

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01820783.9

[51] Int. Cl.

G12N 15/29 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100577804C

[51] Int. Cl. (续)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

[22] 申请日 2001.11.16 [21] 申请号 01820783.9

[30] 优先权

[32] 2000.11.16 [33] US [31] 60/249,361

[32] 2000.11.16 [33] DK [31] PA200001718

[32] 2001. 6.14 [33] US [31] 60/298,170

[86] 国际申请 PCT/DK2001/000764 2001.11.16

[87] 国际公布 WO2002/040676 英 2002.5.23

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.18

[73] 专利权人 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 H·伊普森

J·尼得加德拉尔森

M·D·斯潘格福特

[56] 参考文献

W09947680A 1999.9.23

审查员 罗 霄

[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

权利要求书 13 页 说明书 268 页 附图 68 页

[54] 发明名称

新型变态反应原突变体

[57] 摘要

本发明公开了具有多重突变及减小的 IgE 结合亲和力的新型重组变态反应原。该变态反应原是天然变态反应原的非天然存在的突变体。总的 α -碳主链的三级结构基本保守。本文也公开了制备这种重组变态反应原的方法及其用途。

1. 重组变态反应原，其特征在于它是天然存在的变态反应原的突变体，其中该变态反应原突变体具有至少 4 个初级突变，与该天然存在的变态反应原的 IgE 结合能力相比，这里的每一个突变都减少了变态反应原突变体的特异的 IgE 结合能力，其中在至少一个免疫测定中，该减少是以统计学显著的方式 ($p < 0.05$) 可测量的，其中的免疫测定应用来自对天然存在的变态反应原发生变态反应的被试者的血清；其中每一个初级突变都是用其他的残基替换一个表面暴露的氨基酸残基，在该天然存在的变态反应原所源自的分类物种中用作替换的残基不发生任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上，其中至少一个在天然存在的变态反应原中要被替换的表面暴露的氨基酸具有超过 20% 的溶剂可接近性；其中每一个初级突变都与任一其他的初级突变间隔至少 15 Å；且其中初级突变这样放置，以使得至少一个具有 800 Å² 面积的圆形表面区域不包含突变。

2. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中初级突变以 20 Å 间隔。

3. 根据权利要求 2 的重组变态反应原，其中初级突变以 25 Å 间隔。

4. 根据权利要求 2 的重组变态反应原，其中初级突变以 30 Å 间隔。

5. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其包含 1-4 个二级突变，与该天然存在的变态反应原的 IgE 结合能力相比，这其中的每一个二级突变都减少了变态反应原突变体的特异的 IgE 结合能力，其中在至少一个免疫测定中，该减少是以统计学显著的方式 ($p < 0.05$) 可测量的，其中的免疫测定应用来自对天然存在的变态反应原发生变态反应的被试者的血清；其中每一个二级突变都是用其他的残基替换一个表面暴露的氨基酸残基，在该天然存在的变态反应原所源自的分类物种中该用作替换的残基不发生任何已知同源蛋白质氨基酸序列

的相同位置上，其中至少一个在天然存在的变态反应原中要被替换的表面暴露的氨基酸具有超过 20% 的溶剂可接近性；其中的每一个二级突变也可是相同抗原决定部位的额外突变，所述抗原决定部位已有了初级突变，但位于所述圆形表面区域之外。

6. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中所述溶剂可接近性超过 30%。

7. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中所述溶剂可接近性超过 40%。

8. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中所述溶剂可接近性超过 50%。

9. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中至少一个在天然存在的变态反应原中要被替换的表面暴露的氨基酸在该天然存在的变态反应原所源自的物种中所有已知的同源蛋白质中具有保守性超过 70%。

10. 根据权利要求 9 的重组变态反应原，其中所述保守性为 80%。

11. 根据权利要求 9 的重组变态反应原，其中所述保守性为 90%。

12. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于，当比较所述重组变态反应原和天然存在的变态反应原分子的 α -碳主链三级结构时，对原子坐标的平均根方偏差低于 2Å。

13. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学属中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

14. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学亚科中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

15. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类

学科中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

16. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学总科中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

17. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学军团（legion）中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

18. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学亚目中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

19. 根据权利要求 13 的重组变态反应原，其中每一个要插入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

20. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于对突变的变态反应原的特异的 IgE 结合减少至少 5%。

21. 根据权利要求 20 的重组变态反应原，其特征在于对突变的变态反应原的特异的 IgE 结合减少至少 10%。

22. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于所述圆形表面区域包含 15~25 个氨基酸残基的原子。

23. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于将表面暴露的氨基酸残基以溶剂可接近性分级，并将处于至少 20% 的溶剂可接近性的一个或多个氨基酸替换。

24. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于将表面暴露的氨基酸残基以在该天然存在的变态反应原所源自的物种中的所有已知同源蛋白质中的保守程度分级，将处于至少 70% 保守性程度的氨基酸中的一个或多个替换。

25. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其中的变态反应原突变体是非天然存在的变态反应原。

26. 根据权利要求 1 的重组变态反应原, 其包含 5~20 个初级突变。

27. 根据权利要求 26 的重组变态反应原, 其包含 6~15 个初级突变。

28. 根据权利要求 26 的重组变态反应原, 其包含 7~12 个初级突变。

29. 根据权利要求 26 的重组变态反应原, 其包含 8~10 个初级突变。

30. 根据权利要求 1 的重组变态反应原, 其特征在于该变态反应原突变体包含 1~4 个二级突变对应每个初级突变。

31. 根据权利要求 1 的重组变态反应原, 其特征在于一个或多个替换由定点突变实现。

32. 根据权利要求 1 的重组变态反应原, 其特征在于一个或多个替换由 DNA 改组实现。

33. 根据权利要求 1 的重组变态反应原, 其特征在于它是吸入型变态反应原的突变体。

34. 根据权利要求 33 的重组变态反应原, 其特征在于它是花粉变态反应原的突变体。

35. 根据权利要求 34 的重组变态反应原, 其特征在于它是源自分类学目 *Fagales*、*Oleales* 和 *Pinales* 的花粉变态反应原的突变体。

36. 根据权利要求 35 的重组变态反应原, 其特征在于它是 *Bet v 1* 的突变体。

37. 根据权利要求 36 的重组变态反应原, 其特征在于一种或多种替换选自 V2、D72、E87、K-129、E-60、N-47、K-65、P-108、N-159、D-93、K-123、K-32、D-125、R-145、D-109、E-127、Q-36、E-131、L-152、E-6、E-96、D-156、P-63、H-76、E-8、K-134、E-45、T-10、V-12、K-20、S-155、H-126、P-50、N-78、K-119、V-2、L-24、E-42、N-4、A-153、I-44、E-138、G-61、A-130、R-70、N-28、P-35、S-149、K-103、Y-150、H-154、N-43、A-106、K-

115、P-14、Y-5、K-137、E-141、E-87 和 E-73。

38. 根据权利要求 34 的重组变态反应原，其特征在于它是源自分类学目 *Poales* 的花粉变态反应原的突变体。

39. 根据权利要求 34 的重组变态反应原，其特征在于它是源自分类学目 *Asterales* 和 *Urticales* 的花粉变态反应原的突变体。

40. 根据权利要求 33 的重组变态反应原，其特征在于它是屋尘螨变态反应原的突变体。

41. 根据权利要求 40 的重组变态反应原，其特征在于它是源自嗜皮螨属 (*Dermatophagoides*) 的螨变态反应原的突变体。

42. 根据权利要求 33 的重组变态反应原，其特征在于它是蟑螂变态反应原的突变体。

43. 根据权利要求 33 的重组变态反应原，其特征在于它是动物变态反应原的突变体。

44. 根据权利要求 43 的重组变态反应原，其特征在于它是源自猫、狗或马的动物变态反应原的突变体。

45. 根据权利要求 1 的重组变态反应原，其特征在于它是毒液变态反应原的突变体。

46. 根据权利要求 45 的重组变态反应原，其特征在于它是源自分类学目膜翅目 (*Hymenoptera*) 的毒液变态反应原的突变体。

47. 根据权利要求 46 的重组变态反应原，其特征在于它是来自分类学目胡蜂 (*Vespidae*)、蜜蜂 (*Apidae*) 和蚁 (*Formicoidae*) 的毒液变态反应原的突变体。

48. 根据权利要求 45-47 中任何一项的重组变态反应原，其特征在于它是 *Ves v 5* 的突变体。

49. 根据权利要求 48 的重组变态反应原，其特征在于一或多个替换选自 K-16、K-185、K-11、K-44、K-210、R-63、K-13、F-6、K-149、K-128、E-184、K-112、F-157、E-3、K-29、N-203、N-34、K-78、K-151、L-15、L-158、Y-102、W-186、K-134、D-87、K-52、T-67、T-125、K-150、Y-40、Q-48、L-65、K-81、Q-101、Q-208、

K-144、N-8、N-70、H-104、Q-45、K-137、K-159、E-205、N-82、A-111、D-131、K-24、V-36、N-7、M-138、T-209、V-84、K-172、V-19、D-56、P-73、G-33、T-106、N-170、L-28、T-43、Q-114、C-10、K-60、N-31、K-47、E-5、D-145、V-38、A-127、D-156、E-204、P-71、G-26、Y-129、D-141、F-201、R-68、N-200、D-49、S-153、K-35、S-39、Y-25、V-37、G-18、W-85 和 I-182。

50. 根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原的用途，用于制备预防和/或治疗变态反应的药物。

51. 包含两种或更多根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原突变体的组合物，其中每一个变体的特征在于具有至少一个这样的初级突变，该突变在至少一个其他的变体中不存在；其中对于每一个变体，在每一个所述不存在的初级突变的 15 Å 的半径之内不存在二级突变。

52. 根据权利要求 51 的组合物，包含 2~12 个变体。

53. 根据权利要求 52 的组合物，包含 3~10 个变体。

54. 根据权利要求 52 的组合物，包含 4~8 个变体。

55. 根据权利要求 52 的组合物，包含 5~7 个变体。

56. 根据权利要求 51 或 52 的组组合物的用途，用以制备预防和/或治疗变态反应的药物。

57. 药物组合物，其特征在于它包含根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原或根据权利要求 51 或 52 的组合物。

58. 根据权利要求 57 的药物组合物，其还包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

59. 根据权利要求 57 的药物组合物，其还包含佐剂。

60. 根据权利要求 57 的药物组合物，其特征在于它为抗变态反应疫苗的形式，该变态反应由天然存在的变态反应原在遭受变态反应的患者中引起。

61. 根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原、根据权利要求 51 或 52 的组合物或根据权利要求 57 或 60 的药物组合物在制备

用于在被试者中产生免疫反应的药物中的用途。

62. 根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原、根据权利要求 51 或 52 的组合物或根据权利要求 57 或 60 的药物组合物在制备疫苗中的用途。

63. 制备根据权利要求 57 或 60 的药物组合物的方法，其包含将根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原或根据权利要求 51 或 52 的组合物与药物学上可接受的物质和/或赋形剂混合。

64. 根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原、根据权利要求 51 或 52 的组合物或根据权利要求 57 或 60 中任何一项的药物组合物在制备用于在被试者中治疗、预防或减轻变态反应的药物中的用途。

65. 制备根据权利要求 1-49 中任何一项重组变态反应原的方法，其特征在于

a) 确定天然存在的变态反应原中的一些氨基酸残基，其具有至少 20% 的溶剂可接近性；

b) 以这样的方式选择至少 4 个确定的氨基酸残基，以使得每个所选氨基酸与其他所选氨基酸相互间隔至少 15 Å，且所选氨基酸以这种方式分布，以使得至少一个具有 800 Å² 面积的圆形表面区域不包含所选氨基酸；和

c) 对每个所选氨基酸进行初级突变，使变态反应原突变体的特异的 IgE 结合能力与所述天然存在的变态反应原的 IgE 结合能力相比减少，其中每个初级突变都是用其他的氨基酸替换所选氨基酸残基，前者在该天然存在的变态反应原所源自的分类学物种中不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

66. 根据权利要求 65 的方法，其特征在于以溶剂可接近性对所述确定的氨基酸残基进行分级，且将具有至少 20% 溶剂可接近性的一或多个氨基酸替换。

67. 根据权利要求 65 或 66 的方法，其特征在于选择确定的氨基酸残基，它们在该天然存在的变态反应原所源自的物种中的所有已知

同源蛋白质中以超过 70% 的一致性保守。

68. 根据权利要求 67 的方法，其特征在于以在该天然存在的变态反应原所源自的物种中的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分级，且将具有至少 70% 保守性程度的一或多个氨基酸替换。

69. 根据权利要求 65 的方法，包含选择确定的氨基酸以形成变态反应原突变体，当比较所形成的变态反应原突变体和天然存在的变态反应原分子的 α -碳主链三级结构时，对原子坐标的平均根均方偏差低于 2Å。

70. 根据权利要求 65 的方法，其特征在于对氨基酸残基的替换通过定点突变实现。

71. 制备根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原的方法，其特征在于该变态反应原从由编码相应的天然存在的变态反应原的 DNA 的进行 DNA 改组所获得的 DNA 序列生产。

72. 编码根据权利要求 1-49 中任何一项的重组变态反应原的 DNA 序列、其简并的序列或在严紧条件下与其杂交的序列，其中该简并序列或杂交序列编码具有至少一个 B 细胞抗原决定部位的肽。

73. 根据权利要求 72 的 DNA 序列，其中该序列是如下所示序列的衍生物，其中该 DNA 序列经突变而编码具有至少 4 个突变的变态反应原，这些突变选自：V2、D72、E87、K-129、E-60、N-47、K-65、P-108、N-159、D-93、K-123、K-32、D-125、R-145、D-109、E-127、Q-36、E-131、L-152、E-6、E-96、D-156、P-63、H-76、E-8、K-134、E-45、T-10、V-12、K-20、S-155、H-126、P-50、N-78、K-119、V-2、L-24、E-42、N-4、A-153、I-44、E-138、G-61、A-130、R-70、N-28、P-35、S-149、K-103、Y-150、H-154、N-43、A-106、K-115、P-14、Y-5、K-137、E-141、E-87 和 E-73。

1 (A-C)		
GGTGTGTTTAATTATGAGACTGAGACCACCTCTGTTATCCCAGCAGCTC G ACTGTTCAAG	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)		
GCCTTTATCCTTGATGGCGATAACCTCTTTCCAAAGGTTGCACCCCAAGCCATTAGCAGT	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)		
GTTGAAAACATTGAAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAAGAAGATCAGCTTTCCCGAA	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)		
GGCCTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACACAAACTTCAAA	240	
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K	80	
TACAATTACAGCGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAGATCTCCAAC	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	
GAGACACTTTTGAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAACATA	480	
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N stop	159	

74. 根据权利要求 72 的 DNA 序列，其中的序列是如下所示序列的衍生物，其中该 DNA 序列经突变而编码具有至少 4 个突变的变态反应原，这些突变选自：K-16、K-185、K-11、K-44、K-210、R-63、K-13、F-6、K-149、K-128、E-184、K-112、F-157、E-3、K-29、N-203、N-34、K-78、K-151、L-15、L-158、Y-102、W-186、K-134、D-87、K-52、T-67、T-125、K-150、Y-40、Q-48、L-65、K-81、Q-101、Q-208、K-144、N-8、N-70、H-104、Q-45、K-137、K-159、E-205、N-82、A-111、D-131、K-24、V-36、N-7、M-138、T-209、V-84、K-172、V-19、D-56、P-73、G-33、T-106、N-170、L-28、T-43、Q-114、C-10、K-60、N-31、K-47、E-5、D-145、V-38、A-127、D-156、E-204、P-71、G-26、Y-129、D-141、F-201、R-68、N-200、D-49、S-153、K-35、S-39、Y-25、V-37、G-18、W-85 和 I-182。

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

75. 根据权利要求 72 的 DNA 序列, 其中的序列是如下所示序列的衍生物, 其中的 DNA 序列经突变而编码具有至少 4 个突变的变态反应原, 这些突变选自: R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109 和 R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109 和 K-15,

DNA 序列

Der p 2 (以 SWISSPROT 序号 P49278 注示符指示 DNA 序列)

起点

```

1   cacaaattct tctttctcc ttactactga tcattaatct gaaaacaaaa ccaaacaac
61   cattcaaaat gatgtacaaa atttgtgtc tticattggt ggtcgcagcc gttgctcgtg
121  atcaagtcca tgtcaaagat tgtgccaalc atgaaatcaa aaaagtttg gtaccaggat
181  gccatgggtc agaaccatgt atcattcalt gtggtaaacc attccaattg gaagccggtt
241  tgaagccaa ccaaaacaca aaaacggcta aaattgaaat caaagcctca atcgatgggt
301  tagaagtga tgttcccggt atcgatccaa atgcatgcca ttacatgaaa tgcccattgg
361  ttaaaggaca acaataatgat attaaatata catggaaigt tccgaaaatt gcaccaaatt
421  ctgaaaatgt tgtcgtcact gttaaagtta tgggtgatga tgggttttg gctgtgcta
481  ttgctactca tgctaaaalc cgcgattaaa tcaaacaaaa ttattgatt tigtatcac
541  aatgatiga ttttcttcc aaaaaaaaaa taataaaaat ttgggaatt c

```

氨基酸序列

Der p 2 (序号 P49278 SWISSPROT; 包括信号肽1-17)

```

1   mmykilclsl lvaavardqv dvkdcanhei kkvlpvgchg sepciihrgk pfqlaavfea
61  nqntktakie ikasidglev dvpgidpnac hymkcpivkg qqydikytwn vpkiapksen
121 vvvtkvmgd dgvlacaiat hakird

