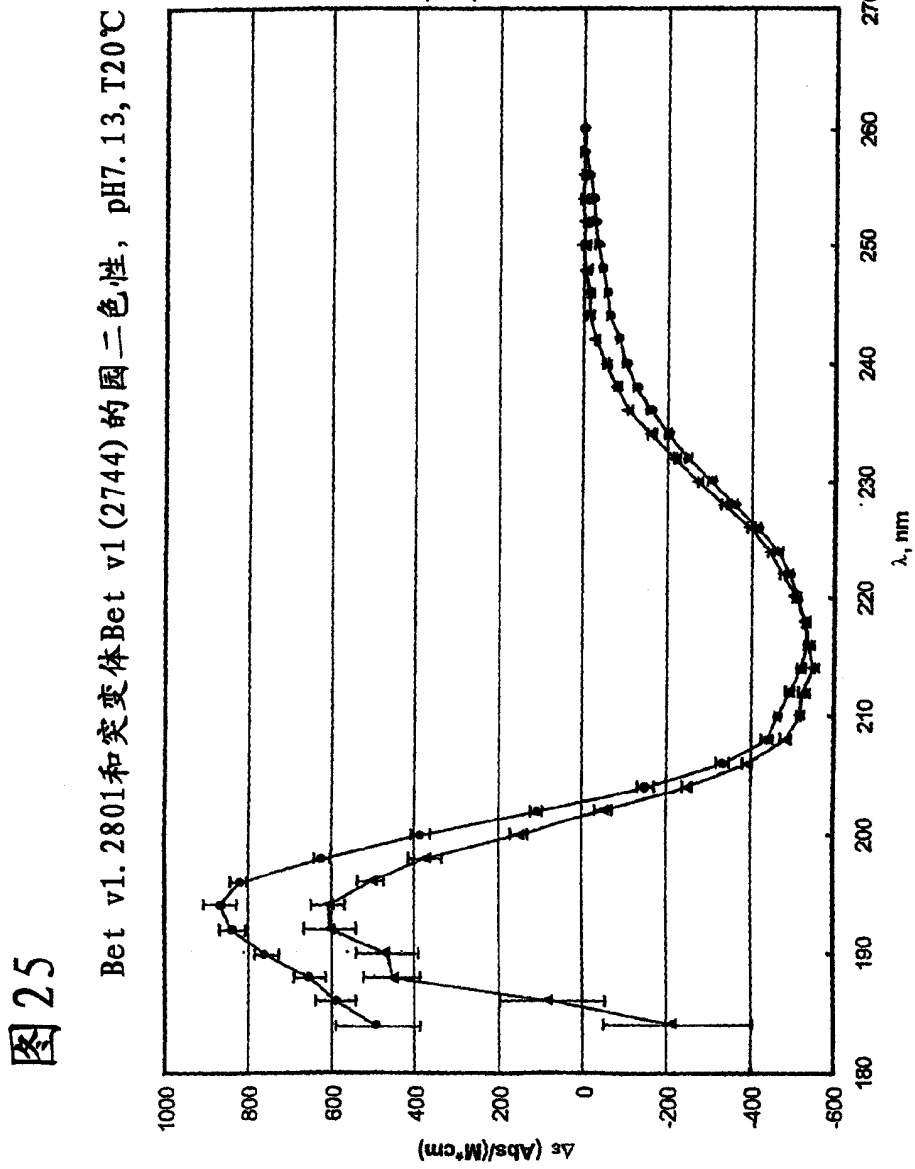


图26

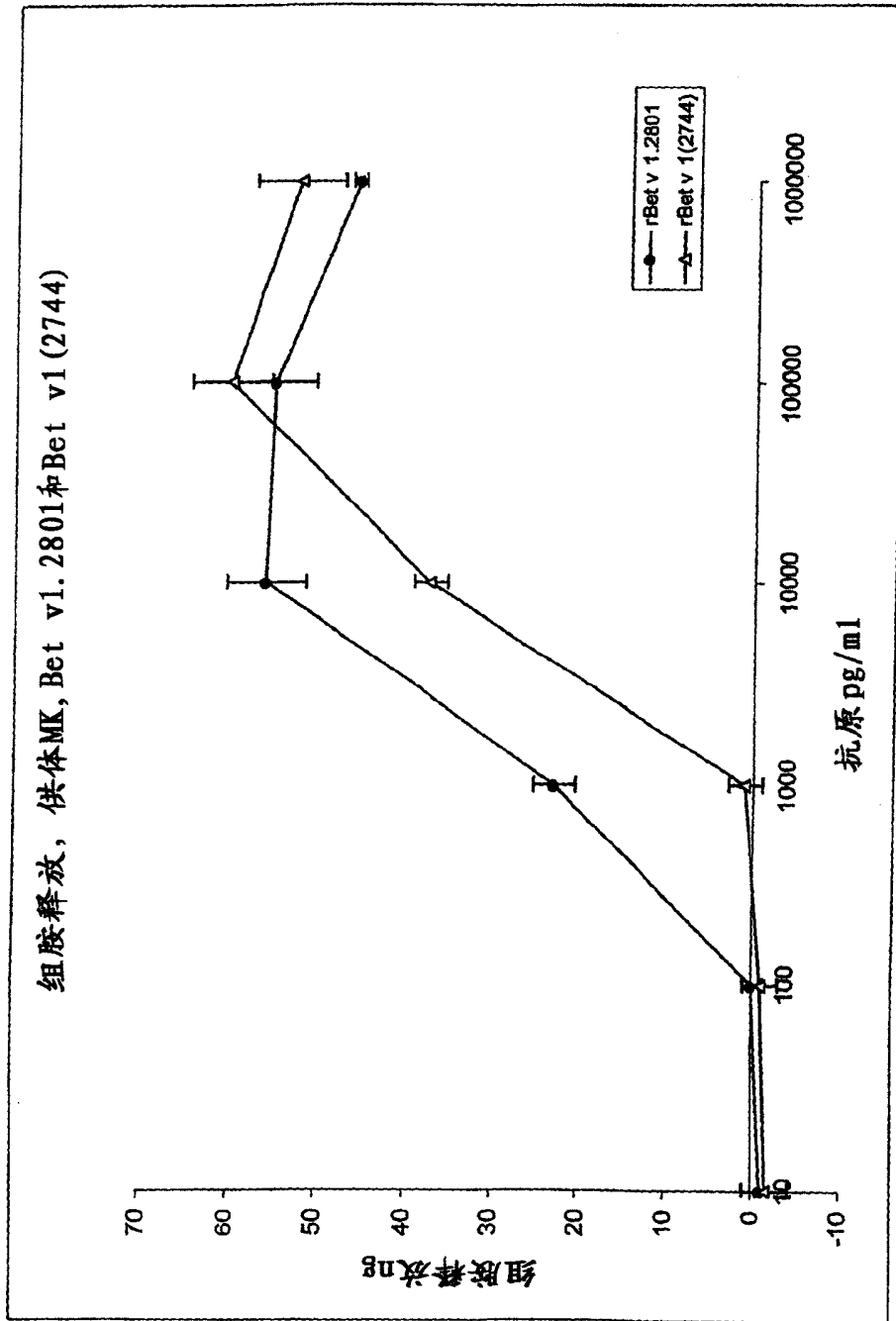


图 27A