```

76. 包含根据权利要求 72-75 中任何一项的 DNA 的表达载体。

77. 包含权利要求 76 的表达载体的宿主细胞。

78. 生产重组变态反应原突变体的方法，该方法包含培养根据权利要求 77 的宿主细胞的步骤。

79. 根据权利要求 1-49 中任何一项或由根据权利要求 72-75 中任何一项的 DNA 序列编码的重组变态反应原，其包含至少一种 T 细胞抗原决定部位，该抗原决定部位能够刺激特异于该天然存在的变态反应原的 T 细胞克隆或 T 细胞系。

新型变态反应原突变体

发明领域

本发明涉及天然变态反应原的突变体，新型重组变态反应原。本发明也涉及包含该新型重组变态反应原突变体的混合物的组合物。更进一步，本发明涉及制备这种重组变态反应原突变体的方法以及包含该重组变态反应原突变体的药物组合物，包括疫苗。在进一步的实施方案中，本发明涉及在被试者中产生免疫反应的方法、涉及对被试者接种疫苗或治疗以及制备本发明的组合物的方法。

发明背景

遗传诱发的个体对源于各种环境来源的抗原以及对该个体所暴露的变态反应原变得过敏（变态反应）。当先前过敏的个体再次遭受同样或同源的变态反应原时发生变态反应。响应于如蜜蜂或大黄蜂刺痛或昆虫叮咬，变态反应的范围为从枯草热、rhinoconductivitis、鼻炎和气喘到全身过敏反应及死亡。该反应是立即发生的，且可由各种特异反应性的变态反应原导致，如源于草、树、野草、昆虫、食物、药品、化学品和香料等。

然而，当个体初次遭受变态反应原时不发生该反应。初始的适应性反应耗费时间且一般不导致任何症状。但当已经生产了能够与变态反应原反应的抗体和 T 细胞时，任何随后的暴露都可引起症状。因而，变态反应证明免疫反应本身能够导致显著的病理学状态，其可威胁生命。

涉及在特异反应性变态反应中的抗体主要属于 IgE 类的免疫球蛋白。IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的特异性受体结合。在特

异性变态反应原与结合肥大细胞的 IgE 形成复合物之后，在细胞表面交联的受体导致通过受体的信号传导和目的细胞的生理学反应。脱粒导致释放缺席的组胺、肝素、嗜曙红白细胞的一种趋化因子、白三烯 C4、D4 和 E4，它们导致了支气管平滑肌细胞收缩延长。所导致的作用可能为全身性或局部性。

抗体介导的过敏性反应可分为 4 类，即类型 I、类型 II、类型 III 和类型 IV。类型 I 变态反应是在抗原暴露之后数秒或数分钟之内发生的典型的即时过敏反应。这些症状由变态反应原特异的 IgE 所介导。

通常观察到的变态反应是作为对蛋白质变态反应原的反应，这些蛋白质变态反应原存在于如花粉、房屋尘螨、动物毛发和头皮屑、毒液和食物产品中。

为了减少或消除变态反应，通常使用谨慎控制并重复给药的变态反应疫苗。变态反应疫苗接种传统上是以渐增的剂量在一个相当长的时期内通过肠胃外、鼻内或舌下给药方式进行，且导致患者脱敏。精确的免疫学机制尚未知道，但认为在变态反应原特异的 T 细胞表型中诱导的差异特别重要。

变态反应疫苗接种

疫苗接种的概念基于免疫系统的两个基本特征，即特异性和记忆。疫苗接种将使受者的免疫系统预先准备好，且在重复暴露在相似的蛋白质中时该免疫系统将能够对如微生物感染产生更加剧烈的反应。疫苗是疫苗接种中用于在受者中产生这种保护性免疫反应的蛋白质的混合物。该保护将仅包含存在于疫苗和同源抗原中的成分。

与其他类型的疫苗接种相比较，变态反应疫苗接种由于在变态反应患者中存在正在进行的免疫反应而是复杂。该免疫反应特征在于当暴露于变态反应原时存在介导变态反应症状释放的变态反应原特异的 IgE。因而，利用来自于天然来源的变态反应原的变态反应疫苗接种具有固有的副作用的危险，其最大的结果甚至威胁患者生命。

避免这个问题的方法可分为三类。实际上经常组合使用超过一类的方法。第一类方法包括在延长的时间内给药几种小剂量以达到相当的累积剂量。第二类方法包括通过将变态反应原掺入到凝胶物质如氢氧化铝中而对变态反应原进行物理修饰。氢氧化铝制备物具有减小活性变态反应原成分的组织浓度的缓慢变态反应原释放的佐剂作用及贮存作用。第三类方法包括目的在于减少变态反应性即 IgE 结合的变态反应原的化学修饰。

成功的变态反应疫苗接种的详细机制仍有争议。然而，一致认为 T 细胞在免疫反应的全面调节中发挥了关键的作用。根据目前的一致意见，T 细胞表型的两个极端即 Th1 和 Th2 决定了个体的变态反应状态。当用变态反应原刺激时，Th1 细胞分泌以干扰素- γ 为主的导致保护性免疫的白细胞介素，则个体是健康的。另一方面，Th2 细胞主要分泌导致 IgE 合成和嗜嗜红性的白细胞介素 4 和 5，则个体发生变态反应。体外研究显示通过用衍生自含有相关的 T 细胞抗原决定部位的肽的变态反应原免疫激发可能改变变态反应原特异的 T 细胞的反应。因此目前对新变态反应疫苗的研究主要是基于影响 T 细胞，其目的在于使 T 细胞沉默（诱导无反应性）或将 Th2 表型的反应转变为 Th1 表型的。

结合抗体的抗原决定部位（B-细胞抗原决定部位）

对 Fab-抗原复合物的 X-射线晶体学分析已经增加了对抗体-结合的抗原决定部位的理解。根据该类分析抗体-结合的抗原决定部位可定义为包含来自 15~25 个氨基酸残基的原子的抗原表面部分，它们处在与能直接相互作用的抗体原子的一定距离之内。抗原-抗体相互作用的亲和力不能单从由范德瓦耳斯相互作用、氢键或离子键贡献的焓来预测。与水分子几乎完全从界面排除相关的熵代表了大小相似的能量贡献。这意味着相互作用分子外形之间的正确配合是抗原-抗体高亲和力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, 该蛋白质分子与亲代蛋白质相比在氨基酸序列中具有特异性突变的分布。从说明书中可知, 看来该发明涉及生产与亲代蛋白质相比被修饰的类似物, 但它们以与亲代蛋白质 (天然存在的变态反应原) 相似的方式被吸收、消化及呈递给 T 细胞。因此, 获得了修饰的 T 细胞反应。修饰的蛋白质文库用称为 PM (简约原则诱变) 的技术来制备。

在 WO 92/02621 (参考文献 2) 中, 描述了重组 DNA 分子, 该分子包含编码具有至少一个 *Fagales* 目树木变态反应原的抗原决定部位多肽的 DNA, 该变态反应原选自 *Aln g 1*、*Cor a 1* 和 *Bet v 1*。在此处描述的重组分子都具有与天然发生的变态反应原的序列相应的氨基酸序列或部分氨基酸序列。

WO 90/11293 (参考文献 3) 在理论上涉及分离的豚草 (ragweed) 花粉的变态反应肽和修饰的豚草花粉肽。在此处公开的肽具有与天然存在的变态反应原或其天然存在的同种型相应的氨基酸序列。

变态反应原的化学修饰

已经采取了几种对变态反应原化学修饰的方法。七十年代早期的方法包括将变态反应原与聚合物化学偶联和用甲醛等化学交联变态反应原, 从而形成所谓的“类变态反应原 (allergoid)”。这些方法背后的基本原理是通过附加化学配体而造成的 IgE 结合的抗原决定部位的随机破坏, 因而在通过增加的复合物分子量维持免疫原性同时减少了 IgE-结合。“类变态反应原”生产的固有缺点与在控制化学交联方法中的困难及在对结果所得的高分子量复合物的分析和标准化中的困难有关。“类变态反应原”目前做临床应用, 且由于 IgE 结合的抗原决定部位的随机破坏, 与常规疫苗相比可以应用高剂量, 但其安全和效力参数并没有比常规疫苗的应用有改进。

对变态反应原的化学修饰的更新方法目标在于对变态反应原三

级结构的整体破坏从而消除 IgE 的结合，这里假定基本的治疗目标是变态反应原特异的 T 细胞。这样的疫苗包含由变态反应原序列，其衍生自代表最小的 T 细胞抗原决定部位的合成肽、代表连接的 T 细胞抗原决定部位的较长的肽、较长的变态反应原序列，其衍生自代表免疫决定 T 细胞抗原表位区域的合成肽或被重组技术切割成两个半分子的变态反应原分子。另一个基于该基本原理的方法建议使用“低 IgE 结合”重组同种型。最近几年中已经明确天然的变态反应原是异质性的，其含有氨基酸约达 25% 被替换的异变态反应原 (isoallergen) 和变体。已发现一些重组异变态反应原可能由于不可逆的变性及因此导致的三级结构的整体破坏而具有较低的 IgE 结合效力。

体外诱变和变态反应疫苗接种

已经用几种变态反应原进行了通过体外定点突变来减少变态反应性的尝试，包括 Der f 2 (Takai 等人，参考文献 4)，Der p 2 (Smith 等人，参考文献 5)，一个 39 kDa 的粉尘螨 (*Dermatophagoides farinae*) 变态反应原 (Aki 等人，参考文献 6)，蜜蜂毒液磷脂酶 A2 (Förster 等人，参考文献 7)，Ara h 1 (Burks 等人，参考文献 8)，Ara h 2 (Stanley 等人，参考文献 9)，Bet v 1 (Ferreira 等人，参考文献 10 和 11)，桦木抑制蛋白 (Wiedemann 等人，参考文献 12) 和 Ory s 1 (Alvarez 等人，参考文献 13)。

这些方法背后的基本原理再次针对变态反应原特异的 T 细胞而同时减少 IgE 介导的副作用危险，这是通过破坏重组变态反应原突变体的三级结构减少或消除 IgE 结合。这些方法背后的基本原理不包括主要 IgE 结合抗原决定部位的概念且不包括起始也涉及 B-细胞和抗体产生的新的保护性免疫反应的概念。

Ferreira 等人 (参考文献 11) 的文章描述了目的在于减少 IgE 结合的定点突变的应用。尽管在文中提到了 Bet v 1 的三维结构，但

作者未用该结构对暴露在溶剂中的氨基酸残基做突变预测，其中一半的残基具有低程度的溶剂暴露。相反，他们应用了一种发展来用于在与对此处描述的基于确定保守表面区域的结构概念不同的蛋白质功能残基的预测方法。尽管作者确实讨论了 α -碳主链的三级结构的保守性，但是该概念不是治疗策略的部分，而仅仅是包含在体外 IgE 结合的估计中。另外，出示的证据不足，因为 CD-谱的归一化阻碍估计样品的部分变性，这是一个普遍的问题。所述治疗策略目标在于对变态反应原特异性 T 细胞诱导耐受性且没有提到起始新免疫反应。

Wiedemann 等人（参考文献 12）的文章描述了定点突变的应用和用于单克隆抗体抗原决定部位表征的肽合成。作者拥有抗原三级结构的知识，而且他们用这些知识选择了一个表面暴露的氨基酸进行突变。可以说所用的算法是与本发明者所描述的算法相反的，因其选择了与同源序列有差异的氨基酸。该研究证明表面暴露的氨基酸的替换具有修饰单克隆抗体的结合特征的能力，考虑到一般的知识这并不令人惊讶。所述实验不是设计来估计对多克隆抗体如变态反应患者的血清 IgE 结合的调制。包含的一个实验的确应用了 IgE，且尽管该实验不适于数量评估，但 IgE 的结合看来没有受发生的突变的影响。

Smith 等人（参考文献 5）的文章描述了用于单克隆抗体抗原决定部位的作图和减少 IgE 结合的定点突变的应用。作者没有三级结构的知识，且他没有尝试估价 α -碳主链的三级结构的保守性。所用的算法不能确保选择用来进行突变的氨基酸是事实上暴露于分子表面。只有一个所述突变体导致 IgE 结合真正减少。该突变体在对所有检验的抗体的结合中都有缺陷，这显示其三级结构被破坏。作者没有定义治疗策略，且没有提到起始新免疫反应。

Colombo 等人（参考文献 14）的文章描述了通过应用定点突变和肽合成对 IgE 结合抗原决定部位的研究。作者应用基于同源蛋白质的晶体结构的三维电脑模型结构来阐明存在于分子表面的抗原决定部位。抗原决定部位在显示一级结构同源的不同变态反应原上进一步的存在是用代表抗原决定部位的合成肽来陈述的。治疗策略是基于应用

该代表单价 IgE 结合抗原决定部位的合成肽进行治疗。没有提到同源变态反应原之间保守的表面区域以及起始一种新的保护性免疫反应的治疗概念。

Spangfort 等人（参考文献 15）的文章描述了主要桦木变态反应原三维结构和保守表面暴露的区块。文章没有提到主要 IgE 结合抗原决定部位，也没有提到定点突变，也没有陈述治疗应用。

上述的研究中没有一个关于由替换表面暴露的氨基酸同时保持 α -碳主链的三级结构而减少 IgE 结合。上述方法背后的基本原理没包括主要 IgE 结合抗原决定部位的概念，且它不包括起始一种新保护性免疫反应的治疗概念。

WO 99/47680 公开了在维持变态反应原的 α -碳主链三级结构同时，向确定的关键性位置引入人工氨基酸替换。具体地，WO 99/47680 公开了一种重组变态反应原，它是衍生自天然存在的变态反应原的非天然存在的突变体，其中至少一种表面暴露的 B 细胞抗原决定部位的保守氨基酸残基是由另一种残基替换的，在该天然存在的变态反应原所源自的分类目中该残基不存在于任何已知同源蛋白质氨基酸序列中的相同位置上，该变态反应原突变体具有基本与该天然存在的变态反应原相同的 α -碳主链三级结构，且对突变的变态反应原的特异的 IgE 结合与对该天然存在的变态反应原的结合相比是减少的。

在 WO 99/47680 中公开的重组变态反应原通过以下途径可得到：a) 在天然存在的变态反应原中确定氨基酸残基，该变态反应原是保守的，其在该天然存在的变态反应原所源自的分类目中的所有已知的同源蛋白质中以超过 70% 的一致性保守，b) 确定至少一片区域的保守氨基酸残基，它们在变态反应原分子的三维表面上至少 $400 \text{ \AA}^2$ 的面积上互相连接，该小片区域由具有至少 20% 的溶剂可接近性所定义，其中至少一个区域包含至少一个 B 细胞抗原决定部位，和 c) 在至少一个区域用另一个氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基，该新残基在该特别位置不保守，但基本保持了该变态反应原分子的 α -碳主链三级结构。

附图简述

图 1 表示用于 *Bet v 1* 突变体 1 号的突变体特异性寡核苷酸引物。突变的核苷酸以下划线表示。

图 2 表示两个合成并用于所有突变体的一般可适用的引物（以“全有义的”和“全无义的”标明）。

图 3 表示天然存在的变态反应原 *Bet v 1* 和许多 *Bet v 1* 突变体的 DNA 和氨基酸序列。

图 4 表示通过非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* Glu45Ser 突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 5 表示通过非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 6 表示通过非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 7 表示通过非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* 突变体 Glu60Ser 抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 8 表示重组和三重区块突变体的 CD 谱，以接近相等的浓度记录。

图 9 表示通过非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* 三重区块突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 10 表示单独比对的抗原 5 残基和黄胡蜂属 (*Vespula*) 抗原 5 序列（左面部分）的溶剂可接近性。在图 10 的右图版显示了在黄胡蜂抗原 5: s 中具有保守区域的抗原 5 的分子表面。

图 11 表示相应于由有义链衍生的 *Ves v 5* 氨基端的引物序列。下游引物的序列从无义链衍生。

图 12 表示两个合成并用于所有突变体的一般可适用的引物（以“全有义的”和“全无义的”表示）。

图 13 表示天然存在的变态反应原 *Ves v 5* 以及 2 个 *Ves v 5* 突变体的 DNA 和氨基酸序列。

图 14 表示通过非生物素化的 *Ves v 5* 和 *Ves v 5* 突变体 Lys72Ala 抑制生物素化的重组 *Ves v 5* 与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 15 表示变态反应原和肥大细胞之间通过 IgE 交联的反應的理论模型。

图 16 表示天然存在的变态反应原 *Der p 2* 的 DNA 和氨基酸序列。

图 17 示意性地表示用于产生突变的引物。（I）表示有义和反义引物。（II）表示在显示的位置含有突变的最终重组蛋白质。

图 18 表示对构建 Bet v 1 突变体的说明和所用引物的列表。该突变体含有 5 到 9 个氨基酸。

图 19 表示在 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 表面引入的点突变。在突变体 Bet v 1 (2628) 中，在 Bet v 1 的一半中引入了 5 个初级突变而另一半没有改变。在突变体 Bet v 1 (2637) 中，在另一半中引入了 5 个初级突变和 3 个二级突变，而第一半没有改变。

图 20 表示以几乎相等的浓度记录的重组 Bet v 1.2801（野生型）和 Bet v 1 (2637) 突变体的圆二色（CD）谱。

图 21 表示通过非生物素化的 Bet v 1.2801 和通过 Bet v 1 (2628)、Bet v 1 (2637) 及 Bet v 1 (2628) 与 Bet v 1 (2637) 的 1: 1 混合物抑制生物素化的重组 Bet v 1.2801（野生型）与来自变态反应患者群体的血清 IgE 结合。

图 22 表示人 Bet v 1.2801（野生型）、Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 23 表示人 Bet v 1.2801 (野生型)、Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 24 表示 Bet v 1 (2744) 表面的点突变。

图 25 表示 Bet v 1 (2753) 表面的点突变。

图 26 表示 Bet v 1 (2744) 和 Bet v 1 (2753) 表面的点突变。

图 27 表示以几乎相等的浓度记录的 Bet v 1.2801 (野生型) 和 Bet v 1 (2744) 的圆二色 (CD) 谱。

图 28 表示人 Bet v 1.2801 (野生型) 和突变体 Bet v 1 (2744) 嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 29 表示人 Bet v 1.2801 (野生型) 和突变体 Bet v 1 (2744) 嗜碱性粒细胞中的组胺释放。

图 30 表示 Bet v 1 (2733) 表面的点突变。

图 31 表示用于对 Der p 2 进行定点突变的引物。

图 32 表示 Der p 2 与其他类群 2 屋尘螨变态反应原的序列比对。

图 33 从 4 个不同角度表示 Der p 2 的表面外形。

图 34 从 4 个不同角度表示 Der p 2 突变体的表面外形。

图 35A 和 B 表示 Der p 1 与其他类群 1 屋尘螨变态反应原的序列比对。

图 36 从 4 个不同角度表示 Der p 1 的表面外形。

图 37 从 4 个不同角度表示 Der p 1 突变体的表面外形。

图 38A-D 表示 Phl p 5 与其他类群 5 草变态反应原的序列比对。

图 39A 和 B 分别从 4 个不同角度表示 Phl p 5 模型 A 和模型 B 的表面外形。

图 40A 和 B 分别从 4 个不同角度表示 Phl p 5 突变体模型 A 和 B 的表面外形。

图 41 表示表达为各种 Bet v 1 制备物的刺激指数 (Stimulation Index, SI) 的外周血淋巴细胞的增殖。

图 42-44 表示用各种 Bet v 制备物刺激的 T 细胞的细胞因子的概

况。图 42 表示具有 Th0 状况的患者，图 43 表示 Th1 状况，图 44 表示 Th2 状况。

发明目的

本发明背后的基本原理

本发明基于独特的基本原理。根据此基本原理，成功的变态反应原免疫接种机制不是改造进行中的 Th2-类型免疫反应，而是平行地起始一种新的涉及 B-细胞识别三级抗原决定部位和抗体形成的免疫反应。现已相信该新的免疫反应部分属于 Th1-类型免疫反应。该模型由于观察到特异 IgE 水平不受成功的免疫接种治疗的影响而得到支持，且成功的治疗经常是伴随变态反应原特异的 IgG4 的真正增加。另外，在变态反应原攻击前后的鼻活组织检查中没有显示具 Th2-样表型的 T 细胞的减少，而是观察到 Th1-样 T 细胞的增加。当将疫苗（或药物组合物）通过除呼吸道之外的其他途径给药时，假定该新的免疫反应在与正在进行的 Th2 反应物理相分隔的位置上发展，因而使得两个反应得以平行存在。

免疫系统的另一个重要方面是所谓的主要 IgE 结合抗原决定部位存在的确定。有人提出这些主要 IgE 结合抗原决定部位是由三级结构依赖的连续表面区域构成，该区域大小足够大容纳抗体结合，且在异变态反应原、变体和/或来自相关物种的同源变态反应原中保守。能够在同源变态反应原上结合相似抗原决定部位的交叉反应性 IgE 的存在得到了临床观察的支持，即变态反应患者经常对几种密切相关的物种反应，如桉木、桦木和榛子，多种草本物种，或嗜皮螨属（*Dermatophagoides*）的几个物种。此外，它得到了实验室实验的支持，该实验证明了来自相关物种的同源变态反应原之间的 IgE 交叉反应性及一种变态反应原抑制 IgE 结合同源变态反应原的能力（Ipsen 等人，1992，参考文献 16）。众所周知，暴露和免疫反应以剂量依

赖的方式相关。结合这些观察，可假定保守的表面区域暴露于免疫系统的剂量比不保守的表面区域更高，导致具有更高亲和力的 IgE 抗体的产生，因此有了术语“主要 IgE 结合抗原决定部位”。

根据这个基本原理，必要的是变态反应原具有与天然变态反应原基本上相同的 α -碳主链三级结构，因而确保围绕保守区块的区域表面拓扑学的保守性，这些区域代表了旨在减少 IgE 结合的诱变目标。通过实现这些标准，变态反应原有潜力以相对较高的剂量施用以改善其效力，即产生一种保护性的免疫反应而不损害安全性。

此外，本发明基于如下发现，即变态反应症状由 IgE 通过高亲和力的受体 FcεR1 在效应细胞即肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 2 个特异的结合所导致的变态反应交联引起。为了说明，我们参考图 15，它描述了具有 IgE 结合抗原决定部位的变态反应原的理论模型。诱导中介体从肥大细胞释放及因此产生的变态反应症状由变态反应原所介导的结合于肥大细胞表面的 IgE 所致，参考图 15A。在图 15B 所示的情况下，两个抗原决定部位已经发生突变以减少它们的 IgE 结合亲和力，并因此防止了变态反应原介导的交联。在这种联系中应该注意到变态反应原通常包含超过 3 个的 B 细胞抗原决定部位。然而，从图 15 中描述的理论状况下可假定发生的以消除或减少其 IgE 结合能力的抗原决定部位的突变越多，那么变态反应原介导的交联和结果所得的变态反应症状的危险就越低。

然而，为了使突变的变态反应原能够引起新的免疫反应，包括 IgG 反应，变态反应原必须包含至少一个未变的抗原决定部位。优选，未变的抗原决定部位是主要的抗原决定部位，因为这样的突变变态反应原用于疫苗接种时将提供改善的保护。

总之，本发明的发明思想基于如下认识，即具有在多重 B 细胞抗原决定部位中减少 IgE 结合的突变的变态反应原突变体和至少一种未变的抗原决定部位将一方面减少变态反应原介导的交联，另一方面允许引起具有与 IgE 竞争的结合能力的 IgG 反应。因而，该变态反应原突变体组成了一种非常有利的变态反应原，这里过敏性的反应的危

险将大大减少。

本发明也基于如下认识，即包含不同这样的变态反应原突变体的混合物的疫苗，其中许多或全部抗原决定部位都理想地表现为未变化，在其诱导对变态反应症状的保护的能力上具有与天然存在的变态反应原相同的效力，其中从天然的变态反应原衍生了该变态反应原突变体。

发明概述

本发明涉及向一些确定的关键位点，即 IgE 结合的抗原决定部位引入人工的氨基酸替换，目的在于减少每个突变的抗原决定部位的特异的 IgE 结合能力。

本发明提供了重组变态反应原，其特征在于它是天然存在的变态反应原的突变体，其中变态反应原突变体具有至少 4 个初级突变，与该天然存在的变态反应原的 IgE 结合能力相比，这每一个突变都减少了变态反应原突变体的特异的 IgE 结合能力；其中每一个初级突变都用其他的残基替换一个表面暴露的氨基酸残基，在该天然存在的变态反应原所源自的分类学物种中该新残基不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上；其中每一个初级突变都与任一其他初级突变间隔至少 15 Å；且其中初级突变以这种方式分布，以使得至少一个具有 800 Å² 面积的圆形表面区域不包含有突变。

如果不受理论的限制，相信 B 细胞抗原决定部位可分布在变态反应原的几乎整个表面。此外，有实验证据表明至少一些抗原决定部位组成了包含大量交迭抗原决定部位的抗原决定部位簇的一部分。因此，本发明的理论基础即为任何表面暴露的氨基酸都构成突变的潜在位点，其可导致降低特异地结合 IgE 的能力。

因此，初级突变是由它们相互的定位而确定，即它们相互隔开，以确保它们是分离的抗原决定部位簇中的突变。

本发明也提供包含两或多种根据权利要求 1 的重组变态反应原突

变体的组合物，其中每一个变体都是通过具有至少一个主要突变而定义，该突变在至少一个其他的变体中不存在；其中对于每一个变体而言在每一个不存在的初级突变的 $15 \text{ \AA}$ 的半径之内不存在二级突变。该组合物优选包含 2~12 个，更优选 3~10 个，更优选 4~8 个且最优选 5~7 个变体。

本发明也提供制备根据权利要求 1 的重组变态反应原的方法，其特征在于

a) 在天然存在的变态反应原中确定一些氨基酸残基，它们具有至少 20% 的溶剂可接近性；

b) 以这样的方式选择至少 4 个确定的氨基酸残基以使得每个所选氨基酸与其他所选氨基酸相互间隔至少 $15 \text{ \AA}$ ，且所选氨基酸是以这种方式放置，使得至少一个具有 $800 \text{ \AA}^2$ 面积的圆形表面区域不包含选择的氨基酸；和

c) 对每个所选氨基酸进行初级突变，使得与天然存在的变态反应原的结合能力相比变态反应原突变体的特异性 IgE 结合能力减少了，其中每个初级突变都是用其他的氨基酸替换所选氨基酸残基，前者在该天然存在的变态反应原所源自的分类学物种中不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

在另一个方面，本发明涉及制备根据本发明的重组变态反应原的方法，其特征在于该变态反应原是从由编码相应的天然存在的变态反应原的 DNA 进行的 DNA 改组 (DNA shuffling) (分子培育 (Molecular breeding)) 获得的 DNA 序列生产。

此外，本发明涉及根据权利要求 1 以用作药物的重组变态反应原。

本发明也涉及根据权利要求 1 的重组变态反应原在制备预防和/或治疗变态反应的药物中的用途。

此外，本发明涉及根据权利要求 37 的用作药物的组合物。

本发明也涉及根据权利要求 37 的组合物以制备药物来预防和/或治疗变态反应的用途。

更进一步地，本发明涉及药物组合物，其特征在于它包含根据权利要求 1 的重组变态反应原或根据权利要求 37 的组合物，可选地与药物学上可接受的载体和/或赋形剂，以及可选佐剂结合。根据本发明的药物组合物可为对抗变态反应的疫苗的形式，该变态反应是由天然存在的变态反应原在遭受变态反应的患者中引起。

本发明也涉及在被试者中产生免疫反应的方法，包含向被试者施用根据权利要求 1 的重组变态反应原、根据权利要求 37 的组合物或根据权利要求 41-42 或 46 的药物组合物。

更进一步地，本发明涉及对被试者进行疫苗接种或治疗，包含向被试者施用根据权利要求 1 的重组变态反应原、根据权利要求 37 的组合物或根据权利要求 41-42 或 46 的药物组合物。

本发明也涉及制备根据权利要求 41 或 42 的药物组合物的方法，包含将根据权利要求 1 的重组变态反应原或根据权利要求 37 的组合物与药物学上可接受的物质和/或赋形剂混合。

更进一步地，本发明涉及由根据权利要求 45 的方法可获得的药物组合物。

本发明也涉及在被试者中治疗、预防或减轻变态反应的方法，包含向被试者施用根据权利要求 1 的重组变态反应原、根据权利要求 37 的组合物或根据权利要求 41-42 或 46 的药物组合物。

更进一步地，本发明涉及编码根据本发明的变态反应原的 DNA 序列、其衍生物、其部分序列、其简并的序列或在严紧条件下与其杂交的序列，其中该衍生物、部分序列、简并序列或杂交序列编码具有至少一个 B 细胞抗原决定部位的肽。

本发明也涉及包含根据本发明的 DNA 的表达载体。

此外，本发明也涉及含有根据本发明的表达载体的宿主细胞。

此外，本发明涉及生产重组变态反应原突变体的方法，该方法包含培养根据本发明的宿主细胞的步骤。

最后，本发明涉及根据本发明或由根据本发明的 DNA 序列编码的重组变态反应原，其包含至少一种 T 细胞抗原决定部位能够刺激

特异于天然存在的变态反应原的 T 细胞克隆或 T 细胞系。

根据本发明的突变体应该优选地能够以由 T 细胞刺激指数测量的相似方式/程度来刺激变态反应原特异的 T 细胞系。

发明详述

在本发明的一个优选实施方案中，初级突变间隔 20 Å，优选地为 25 Å，且最优选地为 30 Å。

相信变态反应原包含许多特异的 IgE 的潜在结合区，其中每个区域约具有 800 Å² 的面积，每个表面区域包含大量的交迭抗原决定部位。因而，变态反应原含有许多由 800 Å² 划分的表面区域的潜在的初级突变。

优选地，根据本发明的重组变态反应原包含 5~20 个，优选 6~15 个，更优选 7~12 个，且最优选 8~10 个初级突变。

在本发明的一个优选实施方案中，不含有突变的表面区域具有 700 Å² 的面积，优选 600 Å²，更优选 500 Å² 且最优选 400 Å²。

在本发明的一个优选实施方案中，重组变态反应原包含许多二级突变，与该天然存在的变态反应原的结合能力相比，它们每一个突变都减少了变态反应原突变体的特异的 IgE 结合能力；其中每一个二级突变都是用其他的残基替换一个表面暴露的氨基酸残基，前者在该天然存在的变态反应原所源自的分类学物种中不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上；其中的二级突变是处于圆形表面区域之外。

二级突变可位于靠近初级突变的位置，即二级突变也可能是相同抗原决定部位的额外突变，该抗原决定部位已有了初级突变。

在本发明的一个优选实施方案中，在天然存在的变态反应原中至少一个要进行替换的表面暴露的氨基酸具有超过 20% 的溶剂可接近性，优选超过 30%，更优选超过 40% 且最优选超过 50%。

在本发明的另一个优选实施方案中，至少一个要在天然存在的

变态反应原中进行替换的表面暴露的氨基酸在该天然存在的变态反应原所源自的分类目中的所有已知的同源蛋白质中具有超过 70%，优选 80%的且最优选 90%的一致性。

优选地，根据本发明的重组变态反应原基本上具有与该天然存在的变态反应原相同的 α -碳主链三级结构。

当比较突变体和天然存在的变态反应原分子的 α -碳主链三级结构时，对原子坐标的平均根均方偏差优选地低于 2 Å。

在本发明的重组变态反应原的一个优选实施方案中，每一个要结合入变态反应原突变体的氨基酸残基在该天然存在的变态反应原所源自的分类学属，优选亚科，更优选科，更优选总科，更优选军团（legion），更优选亚目且最优选目中都不发生于任何已知同源蛋白质氨基酸序列的相同位置上。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本发明的重组变态反应原突变体是非天然存在的变态反应原。

在使用来自来源特异的 IgE 反应性变态反应患者或其群体的血清进行的免疫测定中与天然存在的异变态反应原或相似的重组蛋白质相比，对突变的变态反应原的特异的 IgE 结合减少了至少 5%，优选至少 10%。

估计减少的 IgE 结合和减少的介导突变体交联能力的另一个途径是突变体起始组胺释放（HR）的能力。组胺的释放可在几个组胺释放测定中被测量。突变体减少的组胺释放来源于对结合到细胞表面的特异的 IgE 的亲力的减小及其减少的促进交联的能力。与天然存在的变态反应原相比，本发明的突变体 HR 优选减少 5~100%，更优选 25~100%，更优选 50~100%且最优选 75~100%。

典型地，不含有突变且具有 800 Å² 面积的圆形表面区域包含 15~25 个氨基酸残基的原子。

根据本发明的一个优选的重组变态反应原特征在于将表面暴露的氨基酸残基关于溶剂可接近性分级，且将处于较高的溶剂可接近性的氨基酸中的一个或多个替换。

根据本发明一个进一步优选的重组变态反应原特征在于将表面暴露的氨基酸残基关于其在天然存在的变态反应原所源自的分类学种中的所有已知同源蛋白质中的保守程度而分级，且将处于较高保守程度的氨基酸中的一个或多个替换。

优选地，根据本发明的重组变态反应原对于每个初级突变包含1~4个二级突变。

本发明的一个优选实施方案特征在于一个或多个替换由定点突变实现。

本发明的另一个优选实施方案特征在于一个或多个替换由随机诱变实现。

本发明进一步的一个优选实施方案特征在于一个或多个替换由DNA改组实现。

根据本发明的重组变态反应原可适当地为吸入的变态反应原的突变体，它理论上来源于树、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变态反应原是源自分类目 *Fagales*、*Oleales* 和 *Pinales* 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（*Olea*）），*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，*Asterales* 和 *Urticales* 目理论上包括豚草属（*Ambrosia*）和蒿属（*Artemisia*）的草本植物。来自真菌的重要吸入型变态反应原理论上为源自链格孢属（*Alternaria*）和芽枝霉属（*Cladosporium*）的这些。其他重要吸入型变态反应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，根据本发明的重组变态反应原可为毒液变态反应原的突变体，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 *Formicoidae* 总科）。

特异的变态反应原成分包括如 *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* (*Pinales*)、*Amb a 1* 和 2、*Art v 1* (*Asterales*)、*Par j 1* (*Urticales*)、*Ole e 1* (*Oleales*)、*Ave e 1*、*Cyn d 1*、*Dac g 1*、*Fes p 1*、*Hol l 1*、*Lol p 1* 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*))、*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 (全为黄蜂) 和 *Sol i 1*、2、3 和 4 (火蚁 (fire ant))。

在一个实施方案中重组变态反应原是 *Bet v 1* 的一个突变体。潜在适合用于替换的氨基酸包含氨基酸 V2、D72、E87、K-129、E-60、N-47、K-65、P-108、N-159、D-93、K-123、K-32、D-125、R-145、D-109、E-127、Q-36、E-131、L-152、E-6、E-96、D-156、P-63、H-76、E-8、K-134、E-45、T-10、V-12、K-20、S-155、H-126、P-50、N-78、K-119、V-2、L-24、E-42、N-4、A-153、I-44、E-138、G-61、A-130、R-70、N-28、P-35、S-149、K-103、Y-150、H-154、N-43、A-106、K-115、P-14、Y-5、K-137、E-141、E-87 和 E-73。一或多种一次和二次替换可选自 V2F、V2L、V2I、V2M、Y5V、T10P、T10A、K20N、D25E、N28T、K32Q、Q36A、Q36K、E42S、E45S、N47S、K55N、K65N、D72H、D72Q、D72N、T77A、N78K、E87G、E96L、K97S、K103V、P108G、D109N、K123I、D125Y、K129N、K134E、R145E、S149R、S149T、D156H 和 +160N, 其中+表示插入了一个额外的氨基酸。