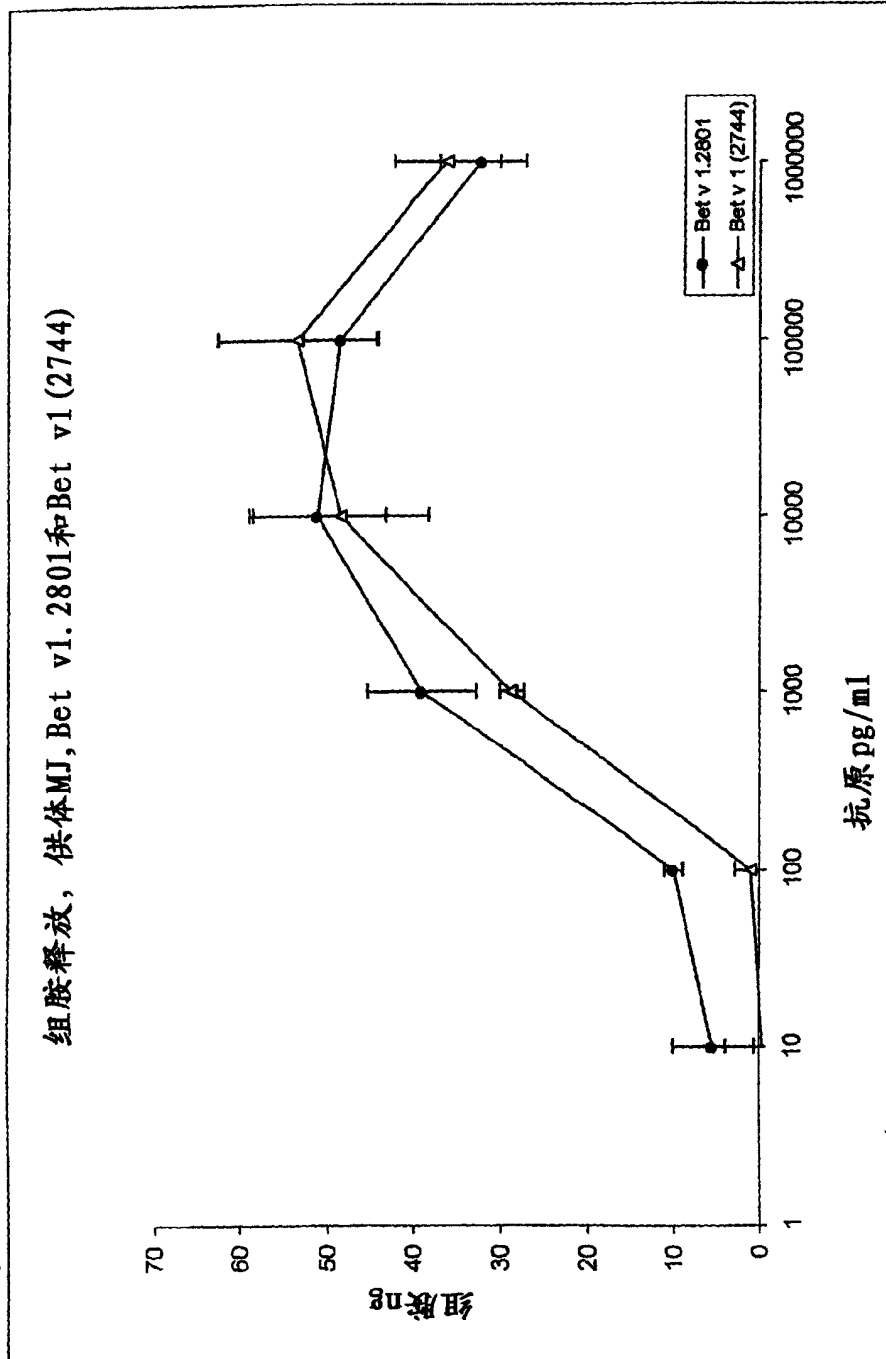


图 27B

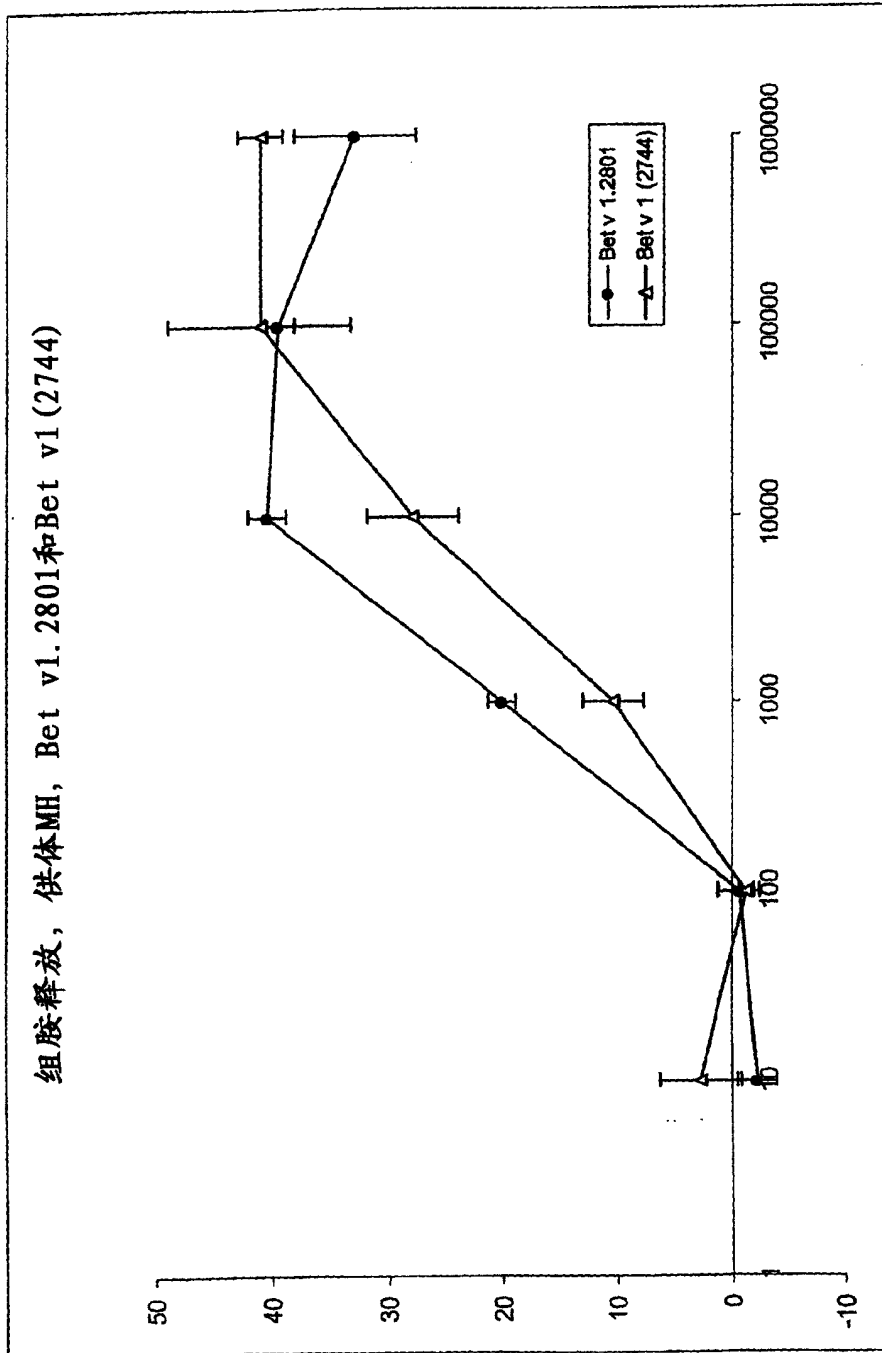


图 27C