根据本发明 *Bet v 1* 突变体的实施例如下（当用到时，括弧表示一次和二级突变）：

突变体 A:

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

突变体 B:

Tyr5Val、 Glu42Ser、 Glu45Ser、 Asn78Lys、 Lys103Val、 Lys123Ile、 Lys134Glu、 Asp156His。

突变体 2595（实施例 2）：

N28T、 K32Q、 E45S、 P108G

突变体 2628（实施例 4）：

Tyr5Val、 Glu45Ser、 Lys65Asn、 Lys97Ser、 Lys134Glu。

突变体 2637（实施例 4）：

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

突变体 2724:

N28T、 K32Q、 N78K、 K103V、 P108G、 R145E、 D156H、 +160N。

突变体 2733（实施例 4）：

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

突变体 2744： (Tyr5Val , Lys134Glu) 、 (Glu42Ser、 Glu45Ser) 、 (Asn78Lys , Lys103Val) 、 Lys123Ile 、 (Asp156His, +160Asn) 。

突变体 2753（实施例 4）：

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

突变体 2744+2595:

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

突变体 2744+2628:

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

突变体 2744+2595+2628:

Y5V、N28T、K32Q、E42S、E45S、K65N、N78K、K97S、K103V、P108G、K123I、K134E、D156H、+160N。

此外，所有上述突变体包含一种或多种下面的替换：V2F、V2L、V2I、V2M、T10A、K20N、Q36A 或 Q36K、D72H、D72Q、D72N、E87G、K129N 和 S149R 或 S149T。

在另一个实施方案中，重组变态反应原衍生自来自分类学目胡蜂科（Vespidae）、蜜蜂科（Apidae）和蚁（Formicoidae）总科的毒液变态反应原。

在进一步的实施方案中，重组变态反应原衍生自 *Ves v* 5。潜在适合用于替换的氨基酸包含氨基酸 K-16、K-185、K-11、K-44、K-210、R-63、K-13、F-6、K-149、K-128、E-184、K-112、F-157、E-3、K-29、N-203、N-34、K-78、K-151、L-15、L-158、Y-102、W-186、K-134、D-87、K-52、T-67、T-125、K-150、Y-40、Q-48、L-65、K-81、Q-101、Q-208、K-144、N-8、N-70、H-104、Q-45、K-137、K-159、E-205、N-82、A-111、D-131、K-24、V-36、N-7、M-138、T-209、V-84、K-172、V-19、D-56、P-73、G-33、T-106、N-170、L-28、T-43、Q-114、C-10、K-60、N-31、K-47、E-5、D-145、V-38、A-127、D-156、E-204、P-71、G-26、Y-129、D-141、F-201、R-68、N-200、D-49、S-153、K-35、S-39、Y-25、V-37、G-18、W-85 和 I-182。一或多种一次和二次替换可选自 K29A、T67A、K78A、V84S、Y102A、K112S、K144A、K202M 和 N203G。

在进一步的实施方案中，重组变态反应原衍生自 *Der p* 2。潜在

适合用于替换的氨基酸包含氨基酸 R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109 和 R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109、K-15。一或多种一次和二次替换可选自 K6A、N10S、K15E、S24N、H30N、K48A、E62S、H74N、K77N、K82N、K100N 和 R128Q。

根据本发明 *Bet v 1* 突变体的实施例如下：

突变体 A：

K6A、K15E、H30N、E62S。

突变体 B：

K6A、K15E、H30N、E62S、H74N、K82N。

突变体 C：

K6A、N10S、K15E、S24N、H30N、K48A、E62S、H74N、K77N、K82N、K100N 和 R128Q

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调配以使其能够经鼻及经口给药，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变态反应原）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、缓释制备物、气溶胶、粉末或颗粒。

疫苗的给药途径应与剂量配方相容，并且其量在药理学上有效且具免疫原性。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 $0.0001\text{ }\mu\text{g}$ ~ $1000\text{ }\mu\text{g}$ 。

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氢氧化铝和磷酸缓冲盐溶液中 0.05% ~ 0.1% 的磷酸（明矾）或磷酸钙溶液、用作 0.25% 溶液的糖或聚交酯乙交酯（polylactid glycolid）（PLG）的合成多聚体。也可采用与细菌细胞如小棒杆菌（*C. parvum*）、革兰氏阴性细菌的内毒素或脂多糖成分的混合物、在生理学可接受的油载体如二缩甘露醇 monoaleate（Aracel A）中的乳剂或在用作阻断替换的 20% 全氟烃（perfluorocarbon）（如 Fluosol-DA）溶液中的乳剂。也可用到油乳剂如 MF-59。也可以用到其他的佐剂如弗氏完全和不完全佐剂以及皂苷，如 QuilA、Qs-21 和 ISCOM 和 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 $1\sim 50$ 次，通常不超过 35 次疫苗接种。疫苗接种通常双周到双月地进行 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。

重组变态反应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变态反应的保护（预防）。通常，必须每年重复治疗以维持保护作用。调配为鼻、口和舌下应用的制备物特别适合于这个目的。

制备根据本发明的重组变态反应原的方法

如上所述，本发明也涉及制备本发明的重组变态反应原突变体的方法，参考权利要求 48。

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分级，且在具有较大溶剂可接近性的氨基酸中替换一个或多个。

有助于确定依照本发明的适合用作替换的表面暴露的氨基酸的第二个参数是氨基酸在该天然存在的变态反应原所源自的物种中所有已知同源蛋白质中的保守程度。或者，将其在该天然存在的变态反应原所源自的分类学属、亚科、科、总科、军团（legion）、亚目或目中所有已知的同源蛋白质中的保守程度用作这样的第二个参数。

因此，本发明方法的一个优选实施方案特征在于选择确定的氨基酸残基，其在该天然存在的变态反应原所源自的物种中所有已知同源蛋白质中具有超过 70%，优选超过 80%的且最优选超过 90%的一致性。

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变态反应原所源自的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分级，且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变态反应原突变体，它具有与天然存在的变态反应原基本上相同的 α -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。

替换标准

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），带有替换的氨基酸的突变体应该优选地符合如下标准：

1. 分子的总 α -碳主链三级结构优选保守。保守定义为比较结构时原子坐标中平均根均方偏差低于 2 Å。这由于两个原因而重要：

a) 可预期天然的变态反应原的整个表面组成了潜在抗体结合抗原决定部位的一个交迭连续统一体。分子表面的大部分不受替换影响，并因而维持了其抗体结合诱导的性质，这对于产生针对也存在于天然变态反应原上的抗原决定部位的新保护性抗体特异性重要。b) 考虑保存限期和注射入体液中的稳定性。

2. 要替换的氨基酸优选位于表面，因而可供抗体结合所接近。位于三维结构的表面的氨基酸通常具有至少 20% 的溶剂（水）可接近性，适当地为 20~80%，更适当地为 30~80%。溶剂可接近性定义为对具有与溶剂（水， $r = 1.4 \text{ Å}$ ）分子相当半径的球体可接近的分子的面积。

3. 每个替换的氨基酸优选位于具有超过 400 Å^2 面积的保守区块中。保守的区块定义为表面暴露的保守氨基酸残基和主链的连续相结合的区域。保守的氨基酸残基由处于相同分类学属、亚科、科、总科、军团（legion）、亚目或目中的同源蛋白质的所有已知氨基酸序列的序列比对来界定。在超过 70% 的序列中具有相同氨基酸残基的氨基酸位置被认为保守。预期保守的区块含有大多数患者的 IgE 所针对的抗原决定部位。

α -碳主链三级结构的保守是由在诱变前后用 X-射线晶体学或 NMR 获得相同的结构而最好地确定的。没有描述突变体结构数据时, 如果与由对结构上确定的分子分析所获得的数据相比, 不能区别的 CD-谱或免疫化学数据如抗体反应性则能推知大概 α -碳主链三级结构的保守性。

4. 在保守的区块中, 用于诱变的氨基酸应该优选选自优选位于接近保守区块中心的具有最大溶剂(水)可接近性的那些。

5. 优先地, 极性氨基酸残基由另一个极性残基替换, 而非极性氨基酸残基由另一个非极性残基替换。

为了基本维持变态反应原的三维结构, 要结合进来的氨基酸可基于同该变态反应原的结构类似物的蛋白质的比较来选择, 例如一个与该变态反应原属于相同分类学目且与该变态反应原不具有任何交叉反应性的蛋白质。

根据本发明的 DNA

在一个优选实施方案中, 本发明的 DNA 序列是编码天然存在的变态反应原的 DNA 序列的衍生物。

优选, 该 DNA 衍生物通过对编码天然存在的变态反应原的 DNA 进行定点突变或随机诱变而获得。

在第一个特别优选的实施方案中, DNA 序列是如图 3 所示的序列的一个衍生物, 其中的 DNA 序列进行了突变以编码具有至少 4 个突变的变态反应原, 这些突变选自 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。

在第二个特别优选的实施方案中, DNA 序列是如图 13 所示的序列的一个衍生物, 其中的 DNA 序列进行了突变以编码具有至少 4 个突变的变态反应原, 这些突变选自 K-16、K-185、K-11、K-44、K-210、R-63、K-13、F-6、K-149、K-128、E-184、K-112、F-157、E-3、K-29、N-203、N-34、K-78、K-151、L-15、L-158、Y-102、W-186、K-134、D-87、K-52、T-67、T-125、K-150、Y-40、Q-48、L-65、K-81、Q-101、Q-208、K-144、N-8、N-70、H-104、Q-45、K-137、K-159、E-205、N-82、A-111、D-131、K-24、V-36、N-7、M-138、T-209、V-84、K-172、V-19、D-56、P-73、G-33、T-106、N-170、L-28、T-43、Q-114、C-20、K-60、N-31、K-47、E-5、D-145、V-38、A-127、D-156、E-204、P-71、G-26、Y-129、D-141、F-201、R-68、N-200、D-49、S-153、K-35、S-39、Y-25、V-37、G-18、W-85 和 I-182。

在第三个特别优选的实施方案中, DNA 序列是如图 16 所示的序列的一个衍生物, 其中的 DNA 序列进行了突变以编码具有至少 4 个突变的变态反应原, 这些突变选自 R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109 和 R-128、D-129、H-11、H-30、S-1、K-77、Y-75、R-31、K-82、K-6、K-96、K-48、K-55、K-89、Q-85、W-92、I-97、H-22、V-65、S-24、H-74、K-126、L-61、P-26、N-93、D-64、I-28、K-14、K-100、E-62、I-127、E-102、E-25、P-66、L-17、G-60、P-95、E-53、V-81、K-51、N-103、Q-2、N-46、E-42、T-91、D-87、N-10、M-111、C-8、H-124、I-68、P-79、K-109、K-15。

DNA 改组 (shuffling)

根据本发明的重组变态反应原突变体可以用从相关天然 DNA 的 DNA 改组（分子培育）获得的 DNA 来生产。DNA 改组可根据在 Punnonen 等人（参考文献 25）的文章所公开的程序以及其中提到的文章中公开的程序来实施，这些程序在此处引用作为参考。

诊断测定

此外，根据本发明的重组变态反应原突变体具有诊断可能性和优点。当前领域中的变态反应疫苗基于天然存在的变态反应原来源的提取物，因而代表了多种同种型。变态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变态反应的同种型的交叉反应性，一些同种型关于变态反应个体的变态反应是相关的，然而其他同种型由于不具有任何变态反应个体对其具有特异性 IgE 的 IgE 结合抗原决定部位而不相关。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 的变态反应，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的突变体和本发明的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，如血清。

因而，本发明也涉及用根据本发明的重组变态反应原突变体或根据本发明的组合物来估计对被试者的治疗的适当性、安全性或结果的诊断测定，其中将被试者的含 IgE 的样品与该突变体或该组合物混合并估计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估计可用任何已知的免疫测定来实施。

定义

在本发明中，表达“与该天然存在的变态反应原的 IgE 结合能力相比减少特异性 IgE 结合能力”指在至少一个免疫测定中，该减少是以统计学显著的方式 ($p < 0.05$) 可测量的，其中的免疫测定应用来自对天然存在的变态反应原发生变态反应的被试者的血清。优选，IgE 结合能力减少了至少 5%，更优选至少 10%。

表达“表面暴露的氨基酸”指氨基酸残基这样位于三维结构的表面：当变态反应原在溶液中时，氨基酸残基的至少一个原子的至少一部分可接触周围溶剂。优选，在三维结构中的氨基酸残基具有至少 20% 的溶剂（水）可接近性，适当地为至少 30%，更适当地为至少 40% 且最优选地为至少 50%。

表达“溶剂可接近性”定义为对具有与溶剂分子相当半径的球体（水， $r = 1.4 \text{ \AA}$ ）是可接近的分子面积。

表达“表面暴露的”和“溶剂暴露的”可互换使用。

表达“天然存在的变态反应原所源自的分类学物种”指分类学系统中的物种。

此外，表达“该变态反应原突变体具有与该天然存在的变态反应原基本相同的 α -碳主链三级结构”指当比较结构时，对原子坐标的平均根均方偏差低于 $2 \text{ \AA}$ 。

在本发明中，表达“替换”指与天然存在的变态反应原的氨基酸序列相比的氨基酸缺失、替换或加成。

本发明通过下面非限制性的实施例进一步地进行阐明。

实施例

实施例 1

实施例 1 描述了具有 1 个或 3 个初级突变的重组变态反应原突变体的制备。根据本发明的重组变态反应原突变体，即包含至少 4 个初

级突变的变态反应原可用相同的程序来制备。

Fagales 花粉变态反应原中共同抗原决定部位的确定

主要桦木花粉变态反应原 *Bet v 1* 显示与来自分类学相关的树木花粉的主要变态反应原有约 90% 的氨基酸序列一致性, 即 *Fagales* (例如榛子和角树) 和桦木花粉变态反应患者常显示对这些 *Bet v 1* 同源蛋白质变态反应交叉反应性的临床症状。

Bet v 1 也显示与在某些水果 (例如苹果和樱桃) 和蔬菜 (例如芹菜和胡萝卜) 中存在的变态反应蛋白质有约 50~60% 的序列一致性, 且有临床证据显示 *Bet v 1* 和这些食物相关的蛋白质之间的变态反应交叉反应性。

另外, *Bet v 1* 与一组称为病原体相关的蛋白质 (PR-10) 的植物蛋白质享有显著的序列一致性 (20~40%), 然而对这些 PR-10 蛋白质的变态反应交叉反应性没有报道。

分子模型暗示因与 *Bet v 1* 结构近乎相同, *Fagales* 和食物变态反应原和 PR-10 蛋白质的结构相近。

变态反应性 *Bet v 1* 的交叉反应性的结构基础报道于 (Gajhede 等人 1996, 参考文献 17), 其中可以确定 *Bet v 1* 分子表面的 3 个区块同已知的主要树木花粉变态反应原相同。因而, 识别 *Bet v 1* 上这些区块的任何 IgE 将能够交叉反应并结合到其他 *Fagales* 主要花粉变态反应原上, 从而引起变态反应症状。对这 3 个共同区块的确定是在将主要树木花粉变态反应原所有已知的氨基酸序列比对结合对报道于参考文献 17 中的 α -碳主链三级结构所揭示的 *Bet v 1* 分子表面的分析之后进行。另外, 基于结合有抗体后被覆盖的面积这些区块界定为具有确定的最小尺寸 ($>400 \text{ \AA}^2$)。

用于定点突变的氨基酸残基的选择

用于定点突变的氨基酸残基选自存在于 *Bet v 1* 特异区域和共同区块的残基，因为对这些残基的修饰预期可影响其与来自大多数表现临床树木花粉变态反应交叉反应性的患者的血清 IgE 的结合。

各个区块中每个氨基酸残基溶剂暴露的相对方向和百分比基于其原子坐标来计算。由于可能导致破坏结构或缺乏抗体相互作用，而不认为具有低程度的溶剂暴露（<20%）的残基与诱变相关。剩下的残基根据其溶剂暴露的程度分级。

序列比对

与所考察序列（*Bet v 1* No. 2801，WHO IUIS 变态反应原命名小组委员会）同源的序列是通过 BLAST 检索（Altschul 等人，参考文献 18）在 GenBank 和 EMBL 序列数据库中得来。将 BLAST 报告的概率小于 0.1 的所有序列进行考察，且构建含有不重复同源序列列表的列表。这些序列通过 CLUSTAL W（Higgins 等人，参考文献 19）进行比对，且一致性百分比考虑了全部列表或单独分类学相关的物种对序列中的每个位置进行计算。总计有 122 个序列与 *Bet v 1* No. 2801 同源，其中的 57 个序列源自分类学相关的物种。

编码 *Bet v 1* 的基因的克隆

通过酚抽提和 LiCl 沉淀从白桦（*Betula verrucosa*）花粉（Allergon，瑞典）制备 RNA。Oligo(dT)-纤维素亲和层析是在 Eppendorph 管中以分批方式进行，且双链的 cDNA 是用商品试剂盒（Amersham）合成。通过 PCR 扩增编码 *Bet v 1* 的 DNA 并克隆。简单扼要地，PCR 以 cDNA 作为模板进行，其引物设计为分别在相应于 *Bet v 1* 的氨基端和 3'-非翻译区的位置与 cDNA 的序列相配对。将引物在 5'-端延长以包含限制酶切位点（*Nco* I 和 *Hind* III）以定向克隆入 pKK233-2。

亚克隆入 pMAL-c

将编码 *Bet v 1* 的基因随后亚克隆入麦芽糖结合蛋白质融合载体 pMAL-c (New England Biolabs)。将该基因通过 PCR 扩增并在 *malE* 的框内亚克隆以生成麦芽糖结合蛋白质 (MBP) -*Bet v 1* 蛋白质融合操纵子, 其中 MBP 和 *Bet v 1* 由因子 Xa 蛋白酶切割位点分隔, 该位点被定位于当切割后可恢复原来的 *Bet v 1* 氨基端序列的位置, 如在参考文献 15 中所描述。简单扼要地, PCR 以插入了 *Bet v 1* 的 pKK233-3 作为模板, 且其引物分别相应于蛋白质的氨基-和羧基端。将接近启动子的引物在 5'-端延长以包含在框内编码因子 Xa 蛋白酶切割位点的 4 个密码子。将两个引物都在 5'-端延长以包含限制酶切位点 (*Kpn I*) 以进行克隆。将编码 *Bet v 1* 的基因用 20 个循环的 PCR 进行亚克隆以减少 PCR 假象的频率。

体外诱变

体外诱变以插入了 *Bet v 1* 的重组 pMAL-c 作为模板经过 PCR 进行。每个突变体 *Bet v 1* 基因都是用 4 个引物由 3 次 PCR 来生成的。

合成 2 个包含每个突变的突变特异性寡核苷酸引物, 每个 DNA 链对应 1 个, 参见图 1 和 2。用突变的核苷酸作为起始位点, 两个引物都在 5'-端延长 7 个核苷酸, 而在 3'-端延长 15 个核苷酸。延长的核苷酸在序列上与实际区域的 *Bet v 1* 基因相同。

此外合成了 2 个通用引物 (图 2 标为 “全有义” 和 “全无义”) 并用于所有突变体。这些引物长为 15 个核苷酸且在序列上与 pMAL-c 载体中 *Bet v 1* 的上游和下游约 1 千碱基对 (kb) 处区域的序列相应。上游引物的序列衍生自有义链而下游引物的序列衍生自无义链, 参见图 2。

基本根据标准程序进行 2 个独立的 PCR 反应 (Saiki 等人

1988, 参考文献 20), 只进行 20 次循环变温以减少 PCR 假象的频率。每个 PCR 反应都使用插入了 *Bet v 1* 的 pMAL-c 作模板且一个突变特异的引物和一个通用引物形成有意义的组合。

在三重区块突变体中引入 4 个氨基酸替换 (Asn28Thr, Lys32Gln, Glu45Ser, Pro108Gly) 如上所述按一步一步的方法进行。首先, 用插入了 *Bet v 1* No. 2801、*Bet v 1* (Glu45Ser)、*Bet v 1* (Glu45Ser, Pro108Gly) 的 pMAL-c 作为模板来分别引入 Glu45Ser 突变, 然后是 Pro108Gly 突变, 最后是 Asn28Thr, Lys32Gln 突变。

用琼脂糖凝胶电泳和电洗脱及随后的乙醇沉淀纯化 PCR 产物。第三次 PCR 反应使用来自前两次 PCR 反应产物的组合作为模板和两个通常可适用的引物来进行。再次使用标准 PCR 的 20 次循环。将 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳和电洗脱及随后的乙醇沉淀进行纯化, 用限制性内切酶 (*BsiW I* / *EcoR I*) 进行切割, 并定向地连接入用相同的酶限制酶切的插入了 *Bet v 1* 的 pMAL-c 中。

图 3 表示所有 9 个 *Bet v 1* 突变的概述, 其如下:

Thr10Pro、Asp25Gly、Asn28Thr+Lys32Gln、Glu45Ser、Asn47Ser、Lys55Asn、Glu60Ser (非区块的)、Thr77Ala 和 Pro108Gly。也制备具有 4 个突变的额外的突变体 (Asn28Thr、Lys32Gln、Glu45Ser、Pro108Gly)。在这些突变中, 选择 5 个以进行进一步的检验: Asn28Thr+Lys32Gln、Glu45Ser、Glu60Ser、Pro108Gly 和三重区块突变体 Asn28Thr、Lys32Gln、Glu45Ser、Pro108Gly。

核苷酸测序

对 *Bet v 1* 编码基因核苷酸序列的确定分别在亚克隆前后及随后的体外诱变中进行。

按照供应商的建议, 将来自 10 ml 在补充了 0.1 g/l 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜至饱和的细菌培养物的质粒 DNA 用 Qiagen-tip

20 柱进行纯化并用测序酶 (Sequenase) 2.0 型 DNA 测序试剂盒 (USB) 进行测序。

重组 *Bet v 1* 和突变体的表达和纯化

如在参考文献 15 中所述, 将重组 *Bet v 1* (*Bet v 1* No. 2801 和突变体) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 中过量表达, 融合到麦芽糖结合蛋白质上并纯化。简要地, 使重组大肠杆菌细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长到 436 nm 光密度为 1.0, 随之 *Bet v 1* 融合蛋白质的表达由添加 IPTG 来诱导。在诱导后 3 小时通过离心来收集细胞, 并重悬于裂解缓冲液中并用超声断裂。在超声处理和额外的离心之后, 通过直链淀粉亲和层析分离重组的融合蛋白质并随后通过与因子 Xa 温育来切割 (参考文献 15)。在 F Xa 切割后, 将重组 *Bet v 1* 用凝胶过滤来分离, 且如果发现必要的话, 进行另一轮的直链淀粉亲和层析以除去痕量的麦芽糖结合蛋白质。

将纯化的重组 *Bet v 1* 超滤浓缩为约 5 mg/ml 并贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。纯化的重组 *Bet v 1* 制备物的终产量为每升大肠杆菌细胞培养物 2~5 mg。

纯化的重组 *Bet v 1* 制备物经银染 SDS-聚丙烯酰胺电泳后显示单一的表现分子量为 17.5 kDa 的条带。N-末端的测序显示预期的序列为衍生自 cDNA 核苷酸序列, 且定量的氨基酸分析显示预期的氨基酸组合物。

我们在前面显示 (参考文献 15) 重组 *Bet v 1* No. 2801 与天然存在的 *Bet v 1* 在免疫化学上不能区别。

用兔多克隆抗体的免疫电泳

以重组 *Bet v 1* 蛋白质的形式生产了 7 个突变体 *Bet v 1* 并如上所述进行了纯化, 然后检验它们对多克隆兔抗体的反应性, 该抗体由对抗从桦木花粉中分离的 *Bet v 1* 而产生。当在天然条件下经免疫电泳

(火箭线 (rocket-line) 免疫电泳) 进行分析时, 兔抗体能够沉淀所有的突变体, 显示这些突变体具有保守的 α -碳主链三级结构。

为了分析对人多克隆 IgE 反应的作用, 选择了突变体 Glu45Ser、Pro108Gly、Asn28Thr+Lys32Gln 和 Glu60Ser 进行进一步的分析。

Bet v 1 Glu45Ser 突变体

位置 45 的谷氨酸显示了高度的溶剂暴露 (40%), 并定位于 *Fagales* 变态反应原所共有的分子表面区块 (区块 I)。在一些 *Bet v 1* 同源的 PR-10 蛋白质中发现丝氨酸残基占具位置 45, 这表示谷氨酸可被丝氨酸替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外, 由于没有已知的 *Fagales* 变态反应原序列在位置 45 具有丝氨酸, 谷氨酸被丝氨酸替换则产生了一个非天然存在的 *Bet v 1* 分子。

用重组的 Glu45Ser Bet v 1 突变体进行 T 细胞增殖测定

该分析以如 Spangfort 等人 1996a 描述方法进行。发现重组 *Bet v 1 Glu45Ser* 突变体能够诱导来自 3 种不同的桦木花粉变态反应患者中的 T 细胞系的增殖, 其刺激指数与重组体的和天然存在的情况相似。

重组的 Glu45Ser Bet v 1 的结晶和结构确定

重组 *Glu45Ser Bet v 1* 的晶体于 25℃ 由蒸气扩散来生长, 基本如在 (Spangfort 等人 1996b, 参考文献 21) 中所述。将浓度为 5 mg/ml 的 *Glu45Ser Bet v 1* 与相同体积的 2.0 M 的硫酸铵、0.1 M 的柠檬酸钠、1% (v/v) 的二氧六环, pH 6.0 的溶液混合, 并对 100x 体积的 2.0 M 的硫酸铵、0.1 M 的柠檬酸钠、1% (v/v) 的二氧六环,

pH 6.0 的溶液进行平衡。平衡 24 小时之后，通过采用在参考文献 21 中所描述的加晶种技术来诱导晶体生长，这里用重组的野生型 *Bet v 1* 作为晶种来源。

2 个月后，收获晶体并用如参考文献 21 所述从 Rigaku 旋转阳极生成的 X-射线进行分析，且该结构用分子置换（molecular replacement）来解决。

Bet v 1 Glu45Ser 突变体的结构

突变的结构作用通过生长三维 *Bet v 1* Glu45Ser 蛋白质晶体而陈述，当用旋转阳极生成的 X-射线进行分析时该晶体衍射为 3.0 Å 的分辨率。位置 45 上谷氨酸到丝氨酸的替换通过 *Bet v 1* Glu45Ser 的结构电子密度图象证实，该图象也显示总的 α -碳主链三级结构保守。

Bet v 1 Glu45Ser 突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Bet v 1* Glu45Ser 突变体与重组 *Bet v 1* 的 IgE 结合性质，该测定使用衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

重组 *Bet v 1* no. 2801 以摩尔比为 1: 5 进行生物素化（*Bet v 1* no. 2801: 生物素）。抑制测定进行如下：将血清样品（25 μ l）与固相抗 IgE 温育，洗涤，重悬并进一步在生物素化的 *Bet v 1* no. 2801（3.4 nM）和给定的突变体（0~28.6 nM）的混合物中温育。结合到固相的生物素化的 *Bet v 1* no. 2801 的量通过在用丫啶酯（acridinium ester）标记的链霉抗生物素温育后测量 RLU 来估计。抑制的程度计算为用缓冲液和突变体作为抑制物所获得的 RLU 的比率。

图 4 表示由非生物素化的 *Bet v 1* 和 *Bet v 1* Glu45Ser 突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 对来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的

各种重组蛋白质的量有明显的差别。重组 *Bet v 1* 在约 6.5 ng 即达到了 50% 的抑制，而相应的 *Bet v 1 Glu45Ser* 突变体的浓度为约 12 ng。这显示在 *Bet v 1 Glu45Ser* 突变体中引入的点突变以约 2 的系数降低了特异性血清 IgE 的亲和力。由 *Bet v 1 Glu45Ser* 突变体达到的最高抑制水平与重组 *Bet v 1* 相比明显较低。这可能显示在 *Glu45Ser* 替换之后，一些存在于血清库中的特异性 IgE 不能识别 *Bet v 1 Glu45Ser* 突变体。

Bet v 1 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln

位置 28 和 32 的天冬氨酸和赖氨酸分别显示了高度的溶剂暴露（分别为 35% 和 50%），并位于 *Fagales* 变态反应原所共同的分子表面区块（区块 II）。在结构中，天冬氨酸 28 和赖氨酸 32 相互靠近地位于分子表面，且极可能通过氢键相互作用。在一些与 *Bet v 1* 同源的 PR-10 蛋白质中发现苏氨酸和谷氨酸残基分别占具位置 28 和 32，这表明天冬氨酸和赖氨酸可分别被苏氨酸和谷氨酸替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外，由于没有已知的天然发生的异变态反应原序列在位置 28 和 32 分别具有苏氨酸和谷氨酸，则这些替换产生了一个非天然存在的 *Bet v 1* 分子。

Bet v 1 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 与重组 *Bet v 1* 的 IgE 结合性质，该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 5 表示由非生物素化的 *Bet v 1* 和由 *Bet v 1* 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的

各种重组蛋白质的量有明显的差别。重组 *Bet v 1* 在约 6.5 ng 即达到了 50% 的抑制，而相应的 *Bet v 1* 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 的浓度为约 12 ng。这显示在 *Bet v 1* 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 中引入的点突变以约 2 倍的系数降低其特异性血清 IgE 的亲合力。

由 *Bet v 1* 突变体 Asn28Thr+Lys32Gln 达到的最高抑制水平与重组 *Bet v 1* 相比明显较低。这可能显示在 Asn28Thr+Lys32Gln 替换之后，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 的脯氨酸显示了高度的溶剂暴露（60%），并位于 *Fagales* 变态反应原所共同的分子表面区块（区块Ⅲ）。在一些与 *Bet v 1* 同源的 PR-10 蛋白质中发现甘氨酸残基占具位置 108，这表明脯氨酸可被甘氨酸替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外，由于没有已知的异变态反应原序列在位置 108 具有甘氨酸，脯氨酸被甘氨酸的替换则产生一个非天然存在的 *Bet v 1* 分子。

Bet v 1 Pro108Gly 突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体与重组 *Bet v 1* 的 IgE 结合性质，该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 6 表示由非生物素化的 *Bet v 1* 和由 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的各个重组蛋白质的量有明显的差别。重组 *Bet v 1* 在约 6.5 ng 即达到了 50% 的抑制，而相应的 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体的浓度为约 15

ng。这显示在 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体中引入的点突变以约 2 倍的系数降低了特异性血清 IgE 的亲和力。

由 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体达到的最高抑制水平与重组 *Bet v 1* 相比明显较低。这可能显示在 Pro108Gly 替换之后，一些存在于血清库中的特异性 IgE 不能识别 *Bet v 1* Pro108Gly 突变体。

Bet v 1 突变体 Glu60Ser (非区块突变体)

位置 60 的谷氨酸显示了高度的溶剂暴露 (60%)，然而它不位于 *Fagales* 变态反应原所共同的分子表面区块内。在一些与 *Bet v 1* 同源的 PR-10 蛋白质中发现丝氨酸残基占具位置 60，这表明谷氨酸可被丝氨酸替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外，由于没有已知的异变态反应原序列在位置 60 具有丝氨酸，谷氨酸被丝氨酸的替换则产生一个非天然存在的 *Bet v 1* 分子。

Bet v 1 Glu60Ser 突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Bet v 1* Glu60Ser 突变体与重组 *Bet v 1* 的 IgE 结合性质，该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 7 表示由非生物素化的 *Bet v 1* 和由 *Bet v 1* Glu60Ser 突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。与 Glu45Ser、Pro108Gly 和 Asn28Thr+Lys32Gln 突变体相反，谷氨酸 60 到丝氨酸的替换不显示对 IgE 结合性质有任何显著的作用。这显示在定义的 *Fagales* 共同区块之外的替换对特异性血清 IgE 的结合仅具有少量作用，这支持了保守的变态反应原分子表面包含主要 IgE 结合抗原决定部位的概念。

Bet v 1 三重区块突变体

在三重区块突变体中，将如上所述在 3 个不同的共同 *Fagales* 区块引入的点突变（Glu45Ser、Asn28Thr+Lys32Gln 和 Pro108Gly）同时引入以造成具有 4 个氨基酸替换的人工突变体。

Bet v 1 三重区块突变体的结构分析

纯化的 *Bet v 1* 三重区块突变体的结构完整性用圆二色（CD）谱学分析。图 8 显示以近乎相同的浓度记录的重组的和三重区块突变体的 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 种制备物含有等量的二级结构，这强有力地暗示 α -碳主链三级结构没有受到引入的氨基酸替换的影响。

Bet v 1 三重区块突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Bet v 1* 三重区块突变体与重组 *Bet v 1* 的 IgE 结合性质，该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 9 表示由非生物素化的 *Bet v 1* 和由 *Bet v 1* 三重区块突变体抑制生物素化的重组 *Bet v 1* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。与上述的单独的突变体相反，三重区块突变体抑制曲线相对于重组体不再平行。这显示在三重区块突变体中引入的替换与重组体相比改变了 IgE 结合性质和抗原决定部位的外形。平行性的缺乏使得很难定量三重区块突变体对特异性血清 IgE 亲和力的降低。

重组 *Bet v 1* 在约 6 ng 即达到了 50% 的抑制。而相应的 *Bet v 1* 三重区块突变体的浓度为约 30 ng，即亲和力以系数 5 倍降低。然而，为了达到 80% 的抑制，相应的值分别为 20 ng 和 400 ng，即以系数 20 降低。

用重组 *Bet v 1* 三重区块突变体进行 T 细胞增殖测定

该分析以如参考文献 15 中所述方法实施。发现重组 *Bet v 1* 三重区块突变体能够诱导来自 3 个不同的桦木花粉变态反应患者中的 T 细胞系的增殖，其刺激指数与重组体的和天然存在的情况相似。这暗示三重区块突变体可以起始抗体生产所必需的细胞免疫反应。

实施例 2

实施例 2 描述了具有 1 个初级突变的重组变态反应原突变体的制备。根据本发明的重组变态反应原突变体，即包含至少 4 个初级突变的变态反应原可用相同的程序来制备。

Vespula Vulgaris 毒液主要变态反应原抗原 5 中共同抗原决定部位的确定

抗原 5 是 3 个黄蜂毒液蛋白质之一，它们是已知的人变态反应原。黄蜂包括大黄蜂类、小黄蜂和黄蜂。另外 2 个已知的黄蜂毒液变态反应原是磷脂酶 A₁ 和透明质酸酶。来自 *Vespula Vulgaris* (*Ves v 5*) 的抗原 5 已在酵母体系中被克隆及表达为重组蛋白质 (Monsalve 等人 1999, 参考文献 22)。最近已经以 1.8 Å 的分辨率确定重组 *Ves v 5* 的三维晶体结构 (准备中)。该结构的主要特征由 4 个 β-链和 4 个 α-螺旋排列在 3 个堆积层形成 “α-β-α 三明治” 组成。在来自不同黄蜂属 (*Vespula*) 物种的抗原 5 同源变态反应原之间的序列一致性为约 90%，这暗示存在保守的分子表面区域和 B 细胞抗原决定部位。