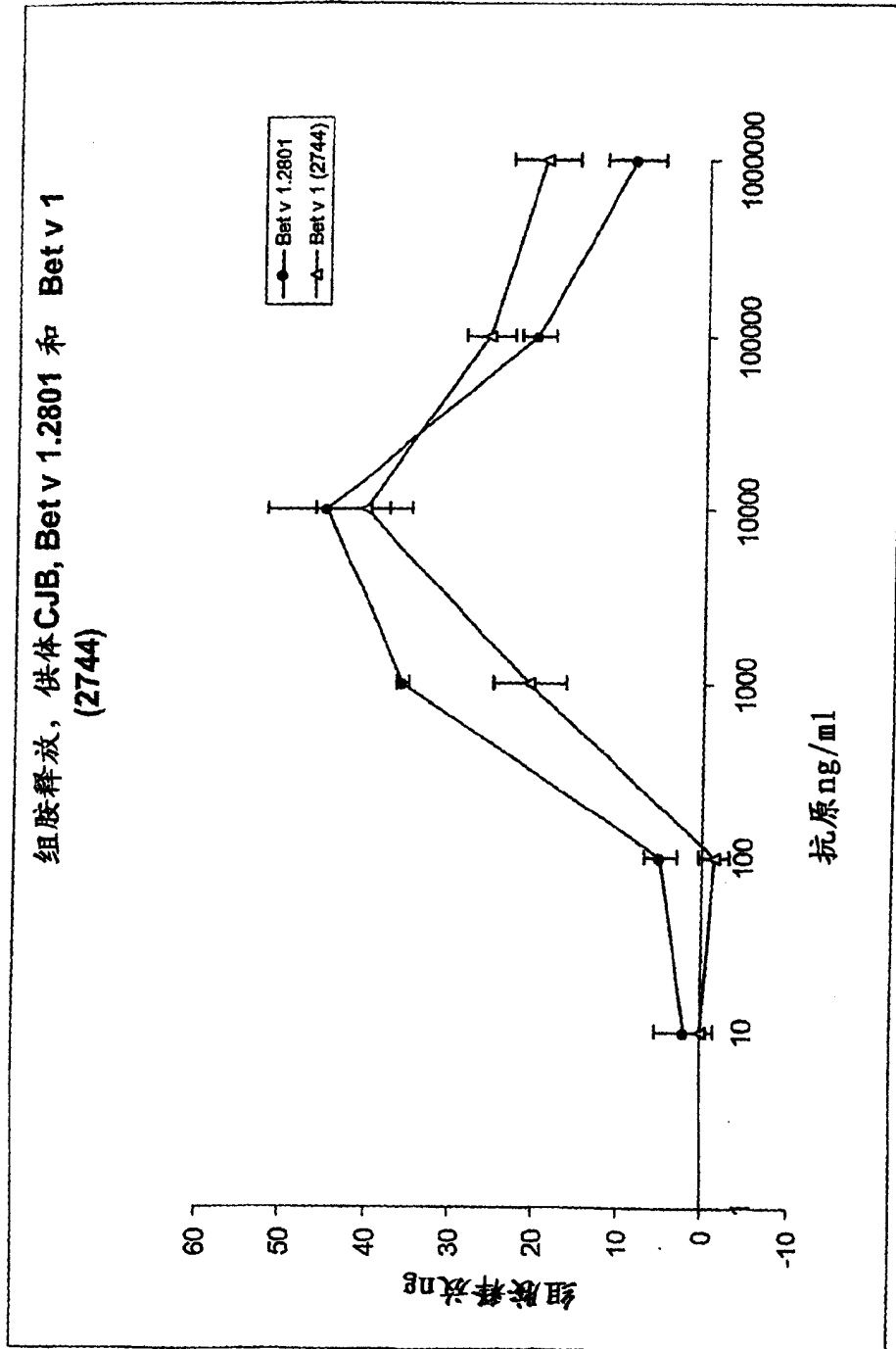


图 27D

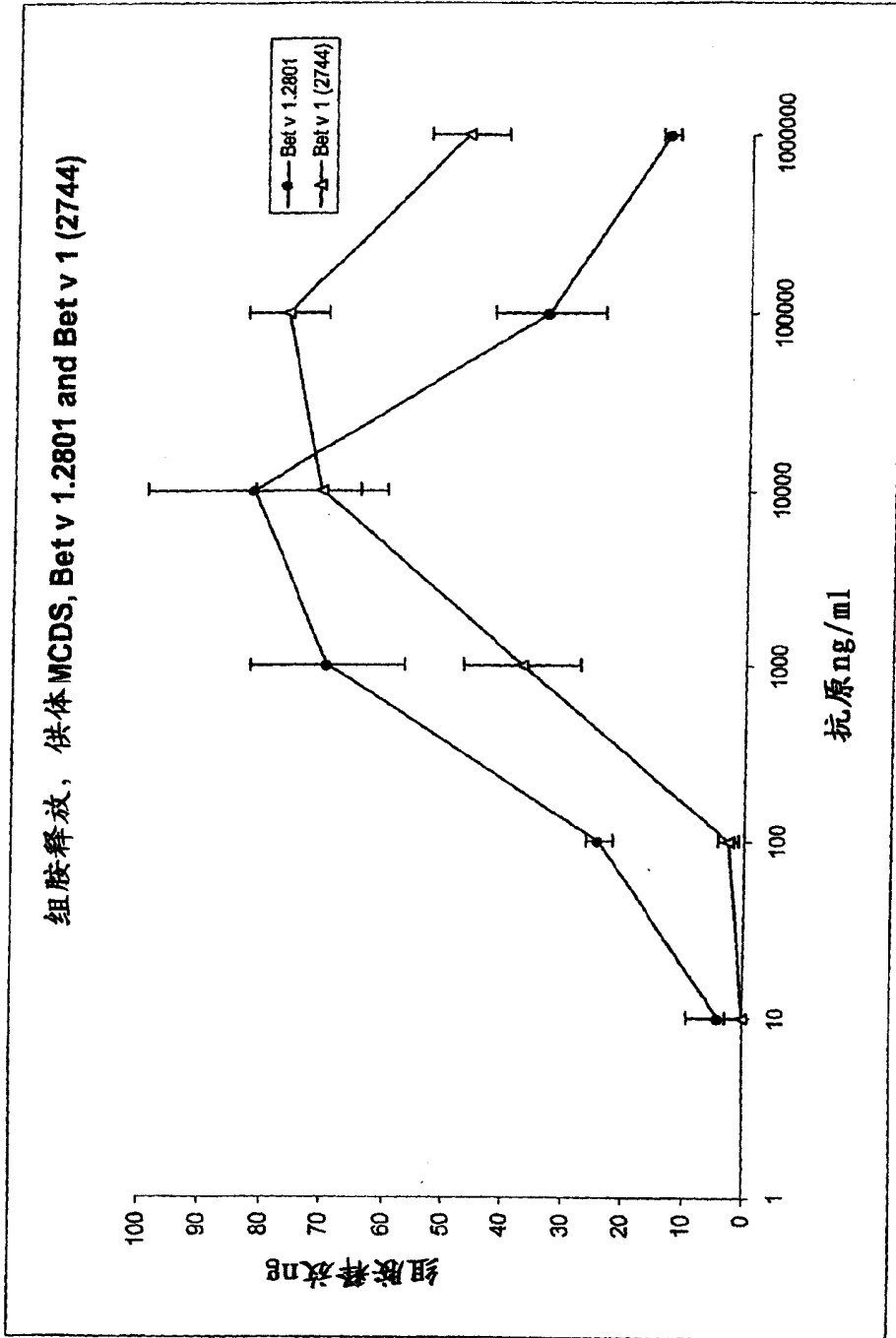


图28

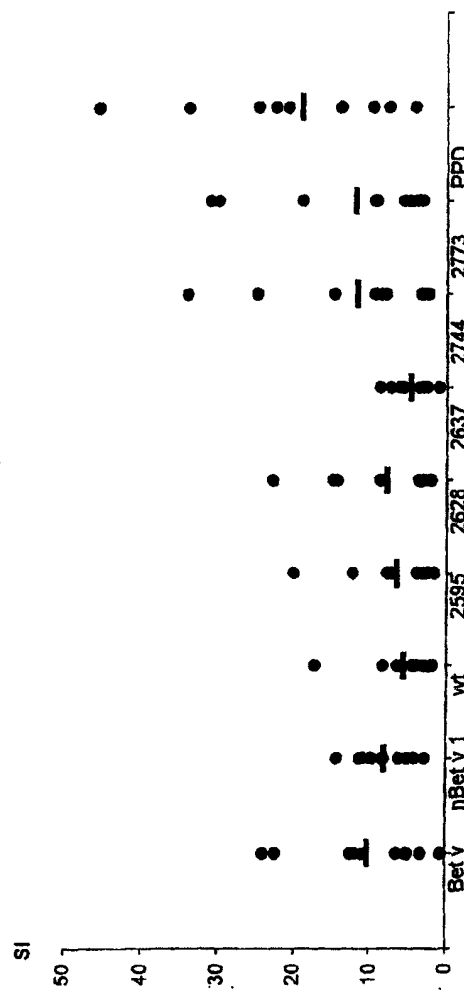
Bet v1 (2733) 分子表面的定点突变



灰色：骨架+山毛榉中95-100%保守氨基酸残基，  
黑色：定点突变；Y5V, N28T, K32Q, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K134E, R145E, D156H, +160N