如前文对 3 个花粉变态反应原的描述，共同区块的存在和确定在对黄蜂属抗原 5 变态反应原所有已知的氨基酸序列进行比对结合对由 *Ves v 5* 的三维结构揭示的抗原 5 的分子表面分析之后进行。图 10

显示单独比对的抗原 5 残基的溶剂可接近性及黄胡蜂属抗原 5 序列的比对（左图版）。在图 10 的右图版显示了黄胡蜂属抗原 5 的分子表面，其中有色区域表示保守区。

用于定点突变的氨基酸残基的选择

用于定点突变的氨基酸残基选自存在于黄胡蜂属共同区块的残基，这是因为对这些残基的修饰预期可影响血清 IgE 的结合，这些血清 IgE 来自大多数表现临床黄胡蜂属变态反应交叉反应性的患者。

各个区块中每个氨基酸残基溶剂暴露的相对方向和百分比基于其原子坐标来计算。由于可能的结构破坏或缺乏抗体相互作用，而不认为具有低程度溶剂暴露的残基适用于诱变。剩下的残基根据它们溶剂暴露的程度来分级。

编码 *Ves v 5* 的基因的克隆

总 RNA 以如在（Fang 等人 1988，参考文献 23）中所描述的方法从 *Vespula Vulgaris* 黄蜂的毒液腺中分离。

第一链 cDNA 的合成、PCR 扩增和 *Ves v 5* 基因的克隆以如（Lu 等人 1993，参考文献 24）中所述方法进行。

亚克隆入 pPICZ α A

将编码 *Ves v 5* 的基因随后亚克隆入 pPICZ α A 载体中（Invitrogen）以得到 *Ves v 5* 在毕赤巴斯德酵母（*Pichia pastoris*）中的分泌表达。将该基因通过 PCR 扩增并以同啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的 α -因子分泌信号的编码序列框相匹配地亚克隆。在该构建体中， α -因子在蛋白质分泌期间将由毕赤巴斯德酵母 Kex2 蛋白酶体系在体内。

简单扼要地, PCR以 *Ves v 5* 作为模板的, 其引物分别相应于蛋白质的氨基-和羧基端。将引物在 5'-端延长以分别包含用于克隆的限制酶切位点 *EcoR I* 和 *Xba I*。编码 Kex2 切割位点的核苷酸在这个构建体中位于蛋白质氨基端上游 18 个核苷酸处, 导致 *Ves v 5* 在氨基末端具有 6 个额外的氨基酸 Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Phe 的表达。

将 pPICZ α A- *Ves v 5* 插入到毕赤巴斯德酵母中

插入了 *Ves v 5* 基因的 pPICZ α A 载体经过 *Sac I* 限制酶切而线性化并插入到毕赤巴斯德酵母基因组的 *AOX1* 座位。插入是依照 Invitrogen 的建议通过在毕赤巴斯德酵母 KM71 细胞中同源重组而进行。

体外诱变

体外诱变以插入了 *Ves v 5* 的重组 pPICZ α A 作为模板经过 PCR 进行。每个突变体 *Ves v 5* 基因都使用 4 个引物由 3 次 PCR 来生成。

合成 2 个包含每种突变的突变特异性寡核苷酸引物, 每个 DNA 链对应 1 个, 参见图 11 和 12。用突变的核苷酸作为起始位点, 两个引物都在 5'-端延长了 6-7 个核苷酸, 而在 3'-端延长了 12-13 个核苷酸。延长的核苷酸在序列上与实际区域的 *Ves v 5* 基因相同。

此外合成了 2 个通用的引物(图 12 标为“全有义”和“全无义”)并用于所有突变体。为了确保具有原氨基末端的 *Ves v 5* 突变体的表达, 相应于蛋白质氨基末端的一个引物在 5'-端延长了 1 个 *Xho I* 位点。当 *Ves v 5* 突变体基因插入到 pPICZ α A 载体中时, 在 *Ves v 5* 的氨基末端上游直接就再生了 Kex2 蛋白酶的切割位点。第二个引物在序列上相应于 pPICZ α A 载体中位于 *Ves v 5* 基因下游约 300 bp 的区域。相应于 *Ves v 5* 的氨基末端的引物序列衍生自有义链而下游引物的序列衍生自无义链, 参见图 11。

基本根据标准程序进行了 2 个独立的 PCR 反应 (Saiki 等人 1988), 只是进行 20 次循环变温以减少 PCR 假象的频率。每个 PCR 反应都使用插入了 *Ves v 5* 的 pPICZ α A 作为模板且一个突变特异性的引物和一个通用的引物形成有意义的组合。

将 PCR 产物用 “Concert, Rapid PCR Purification System” (Life Technologies) 进行纯化。第三次 PCR 反应使用来自前两次 PCR 产物的组合作为模板和两个通常可适用的引物来进行。再次使用标准 PCR 的 20 次循环。将 PCR 产物用 “Concert, Rapid PCR Purification System” (Life Technologies) 进行纯化, 用限制性内切酶 (*Xho* I / *Xba* I) 进行切割, 并定向地连接入用相同的酶限制酶切的 pPICZ α A 载体中。图 13 表示所有 *Ves v 5* 突变的概况。

将 pPICZ α A- *Ves v 5* 突变体插入到毕赤巴斯德酵母中

插入了 *Ves v 5* 突变体基因的 pPICZ α A 载体经过 *Sac* I 限制酶切而线性化并插入到毕赤巴斯德酵母基因组的 *AOX1* 座位。插入依照 Invitrogen 的建议通过在毕赤巴斯德酵母 KM71 细胞中同源重组而进行。

核苷酸测序

Ves v 5 编码基因核苷酸序列的确定分别在亚克隆前后及随后的体外诱变中进行。

按照供应商的建议, 将来自 10 ml 在补充了 0.1 g/l 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜至饱和的细菌培养物的质粒 DNA 用 Qiagen-tip 20 柱进行纯化并用测序酶 (Sequenase) 2.0 型 DNA 测序试剂盒 (USB) 进行测序。

重组 *Ves v 5* 的表达和纯化

毕赤巴斯德酵母菌株 KM71 的重组酵母细胞在 30℃ 于定轨摇床, 225 rpm, 在 500 ml 的瓶中生长直到 $A_{600\text{ nm}}$ 为 4-6, 瓶中含有 100 ml 包含酵母氮碱、生物素、甘油和组氨酸的 pH 6.0 的磷酸缓冲液。细胞经离心收集, 并重悬于 10 mL 的相似的用甲醇替换了甘油的缓冲培养基中。于 30℃ 继续温育 7 天, 每天添加 0.05 ml 甲醇。

细胞经离心收获, 且收集的培养物流体通过超滤来浓缩。在对 50 mM 的醋酸铵缓冲液, pH 4.6 透析之后, 将样品应用于在相同缓冲液中平衡的 FPLC (Pharmacia) SE-53 阳离子交换柱。该柱用 0-1.0 M 的 NaCl, 50 mM 醋酸铵线性梯度进行洗脱。收集在约 0.4 M 的 NaCl 洗脱出的重组 *Ves v 5* 峰并对 0.02 N 的乙酸进行透析。在浓缩到约为 10 mg/ml 之后, 将纯化的 *Ves v 5* 保存于 4℃。

重组 *Ves v 5* 的结晶

Ves v 5 的晶体于 25℃ 用蒸气扩散技术来生长。为了结晶, 将 5 μ l 5mg/ml 的 *Ves v 5* 与 5 μ l 含 18% 的 PEG 6000、0.1 M 的柠檬酸钠, pH 6.0 的溶液混合, 并对 1 ml 含 18% 的 PEG 6000、0.1 M 的柠檬酸钠, pH 6.0 的溶液进行平衡。

X-射线衍射数据于 100K 从天然 *Ves v 5* 晶体及插入重原子衍生物之后收集, 并用于解析 *Ves v 5* 的三维结构, 参见图 10 (原稿在准备中)。

用兔多克隆抗体的免疫电泳

以重组 *Ves v 5* 蛋白质的形式生产 2 个 *Ves v 5* 突变体并检验了它们对多克隆兔抗体的反应性, 该抗体是对抗重组 *Ves v 5* 而产生的。当在天然条件下经火箭免疫电泳进行分析时, 兔抗体能够沉淀重组 *Ves v 5* 以及两种突变体, 显示这些突变体具有保守的 α -碳主链三级

结构。

特异性血清 IgE 的抑制

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Ves v 5* 突变体与重组 *Ves v 5* 的 IgE 结合性质，该测定使用衍生自黄蜂毒液变态反应患者的血清 IgE 库。

抑制测定如上文所述用生物素化的重组 *Ves v 5* 代替 *Bet v 1* 进行。

Ves v 5 Lys72Ala 突变体

位置 72 的赖氨酸显示高度的溶剂暴露（70%），并位于黄胡蜂属抗原 5 所共同的分子表面区块。溶剂暴露的相对方向和高程度的溶剂暴露说明赖氨酸 72 可被丙氨酸残基替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外，由于没有已知的异变态反应原序列在位置 72 具有丙氨酸，赖氨酸被丙氨酸的替换则产生了一个非天然存在的 *Ves v 5* 分子。

Ves v 5 Lys72Ala 突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体与重组 *Ves v 5* 的 IgE 结合性质，该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 14 表示由非生物素化的 *Ves v 5* 和 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体抑制生物素化的重组 *Ves v 5* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的各个重组蛋白质的量有明显的差别。重组 *Ves v 5* 在约 6 ng 即达到了 50% 的抑制，而相应的 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体的浓度为 40 ng。这

显示在 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体中引入的点突变以约 6 倍的系数降低了特异性血清 IgE 的亲合力。由 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体达到的最高抑制水平与重组 *Ves v 5* 相比明显较低。这可能显示在 Lys72Ala 替换之后, 一些存在于血清库中的特异的 IgE 不能识别 *Ves v 5* Lys72Ala 突变体。

Ves v 5 Tyr96Ala 突变体

位置 96 的酪氨酸显示了高度的溶剂暴露 (65%), 并位于黄胡蜂属抗原 5 所共同的分子表面区块。溶剂暴露的相对方向和高的溶剂暴露程度表明酪氨酸 96 可被丙氨酸残基替换而不使 α -碳主链三级结构发生变形。另外, 由于没有已知的异变态反应原序列在位置 96 具有丙氨酸, 酪氨酸被丙氨酸的替换则产生了一个非天然存在的 *Ves v 5* 分子。

Ves v 5 Tyr96Ala 突变体的 IgE 结合性质

在液相 IgE 抑制测定中比较 *Ves v 5* Tyr96Ala 突变体与重组 *Ves v 5* 的 IgE 结合性质, 该测定使用上述衍生自桦木变态反应患者的血清 IgE 库。

图 14 表示由非生物素化的 *Ves v 5* 和由 *Ves v 5* Tyr96Ala 突变体抑制生物素化的重组 *Ves v 5* 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的各个重组蛋白质的量中有明显的差别。重组 *Ves v 5* 在约 6 ng 即达到了 50% 的抑制, 而相应的 *Ves v 5* Tyr96Ala 突变体的浓度为 40 ng。

这显示在 *Ves v 5* Tyr96Ala 突变体中引入的点突变以约 6 倍的系数降低了特异性血清 IgE 的亲合力。

由 *Ves v 5* Tyr96Ala 突变体达到的最高抑制水平与重组 *Ves v 5*

相比明显较低。这可能显示在 Tyr96Ala 替换之后，一些存在于血清库中的特异性 IgE 不能识别 Ves v 5 Tyr96Ala 突变体。

实施例 3

对用于替换的氨基酸的确定和选择

用溶剂可接近性和保守程度参数来确定和选择适合于对变态反应原 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 Insight II 版本 97.0 (MSI) 和 1.4 Å 的探测半径来计算。

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 结构基于访问号 Z80104 (1bv1.pdb)。

包括在保守残基分析中的 38 个其他的 Bet v 1 序列包含访问号:

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。

Der p 2:

3-D 结构基于访问号 P49278 (1a9v.pdb) 的。

包括在保守残基分析中的 6 个其他的 Der p 2 序列包含下列替换:

ALK-G: V40L、T47S、M111L、D114N。

ALK-101: M76V。

ALK-102: V40L、T47S。

ALK-104: T47S、M111L、D114N。

ALK-113: T47S。

ALK-120: V40L、T47S、D114N。

Ves v 5:

3-D 结构基于访问号 Q05110 (pdb 坐标尚未发表)。

**在保守残基分析中的另一个 Ves v 5 序列含有一个氨基酸替换:
M202K。**

结果

Bet v 1

高溶剂暴露的 59 个氨基酸:

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。

高度溶剂暴露且保守 (>70%) 的 57 个氨基酸:

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。

进行的 23 个突变:

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

表 1 以下降顺序表示 Bet v 1 氨基酸的溶剂暴露程度的列表。第 1 列列出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 列列出正规化的溶剂暴露指数, 第 4 列列出了已知序列在该位置具有保守氨基酸的百分数。

表 1 : Bet v 1

NO	AA	Solv_exp	Cons %
	129K	1,000	90
	60E	0,986	97
	47N	0,979	100
	65K	0,978	100
	108P	0,929	100
	159N	0,869	100
	93D	0,866	100
	123K	0,855	100
	32K	0,855	100
	125D	0,821	74
	145R	0,801	90
	109D	0,778	82
	77T	0,775	56

127E	0,760	100
36Q	0,749	95
131E	0,725	100
152L	0,718	97
6E	0,712	100
96E	0,696	100
156D	0,693	97
63P	0,692	97
76H	0,683	90
8E	0,638	97
134K	0,630	100
45E	0,623	100
10T	0,613	97
12V	0,592	100
20K	0,584	100
62L	0,575	5
155S	0,568	97
126H	0,551	95
50P	0,541	100
78N	0,538	100
119K	0,529	100
2V	0,528	100
24L	0,528	100
42E	0,519	100
4N	0,517	95
153A	0,513	100
44I	0,508	97
138E	0,496	100
61G	0,488	100
130A	0,479	97
70R	0,474	100
28N	0,469	90
35P	0,467	100
149S	0,455	92
103K	0,447	100
150Y	0,438	100
154H	0,436	100
43N	0,412	100
106A	0,411	95
115K	0,411	100
14P	0,410	97
5Y	0,410	100
137K	0,396	100
141E	0,387	95
87E	0,385	100
73E	0,384	100
16A	0,367	100
79F	0,362	100
3F	0,355	100
158Y	0,346	100
105V	0,336	100
101E	0,326	100
64F	0,325	100
86I	0,322	100
39S	0,314	100
124G	0,310	100
72D	0,308	97

142T	0,293	67
66Y	0,289	100
55K	0,288	100
7T	0,279	67
40S	0,274	95
25D	0,271	87
135A	0,267	92
68K	0,262	100
97K	0,247	100
46G	0,235	100
27D	0,232	97
1G	0,227	100
113I	0,225	77
51G	0,220	100
92G	0,218	100
80K	0,212	100
110G	0,211	100
107T	0,203	85
94T	0,202	92
41V	0,201	97
48G	0,198	100
91I	0,192	18
31P	0,188	100
75D	0,188	97
33V	0,183	100
49G	0,176	100
17R	0,172	100
99S	0,158	64
89G	0,154	100
53I	0,154	100
121H	0,153	100
9T	0,150	72
74V	0,148	97
132Q	0,146	72
57S	0,137	49
148E	0,135	100
82N	0,133	41
128V	0,125	64
117S	0,124	87
90P	0,117	67
116I	0,112	100
122T	0,107	100
139M	0,104	62
95L	0,104	97
54K	0,096	100
146A	0,095	100
59P	0,088	97
157A	0,088	100
133V	0,077	44
88G	0,068	100
140G	0,053	85
37A	0,042	95
81Y	0,041	100
23I	0,036	95
104I	0,036	92

15A	0,036	97
58F	0,029	100
29L	0,028	100
19F	0,027	100
100N	0,022	97
22F	0,021	97
71V	0,014	100
111G	0,014	100
13I	0,014	100
18L	0,014	97
114L	0,014	100
11S	0,007	100
151L	0,007	97
144L	0,007	90
52T	0,007	100
84S	0,007	97
118N	0,007	97
102I	0,007	100
21A	0,000	97
26G	0,000	97
30F	0,000	44
34A	0,000	100
38I	0,000	87
56I	0,000	100
67V	0,000	97
69D	0,000	62
83Y	0,000	95
85V	0,000	72
98I	0,000	95
112S	0,000	77
120Y	0,000	95
136S	0,000	67
143L	0,000	100
147V	0,000	100

Der p 2

高度溶剂暴露的 55 个氨基酸:

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

高度溶剂暴露且保守 (>70%) 的 57 个氨基酸:

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

进行的 6 个突变:

K6A、K15E、H30N、E62S、H74N、K82N

表 2 以下降顺序表示 Des p 2 氨基酸的溶剂暴露程度的列表。第 1 列列出起始于氨基末端的氨基酸号码, 第 2 列以单字母缩写列出氨基酸, 第 3 列列出正规化的溶剂暴露指数, 第 4 列列出了已知序列在该位置具有保守氨基酸的百分数。

表 2: Der p 2

NO	AA	Solv_exp	Cons %
	128R	1,000	100
	129D	0,965	100
	11H	0,793	100
	30H	0,712	100
	1S	0,700	100
	77K	0,694	100
	75Y	0,681	100
	31R	0,677	100
	82K	0,658	100
	6K	0,645	100
	96K	0,643	100