图 29

PBL患者体内对Bet v1特异的增殖



Bet v1样品的刺激

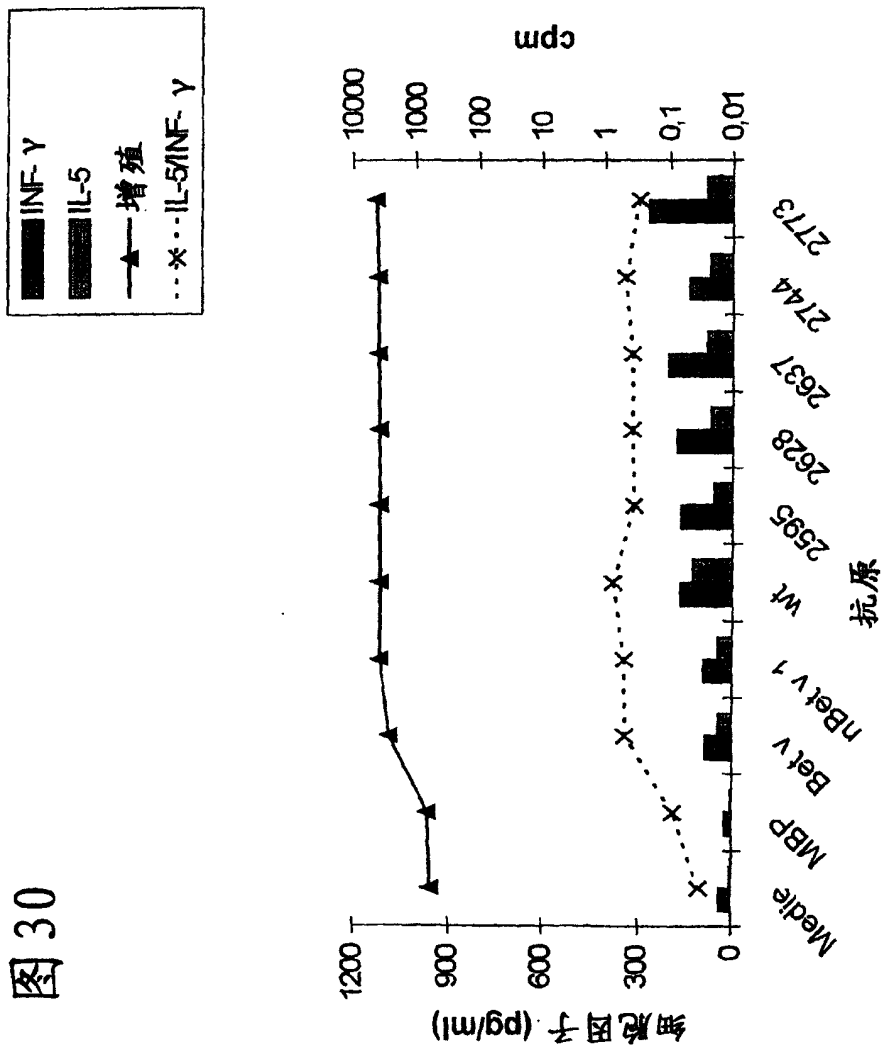
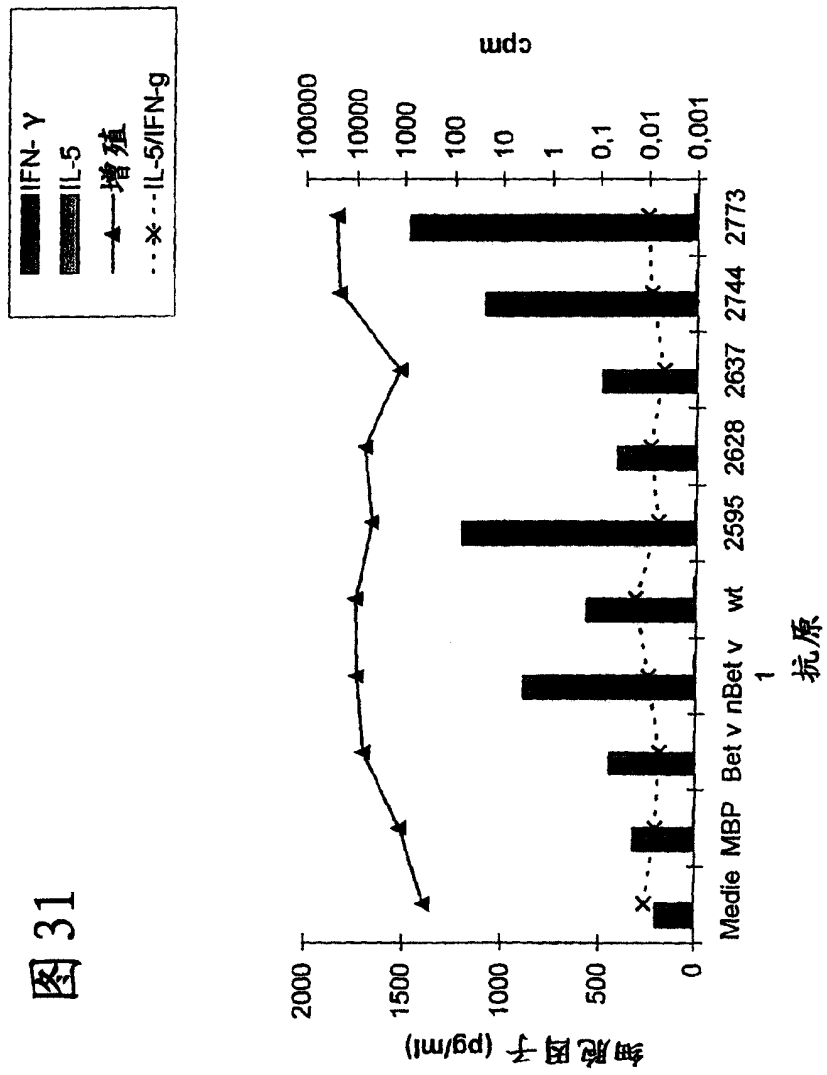
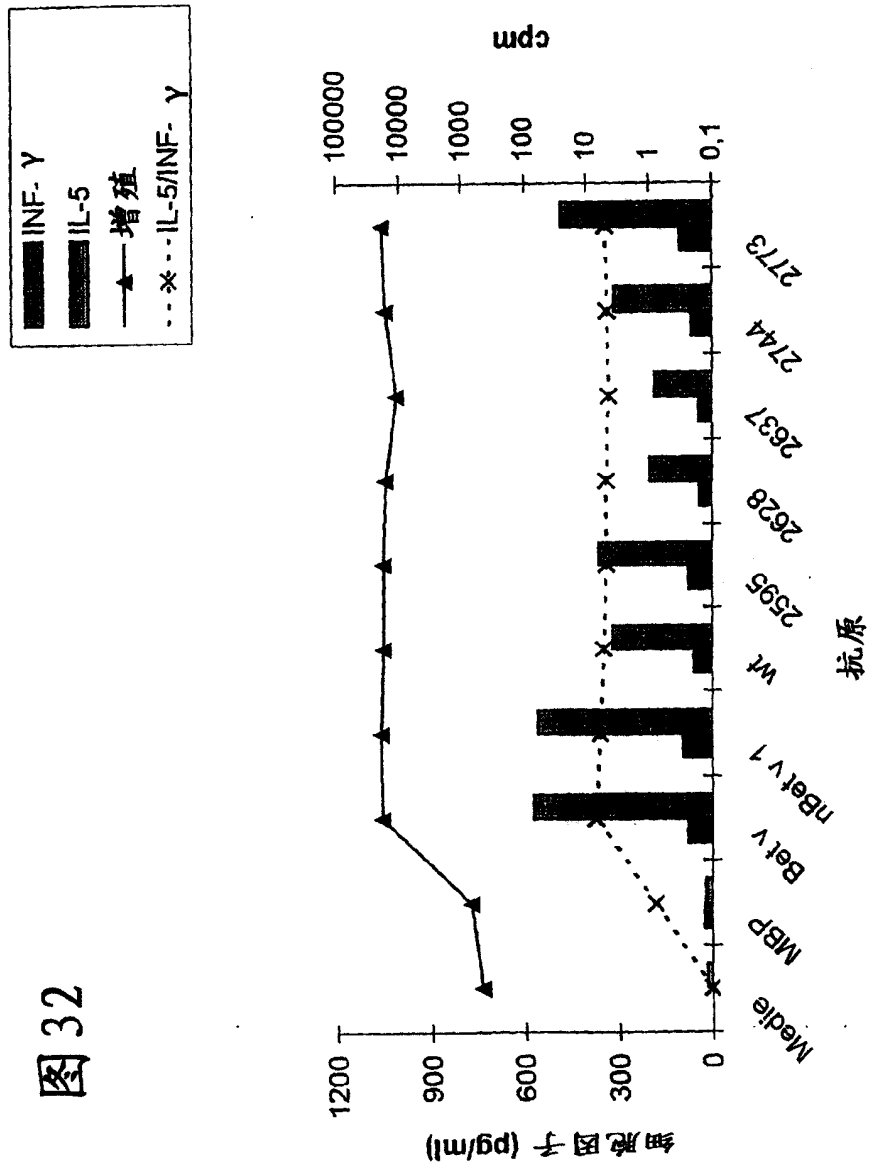