48K	0,642	100
55K	0,641	100
89K	0,627	100
85Q	0,624	100
92W	0,610	100
97I	0,581	100
22H	0,568	100
65V	0,559	100
24S	0,557	100
74H	0,542	100
126K	0,542	100
61L	0,539	100
26P	0,516	100
93N	0,513	100
64D	0,509	100
28I	0,504	100
14K	0,493	100
100K	0,489	100
62E	0,454	100
127I	0,439	100
102E	0,428	100
25E	0,428	100
66P	0,427	100
114D	0,418	57
17L	0,412	100
60G	0,390	100
95P	0,388	100
53E	0,377	100
81V	0,377	100
51K	0,370	100
103N	0,369	100
2Q	0,366	100
46N	0,360	100
42E	0,357	100
91T	0,340	100
87D	0,334	100
10N	0,333	100
111M	0,325	71
8C	0,323	100
124H	0,315	100
68I	0,313	100
79P	0,307	100
109K	0,307	100
15K	0,302	100
49T	0,292	100
44N	0,291	100
113D	0,290	100
63V	0,286	100
105V	0,280	100
19P	0,270	100
84Q	0,264	100
76M	0,262	86
7D	0,251	100
116V	0,244	100
78C	0,238	100
36Q	0,235	100
45Q	0,233	100
40V	0,223	57
57S	0,212	100

38E	0,205	100
69D	0,203	100
9A	0,196	100
71N	0,190	100
98A	0,186	100
115G	0,180	100
13I	0,179	100
123T	0,179	100
34P	0,178	100
4D	0,157	100
20G	0,150	100
107T	0,143	100
12E	0,137	100
94V	0,137	100
121I	0,136	100
83G	0,128	100
70P	0,128	100
73C	0,120	100
3V	0,116	100
35F	0,111	100
59D	0,099	100
29I	0,098	100
23G	0,085	100
54I	0,075	100
5V	0,075	100
101S	0,074	100
72A	0,069	100
27C	0,060	100
32G	0,059	100
99P	0,058	100
86Y	0,056	100
16V	0,052	100
50A	0,040	100
90Y	0,039	100
18V	0,035	100
33K	0,033	100
52I	0,029	100
58I	0,029	100
104V	0,024	100
112G	0,023	100
21C	0,023	100
88I	0,023	100
117L	0,016	100
56A	0,011	100
41F	0,011	100
120A	0,006	100
119C	0,006	100
67G	0,005	100
122A	0,005	100
37L	0,000	100
39A	0,000	100
43A	0,000	100
47T	0,000	29
80L	0,000	100
106V	0,000	100
108V	0,000	100
110V	0,000	100
118A	0,000	100
125A	0,000	100

Ves v 5

高度溶剂暴露的 89 个氨基酸:

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

高度溶剂暴露且保守(>70%)的 88 个氨基酸:

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

进行的 9 个突变:

K29A、T67A、K78A、V84S、Y102A、K112S、K144A、K202M、N203G

表 3 以下降顺序表示 Ves v 5 氨基酸的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列列出了正规化的溶剂暴露指数，第4列列出了已知序列在该位置具有保守氨基酸的百分数。

表3: Ves v 5

NO	AA	Solv_exp	
	16K	1,000	100
	185K	0,989	100
	11K	0,978	100
	44K	0,978	100
	210K	0,962	100
	63R	0,956	100
	13K	0,951	100
	6F	0,868	100
	149K	0,868	100
	128K	0,857	100
	184E	0,841	100
	112K	0,824	100
	202K	0,824	50
	157F	0,819	100
	3E	0,802	100
	29K	0,797	100
	203N	0,797	100
	34N	0,775	100
	78K	0,775	100
	151K	0,753	100
	15L	0,714	100
	158L	0,714	100
	102Y	0,687	100
	186W	0,665	100
	134K	0,654	100
	87D	0,621	100
	52K	0,615	100
	67T	0,610	100
	125T	0,610	100
	150K	0,604	100
	40Y	0,593	100
	48Q	0,593	100
	65L	0,593	100
	81K	0,588	100
	101Q	0,577	100
	208Q	0,566	100
	144K	0,560	100
	8N	0,555	100
	70N	0,549	100
	104H	0,549	100
	45Q	0,538	100
	137K	0,538	100
	159K	0,533	100
	205E	0,511	100
	82N	0,500	100
	111A	0,500	100
	131D	0,495	100
	24K	0,489	100
	36V	0,489	100
	7N	0,484	100
	138M	0,473	100

209T	0,473	100
84V	0,462	100
172K	0,451	100
19V	0,445	100
56D	0,445	100
73P	0,440	100
33G	0,429	100
106T	0,429	100
170N	0,429	100
28L	0,423	100
43T	0,423	100
114Q	0,423	100
10C	0,412	100
60K	0,407	100
31N	0,396	100
47K	0,396	100
5E	0,390	100
145D	0,390	100
38V	0,379	100
127A	0,379	100
156D	0,379	100
204E	0,374	100
71P	0,363	100
26G	0,352	100
129Y	0,352	100
141D	0,341	100
201F	0,341	100
68R	0,335	100
200N	0,308	100
49D	0,302	100
153S	0,302	100
35K	0,297	100
39S	0,291	100
25Y	0,280	100
37V	0,280	100
18G	0,275	100
85W	0,275	100
182I	0,275	100
46E	0,264	100
126A	0,253	100
88E	0,247	100
76P	0,236	100
79N	0,236	100
124S	0,236	100
30P	0,231	100
123G	0,231	100
162H	0,231	100
183Q	0,231	100
12I	0,225	100
197P	0,225	100
130D	0,220	100
148P	0,214	100
180K	0,214	100
23C	0,209	100
75P	0,209	100
113Y	0,209	100
108R	0,203	100
188K	0,203	100
51L	0,198	100
59Q	0,198	100

121L	0,198	100
122T	0,198	100
154G	0,192	100
53E	0,170	100
72G	0,170	100
41G	0,165	100
86N	0,165	100
147N	0,165	100
173E	0,165	100
27S	0,159	100
94Q	0,159	100
187H	0,159	100
142E	0,154	100
64G	0,148	100
17G	0,143	100
133V	0,137	100
42L	0,121	100
155N	0,121	100
55N	0,115	100
91Y	0,115	100
69G	0,110	100
103G	0,110	100
198S	0,110	100
109D	0,093	100
207Y	0,082	100
96W	0,077	100
161G	0,077	100
140E	0,071	100
152F	0,071	100
80M	0,066	100
117Q	0,066	100
4A	0,060	100
32C	0,055	100
90A	0,055	100
206L	0,055	100
22A	0,049	100
110V	0,044	100
146Y	0,044	100
14C	0,038	100
9Y	0,033	100
62A	0,033	100
132P	0,033	100
57F	0,027	100
99Q	0,027	100
100C	0,027	100
199G	0,027	100
77A	0,022	100
105D	0,022	100
119V	0,022	100
20H	0,016	100
83L	0,016	100
120A	0,016	100
139W	0,016	100
176C	0,016	100
178S	0,016	100
181Y	0,016	100
95V	0,011	100
115V	0,011	100
116G	0,011	100
165Q	0,011	100

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

实施例 4

本实施例描述了制备和表征根据本发明的重组突变体 Bet v 1 变态反应原，即包含至少 4 个初级突变且具有减小的 IgE 结合亲和力的变态反应原。

用于 Bet v 1 定点突变的氨基酸残基的选择

Bet v 1 的氨基酸残基的溶剂可接近性如实施例 3 表 1 所示。氨基酸保守的比率基于用 ClustalW 算法以 BLAST 搜索在 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) 上进行的序列比对，其中用 Bet v 1.2801 野生型氨基酸序列作为输入序列。该比对包括来自 *Fagales* 目中物种 (Bet v 1: 白桦 (*Betula verrucosa*); Car b 1: 桦叶鹅耳枥 (*Carpinus betulus*); Cor a 1: *Corylus avellana*; Aln g 1: 胶桤木 (*Alnus glutinosa*)) 的 67 个变态反应原序列 (39 个 Bet v 1 序列、11 个 Car b 1 序列、6 个 Cor a 1 序列和 13 个 Aln g 1 序列)。考虑到在实施例中显示的突变重组 Bet v 1 变态反应原，用于替换的目标残基基于 $\geq 95\%$ 的氨基酸一致性。

如在实施例 1 中所描述的，将来自相关物种的花粉变态反应原之间具有高溶剂暴露程度的和高度保守性的氨基酸残基选来用于定点突变。不认为具有低溶剂暴露程度的 ($<20\%$) 残基与诱变相关，这是由于可能的三级结构破坏或抗体相互作用的缺乏。

引入的残基都存在于一组称为病理相关 (PR-10) 蛋白质的植物蛋白质同种型的相应位置。分子模型暗示 *Fagales* 变态反应原和 PR-10 蛋白质的三级结构近乎相同。Bet v 1 与 PR-10 蛋白质共享显著的序列一致性 (20-40%)。然而，没有对这些 PR-10 蛋白质的变态反应交叉反应性的报道。因而，来自 Bet v 1 的高度保守和溶剂暴露的氨基酸与 PR-10 蛋白质中相应位置上的氨基酸的交换导致一个突变的 Bet v 1 蛋白质，其 α -碳主链三级结构没有改变但具有减小的 IgE 结

合亲和力。

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 个初级突变的重组变态反应原突变体的制备包括两个 PCR 步骤：步骤 I 和步骤 II。首先，分别用包含每个突变的有义和反义突变特异性寡核苷酸引物连同包含上游或下游临近突变或 Bet v 1 的 N-末端/C-末端的有义和反义寡核苷酸引物，将单一的突变（或者几个突变，如果它们在 DNA 序列中紧密靠在一起）引入到 Bet v 1.2801 或 Bet v 1.2801 衍生物连续的 DNA 序列中。如在图 17 中示意性阐明的（I）。其次，将来自 PCR 反应 I 的 PCR 产物纯化、混合并用作另外的 PCR 反应（II）的模板，其寡核苷酸引物包含 Bet v 1 的 N-末端和 C-末端，如在图 17 中示意性阐明的（II）。将 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳和 PCR 凝胶纯化（Life Technologies）和随后的乙醇沉淀进行纯化，用限制性内切酶（Sac I /EcoR I）或（Sac I /Xba I）进行切割，并定向地连接入用相同的酶限制酶切的 pMAL-c 中。

图 18 表示合成的寡核苷酸引物和对构建具有 5~9 个初级突变的 Bet v 1 突变体的示意性阐明。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 突变体为如下在括弧中陈述的一次和二级突变：

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。

核苷酸测序

对 Bet v 1 编码基因核苷酸序列的确定分别在亚克隆前后及随后的体外诱变中进行。

按照供应商的建议,将来自 10 ml 在补充了 0.1 g/l 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜至饱和的细菌培养物的质粒 DNA 用 Qiagen-tip 20 柱进行纯化,并用均来自 (Perkin Elmer) 的快速反应染料终止子循环测序试剂盒 (Ready reaction dye terminator cycle sequencing kit) 和荧光测序仪 (Fluorescence Sequencer) AB PRISM 377 进行测序。

重组 Bet v 1 和突变体的表达和纯化

如在参考文献 15 中所描述的,将重组 Bet v 1 (Bet v 1 No. 2801 和突变体) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 中过量表达,融合到麦芽糖结合蛋白质上并纯化。简要地,使重组的大肠杆菌细胞在 37 $^{\circ}$ C 生长到 600 nm 时光密度为 0.8,随之由添加 IPTG 来诱导 Bet v 1 融合蛋白质的表达。在诱导后 3 小时通过离心来收集细胞,重悬于裂解缓冲液中并用超声断裂。在超声处理和额外的离心之后,通过直链淀粉亲和层析分离重组的融合蛋白质并随后通过与因子 Xa 的温育

来切割（参考文献 15）。在 F Xa 切割后，将重组 *Bet v 1* 用凝胶过滤来分离，并进行另一轮的直链淀粉亲和层析以除去痕量的麦芽糖结合蛋白质。

将纯化的重组 *Bet v 1* 超滤浓缩为约 5 mg/ml 并贮存于 4℃。纯化的重组 *Bet v 1* 制备物的终产量为每升大肠杆菌细胞培养物 2~5 mg。

纯化的重组 *Bet v 1* 制备物经银染 SDS-聚丙烯酰胺电泳后显示单一的表现分子量为 17.5 kDa 的条带。

我们在前面显示（参考文献 15）重组 *Bet v 1* No. 2801 与天然存在的 *Bet v 1* 在免疫化学上不能相区别。

Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体

图 19 表示在 *Bet v 1* (2628) 和 *Bet v 1* (2637) 分子表面引入点突变。在突变体 *Bet v 1* (2628) 中，在 *Bet v 1* 的一半上引入 5 个初级突变而另一半没有改变。在突变体 *Bet v 1* (2637) 中，在 *Bet v 1* 的另一半上引入 5 个初级和 3 个二级突变，而第一半不改变。通过这个途径，在突变体 *Bet v 1* (2628) 和突变体 *Bet v 1* (2637) 中的突变分别影响 *Bet v 1* 表面的不同的一半。

重组 Bet v 1 (2628) 突变体的结晶和结构确定

重组 *Bet v 1* (2628) 的晶体于 25℃ 蒸气扩散来生长，基本如在 (Spangfort 等人 1996b, 参考文献 21) 中所描述。将浓度为 5 mg/ml 的 *Bet v 1* (2628) 与相同体积的 2.2M 的硫酸铵、0.1 M 的柠檬酸钠、1% (v/v) 的二氧六环，pH 6.3 的溶液混合，并对 100x 体积的 2.2 M 的硫酸铵、0.1 M 的柠檬酸钠、1% (v/v) 的二氧六环，pH 6.3 的溶液进行平衡。平衡 24 小时之后，通过采用在参考文献 21 中所描述的加晶种技术来诱导晶体生长，这里用重组体的野生型 *Bet*

v 1 作为晶种来源。

约 4 个月后, 收获晶体并用如参考文献 21 所描述的从 Rigaku 旋转阳极生成的 X-射线进行分析, 且该结构用分子置换 (molecular replacement) 来解析。

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) 蛋白质晶体而陈述, 当用旋转阳极生成的 X-射线进行分析时该晶体衍射为 2.0 Å 的分辨率。替换 Tyr5Val、Glu45Ser、Lys65Asn、Lys97Ser、Lys134Glu 是通过 Bet v 1 (2628) 的结构电子密度图象证实的, 该图象也显示总的 α -碳主链三级结构是保守的。

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 20 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 α -碳主链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 结合性质

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变态反应患者的血清 IgE 库。

如在实施例 1 中所描述, 重组 Bet v 1.2801 以摩尔比为 1: 5 进行生物素化 (Bet v 1 no. 2801: 生物素)。抑制测定如下进行: 将血

清样品 (25 μ 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。结合到固相的生物素化的 Bet v 1.2801 的量通过在温育后用丫啶酯标记的链酶抗生物素测量 RLU 来估计。抑制的程度计算为用缓冲液和突变体作抑制制备物所获得的 RLU 比率。

图 21 表示由非生物素化的 Bet v 1.2801 和 Bet v 1 (2628)、Bet v 1 (2637) 以及 Bet v 1 (2628) 与 Bet v 1 (2637) 的 1: 1 混合物抑制生物素化的重组 Bet v 1.2801 与来自变态反应患者库的血清 IgE 的结合。

对存在于血清库中的血清 IgE 的结合达到 50% 的抑制所必需的各个重组蛋白质的量有明显的差别。重组 Bet v 1.2801 在约 5 ng 即达到了 50% 的抑制, 而相应的 Bet v 1 (2628) 突变体的浓度为约 15-20 ng。这显示在 Bet v 1 (2628) 突变体中引入的点突变以约 3-4 倍的系数降低了特异性血清 IgE 的亲合力。

由 Bet v 1 (2628) 突变体达到的最高抑制水平与重组 Bet v 1.2801 相比明显较低。这可能显示由于点突变的引入, 一些存在于血清库中的特异性 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 相比将对特异性血清 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 的抑制曲线相比于 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质的抑制曲线所得的明显的倾角差别的支持。提供证据表明 IgE 结合减少的不同的倾角归因于与 Bet v 1.2801 相比突变体显然不同的抗原决定部位的模式。

除用单独修饰的变态反应原的进行抑制测定之外, 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, 它们显示完全能抑制 rBet v 1.2801 对 IgE 的结合 (100%)。完全抑制 IgE 结合的能力清楚表明所有存在于 Bet v 1.2801 上的活性抗原决定部位

也存在于 1: 1 的变态反应原混合物中。进一步的证明来自 Bet v 1.2801 和变态反应原混合物两抑制曲线的可相比较的倾角。混合的变态反应原样品减少的 IgE 反应性通过当与 Bet v 1.2801 相比时, 为得到 50% 的 IgE 结合抑制需要高 4-倍浓度的变态反应原混合物来证明。

用突变的重组 Bet v 1 变态反应原进行 T 细胞增殖测定

该分析以如参考文献 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变态反应患者中的 T 细胞系的增殖, 其刺激指数与重组体的和天然存在的情况相似。这暗示 Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质均能起始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

嗜碱白细胞组胺释放如下进行。从每个桦木花粉变态反应患者取肝素化的血液 (20 ml), 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 微升的变态反应原或抗-IgE 于 37°C 温育 1 小时。其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 22 和图 23 中显示。Bet v 1 (2628) 和 Bet v 1 (2637) 突变体蛋白质在来自两个桦木花粉变态反应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)

Bet v 1 (2744) 和突变体 Bet v 1 (2753) 同样构建用作混合的变态反应原疫苗。在这些突变变态反应原中, 点突变如图 24 和 25 所示以一种全表面排列的方式分布, 并再次设计为分别在两个分子中影响不同的表面, 如在图 26 中所示。然而, 这些修饰的变态反应原也可单独用作单一变态反应原疫苗。

Bet v 1 (2744) 突变体蛋白质的结构分析

纯化的 Bet v 1 (2744) 突变体的结构完整性用圆二色 (CD) 谱学分析。图 27 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, 这强有力地暗示 α -碳主链三级结构没有受到氨基酸替换引入的影响。

Bet v 1 (2744) 的组胺释放性质

从来自 5 种不同的花粉变态反应患者的嗜碱白细胞的 5 个实验中得来的组胺释放数据在图 29 和图 29A-D 中显示。已检验了 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。突变的变态反应原的释放曲线与 Bet v 1.2801 的释放曲线相比明显地右移, 这表明 Bet v 1 (2744) 释放组胺的潜能减少了 3~5 倍。

突变体 Bet v 1 (2733)

已构建并重组表达了具有 9 个初级突变的突变体 **Bet v 1 (2733)**。突变体 **Bet v 1 (2733)** 中点突变的分布留下了几个组成 $>400 \text{ \AA}^2$ 的没有改变的表面区域。图 30 表示在 **Bet v 1 (2733)** 分子表面引入的点突变。

实施例 5

本实施例描述了编码来自屋尘螨 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 的 **Der p 2** 的基因的克隆和具有减少的 IgE 结合亲和力的突变体的构建。

从屋尘螨第一链 cDNA 合成所得的 PCR 扩增产物得自 Dr. Wendy-Anne Smith 和 Dr. Wayne Thomas (TVW Telethon Institute for Child Health Research, 100 Roberts Rd, Subiaco, Western Australia 6008)。在第一链 cDNA 文库的扩增中, **Der p 2** 被选择性地用 **Der p 2** 特异性引物进行扩增。随后将 PCR 片段克隆入 pUC19 的 **BamH I** 位点 (New England BioLabs)。 **Der p 2** 的 DNA 测序用载体特异性有义 (5'-GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG-3') 和反义引物 (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-3') 进行。

确定了总共 7 种独特的 **Der p 2** 同种型, 称为 **ALK-101**、**ALK-102**、**ALK-103**、**ALK-104**、**ALK-113**、**ALK-114**、**ALK-120**。将标号为 **ALK-114** 的克隆选作起始点以生成低亲和力的 IgE 突变体, 这是由于其与具有数据库访问号 1A9V 的 **Der p 2** NMR 结构的高度序列一致性。与 **ALK-114** 相比, 6 个其他天然存在的同种型包含如下替换:

ALK-101: M76V.