图 31





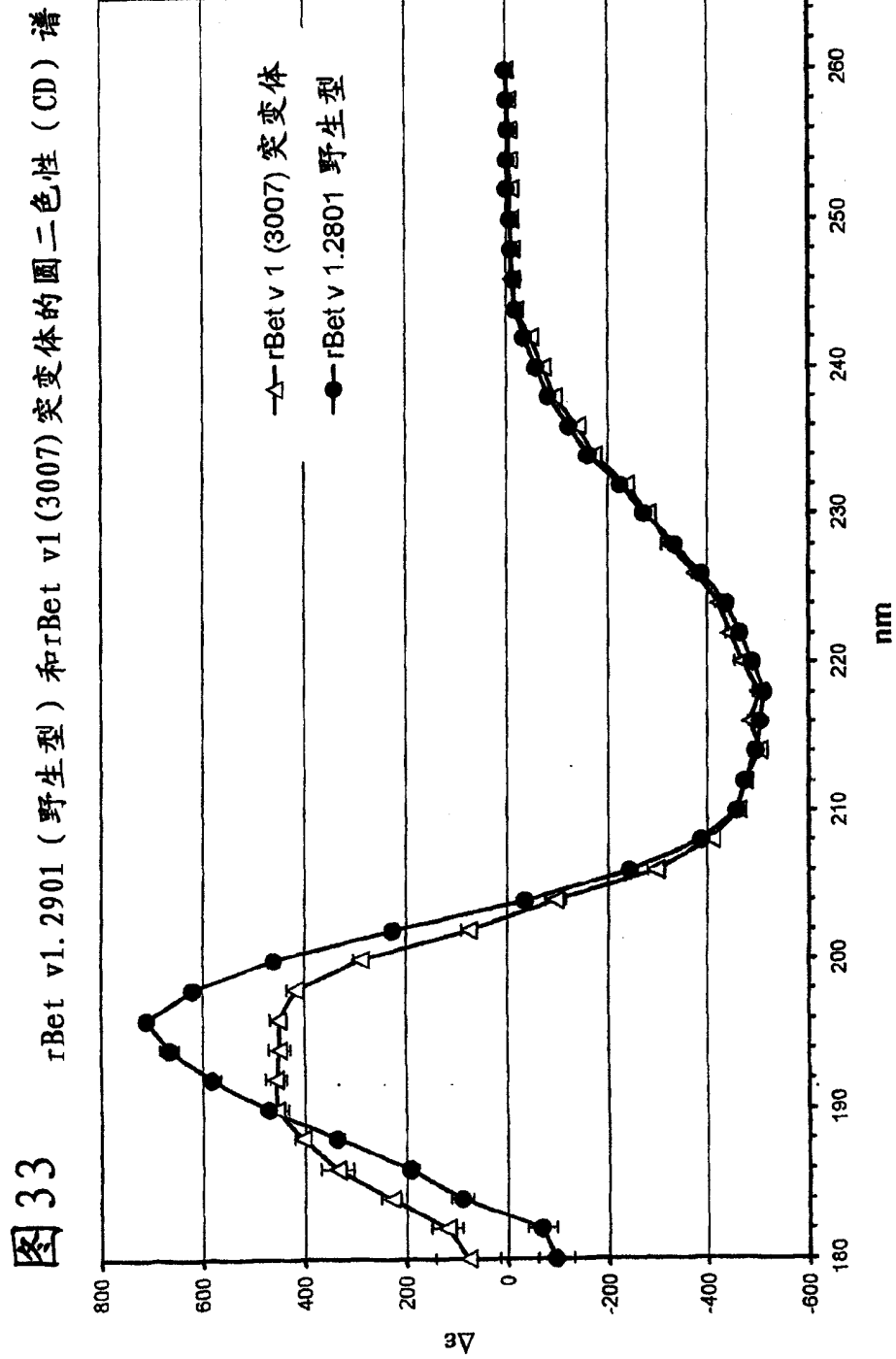


图 34