ALK-102: V40L, T47S.

ALK-103: M111L, D114N.

ALK-104: T47S, M111L, D114N.

ALK-113: T47S.

ALK-120: V40L、T47S、D114N.

将 Der p 2 插入 pGAPZ α -A

将编码 Der p 2 (ALK-114) 的基因随后插入 pGAPZ α -A 载体中 (Invitrogen) 以得到 Der p 2 在毕赤巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*) 中的分泌表达。将该基因是用分别相应于 Der p 2 多肽的氨基 - 和羧基端的有义引物 OB27 (5'-GGAATTCCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTGTGCC-3') 和反义引物 OB28 (5'-CGTTCTAGACTATTAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3') 进行扩增。将引物在 5'-端延长以分别包含限制酶切位点 Xho I 和 Xba I。Xho I 限制酶切位点使 Der p 2 的第一个密码子以符合阅读框形式与编码 pGAPZ α -A 的 KEX2 切割位点 (LYS-ARG) 的核酸序列融合。单轮的 PCR 反应在 100 微升 (μ l) 体积进行的: 0.1 mg 的模板 ALK-114 DNA, 1X Expand 聚合酶缓冲液 (得自 Boehringer Mannheim), 各 0.2 毫摩尔 (mM) 的 4 种 dNTPs, 各 0.3 微摩尔 (μ M) 的有义和反义引物和 2.5 单位的 Expand 聚合酶 (得自 Boehringer Mannheim)。DNA 在 25 个循环中扩增: 95°C 15 秒, 45°C 30 秒, 72°C 1 分钟, 随后 1 个 72°C 循环 7 分钟。将结果所得的 475 碱基对的 ALK-114 PCR 片段用 QIAquick 旋转纯化程序 (得自 Qiagen) 进行纯化。然后将纯化的 DNA 片段用 Xho I 和 Xba I 消化, 凝胶纯化并连接入以相似方式消化的 pGAPZ α -A 中。将连接反应转化入大肠杆菌菌株 DH5 α , 结果得到质粒 pCBo06。

Der p 2 的核苷酸序列通过在克隆前后及随后的体外诱变中的 DNA 测序来证实 (见下文)。

Der p 2 序列

SEQ ID NO 1 相应于 Der p 2 的核酸序列 (ALK-114):

```

1   gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtagcagga
61  tgccatgggttcagaacccatgtatcattcatcgtggtaaaccattccaattggaagccgtt
121 ttcgaagccaacccaaaacacaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcctcaatcgatggt
181 ttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattacatgaaatgccattg
241 gttaaaggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttccgaaaattgcacaaaa
301 tctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttatgggtgatgatggtgttttggcctgtgct
361 attgctactcatgctaaaatccgcgattaa

```

SEQ ID NO 2 相应于推定的 Der p 2 氨基酸序列 (ALK-114):

```

1   dqvdvkdcanheikkvlvpchgsepciihrgkpfqleavfeanqntktakieikasidg
61  levdivpgidpnachymkcplvkqggydikytwnvpkiapksenvvvtvkvmgddgvlaca
121 iathakird

```

将 pGAPZ α -A-Der p 2 插入到毕赤巴斯德酵母中

将载体 pCBo06 用 Avr II 限制性内切酶线性化并转化到感受态毕赤巴斯德酵母菌株 X-33 中, 如在 Invitrogen 使用手册中所述。选择对 100 微克每毫升 ($\mu\text{g/ml}$) 的 Zeocin 具抗性的重组细胞, 将菌落在含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin 的新鲜 YPD 平板上纯化。

重组 Der p 2 的表达和纯化

将 250 ml 含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin 的 YPD 培养基 (1% 的酵母提取物、2% 的蛋白胨、2% 的葡萄糖) 用表达 Der p 2 的重组酵母细胞过夜培养物进行接种。使培养物在 30°C 生长 72 小时以获得适当的 Der p 2 表达。细胞通过离心收集, 将结果所得的培养物上清液用 50% 的硫酸铵饱和。在用 3000x g 离心 30 分钟之后, 将上清液用 80% 的硫酸铵饱和。离心后, 将沉淀重悬于 150 毫摩尔 (mM) 的 NH_4HCO_3 中并在用相同的缓冲液平衡的 Superdex 75 凝胶过滤柱上

分级分离。

Der p 2 作为相应于其预期分子量的主要峰洗脱。Der p 2 的洗脱通过随后进行银染的 SDS PAGE 电泳和用 Der p 2 特异性多克隆抗体的免疫印迹进行监控。

用于定点突变的氨基酸残基的选择

用于定点突变的氨基酸残基的选择基于对来自屋尘螨 (Der p 2/f 2 和 Eur m 2) 和贮存螨 (storage mite) (Tyr p 2、Lep d 2、Gly d 2) 的变态反应原中高度溶剂暴露和高度保守性的残基的确定。高度溶剂暴露的残基通过 Der p 2 NMR 结构 (#1.9, 1A9V.pdb) 的分子表面的分析直观确定。选择了 12 个氨基酸残基用于诱变: K6A、N10S、K15E、S24N、H30N、K48A、E62S、H74N、K77N、K82N、K100N 和 R128Q。

定点突变

具有单个初级突变和其多重组合的重组突变变态反应原的构建描述如下。

编码 Der p 2 突变体的表达质粒是用 pCBo06 作为 DNA 模板而生产的。PCR 反应用插入了特定突变的有义和反义引物进行。用于 PCR 反应以生成特定突变的引物对列在图 31 中。突变以粗体标明, 且用于随后的克隆步骤的限制酶切位点在图中加下划线。对于突变体 K6A、K15E、H30N、H74N 和 K82N 的构建, PCR 反应基本是如在“将 Der p 2 克隆入 pGAPZ α -A”部分中所描述的那样进行的。将纯化的 PCR 片段在标明的限制性酶切位点 (参见图 31) 消化、凝胶纯化、连接入用相似消化的 pCBo06 并转化入大肠杆菌 DH5 α 。

突变 E62S 是以在实施例 1 中对 Bet v 1 突变体的生成所描述的另一种 PCR 诱变方法学生成。合成了两个覆盖特定的突变的突变特

异性寡核苷酸引物 (OB47 和 OB48, 在图 31 中列出)。两个用于二次扩增步骤的额外引物为 OB27 和 OB28 如在“将 Der p 2 插入 pGAPZ α -A”部分中所描述。

生产的变态反应原突变体用如在实施例 4 中所描述的相同方法来描述特性, 如圆二色 (CD) 谱、结晶、IgE 结合性质的测量、组胺释放、T 细胞增殖刺激能力等。

实施例 6

具有对特异性变态反应疫苗改善的安全性的突变的重组螨变态反应原 (Der p 2)

在本实施例中, 当前发明对屋尘螨变态反应原概念的应用由一个变态反应原 Der p 2 作为例子。对其他屋尘螨变态反应原的处理可通过相当的程序进行。

突变的重组 Der p 2 分子的设计

SED ID NO. 3 表示 Der p 2-ALK-G 克隆的核苷酸和推定的氨基酸序列, 该克隆是野生型的同种型。

SED ID NO. 3: Der p 2-ALK-G 的核苷酸和推定的氨基酸序列。

GAT CAA GTC GAT GTC AAA GAT TGT GCC AAT CAT GAA ATC AAA AAA	45
D Q V D V K D C A N H E I K K	15
GTT TTG GTA CCA GGA TGC CAT GGT TCA GAA CCA TGT ATC ATT CAT	90
V L V P G C H G S E P C I I H	30
CGT GGT AAA CCA TTC CAA TTG GAA GCT TTA TTC GAA GCC AAT CAA	135
R G K P F Q L E A L F E A N Q	45
AAC TCA AAA ACA GCT AAA ATT GAA ATC AAA GCT TCA ATC GAT GGT	180
N S K T A K I E I K A S I D G	60
TTA GAA GTT GAT GTT CCC GGT ATC GAT CCA AAT GCA TGC CAT TAT	225
L E V D V P G I D P N A C H Y	75

ATG	AAA	TGT	CCA	TTG	GTT	AAA	GGA	CAA	CAA	TAT	GAT	ATT	AAA	TAT	270
M	K	C	P	L	V	K	G	Q	Q	Y	D	I	K	Y	90
ACA	TGG	AAT	GTT	CCA	AAA	ATT	GCA	CCA	AAA	TCT	GAA	AAT	GTT	GTC	315
T	W	N	V	P	K	I	A	P	K	S	E	N	V	V	105
GTC	ACT	GTT	AAA	GTT	TTG	GGT	GAT	AAT	GGT	GTT	TTG	GCC	TGT	GCT	360
V	T	V	K	V	L	G	D	N	G	V	L	A	C	A	120
ATT	GCT	ACT	CAT	GCT	AAA	ATC	CGC	GAT							387
I	A	T	H	A	K	I	R	D							129

图 32 表示用 ClustalW 算法以 BLAST 搜索在 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) 上进行的序列比对, 其中用表示于 SED ID NO. 3 中的 Der p 2-ALK-G 的氨基酸序列作为输入序列。该比对包括来自屋尘螨物种的序列, 即 Der p 2、Der f 2 和 Eur m 2。在图 32 中, 与 Der p 2-ALK-G 蛋白质序列相同位置上氨基酸相同的氨基酸残基在灰色背景上用黑体突出。不相同的氨基酸以白色背景用黑色印刷。

表面结构图象

代表屋尘螨类群 2 变态反应原的氨基酸序列具有超过 85% 的相似性, 且一些分子表面保守 (灰色带), 参见图 33。图 33 表示当将 Der p 2-ALK-G 蛋白质序列添加到发表的 PDB: 1A9V NMR 结构上时, 即 10 个包含在 PDB 文件中编号为 1 的结构, 从 4 个不同的角度观察的表面外形。

将保守的和高度溶剂暴露的氨基酸选来用于突变, 这些氨基酸在空间上在 25-30 Å 范围的距离内分布在整个表面。在下面的部分中, 给出了下述信息: 认为适合用于突变的氨基酸列表 (A)、设计的突变的列表 (B) 和代表设计的突变的 DNA 序列 (C)。图 34 表示作为例子的以 1 号突变体的分子外形。灰色显示保守的氨基酸残基。黑色显示选来用于突变的氨基酸残基。

A. 选来用于突变的氨基酸列表

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

B. 设计的突变的列表

突变体 1:

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

突变体 2:

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

突变体 3:

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

突变体 4:

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

突变体 5:

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

突变体 6:

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

突变体 7:

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

突变体 8:

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

突变体 9:

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

突变体 10:

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

突变体 11:

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

突变体 12:

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

C. 突变体的核苷酸序列

突变体 1:

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

```
GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtagatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatccgcgat
```

突变体 2:

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

```
GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCgttgatgttcccggtagatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaaatactgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat
```

突变体 3:

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

```
GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttagaagttgatgttcccggtagatccaaatgcatgccattatatg
AACTgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat
```

突变体 4:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAgttttggtagca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaaaaacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggttaAGCgtagtgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AActgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAActctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 5:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAgttttggtagca
ggatgccatggttcagaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggttaAGCgtagtgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AActgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAActctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 6:

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

Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaagttttggtagca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattGGCcgtaggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggttaAGCgtagtgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatg
AActgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAActctgaaaatgttgtcgtcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 7:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatgggAACgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatttcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggtttaAGCggttgatgttcccgggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagttttgggtgataat
gggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatccgcat

突变体 8:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatgggAACgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatttcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggtttaAGCggttgatgttcccgggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcacaaaaatctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagttttgggtgataat
gggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 9:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGtttttggtacca
ggatgccatgggAACgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttatttcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatgggtttagaagttgatgttcccgggtatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aaatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgctcgtcactgttaaagttttgggtgataat
gggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 10:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 11:

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

GatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaGAAGttttggtacca
ggatgccatggttcagaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCggttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

突变体 12:

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

Gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtacca
ggatgccatggtAACgaaccatgtatcattcatAGCggtaaaccattccaattggaa
gctttattcgaagccaatcaaaactcaGCGacagctaaaattgaaatcaaagcttca
atcgatggtttaAGCggttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgcAACTatatg
aatgtccattgggtAACggacaacaatatgatattaaatatacatggaatgttcca
aaaattgcaccaAACTctgaaaatgttgtcgctcactgttaaagttttgggtgataat
ggtgttttggcctgtgctattgctactcatgctaaaatcCAGgat

实施例 7

具有对特异性变态反应疫苗改善的安全性的突变的重组螨变态反应原 (Der p 1)

在本实施例中，当前发明对屋尘螨变态反应原概念的应用由一个变态反应原 Der p 1 作为例子。对其他屋尘螨变态反应原的处理可通过相当的程序进行。

突变的重组 Der p 1 分子的设计

SED ID NO. 4 表示 Der p 1-ALK 克隆的核苷酸和推定的氨基酸序列，该克隆是野生型的同种型。

SED ID NO. 4: Der p 1-ALK 的核苷酸和推定的氨基酸序列。

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

```

TGG GGT GAT AAT GGT TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG      630
W  G  D  N  G  Y  G  Y  F  A  A  N  I  D  L      210

ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC ATT CTC      666
M  M  I  E  E  Y  P  Y  V  V  I  L      222

```

图 35 表示用 ClustalW 算法以 BLAST 搜索在 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) 上进行的序列比对, 其中用表示于 SED ID NO. 4 中的 Der p 1-ALK 的氨基酸序列作为输入序列。该比对包括来自屋尘螨物种的序列, 即 Der p 1、Der f 1 和 Eur m 1。在图 35 中, 与 Der p 1-ALK 蛋白质序列相同位置上氨基酸相同的氨基酸残基在灰色背景上用黑体突出。不相同的氨基酸以白色背景用黑色印刷。

表面结构图象

代表屋尘螨类群 1 变态反应原的氨基酸序列具有某些程度的相似性, 且一些分子表面是保守的 (灰色带), 参见图 36。图 36 表示当将 Der p 1-ALK 蛋白质序列迭加到 Der p 1 分子结构模型上时从 4 个不同的角度观察的表面外形。

将保守的和高度溶剂暴露的氨基酸选来用于突变, 这些氨基酸在空间上在 25-30 Å 范围的距离内分布在整个表面。在下面的部分中, 给出了下述信息: 认为适合用于突变的氨基酸列表 (A)、设计的突变的列表 (B) 和代表设计的突变的 DNA 序列 (C)。图 37 以编号为 11 的突变体作为例子表示分子外形。灰色显示保守的氨基酸残基。黑色显示选来用于突变的氨基酸残基。

A. 选择来用于突变的氨基酸列表

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

B. 设计的突变的列表

突变体 1:

P24T、Y50V、R78E、R99Q、R156Q、R161E、P167T

突变体 2:

P24T、Y50V、R78Q、R99E、R156E、R161Q、P167T

突变体 3:

R20E、Y50V、R78Q、R99Q、R156E、R161E、P167T

突变体 4:

R20Q、Y50V、R78E、R99E、R156Q、R161Q、P167T

突变体 5:

P24T、Y50V、S67N、R99E、R156Q、R161Q、P167T

突变体 6:

R20E、Y50V、S67N、R99E、R156Q、R161E、P167T

突变体 7:

R20Q、Y50V、S67N、R99Q、R156E、R161E、P167T

突变体 8:

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

突变体 9:

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

突变体 10:

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

突变体 11:

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

C. 突变体的核苷酸序列

突变体 1:

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

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT GAA ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60

ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120

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

突变体 2:

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

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

突变体 3:

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

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

CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666

突变体 4:

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

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

突变体 5:

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

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

突变体 6:

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

```

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

```

突变体 7:

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

```

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

```

突变体 8:

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

```

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180

```


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

突变体 9:

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

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

突变体 10:

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

ACT AAC GCC TGC AGT ATC AAT GGA AAT GCT CCA GCT AGC ATC GAT TTG CGA CAA ATG CGA 60
 ACT GTC ACT ACC ATT CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG GCT TTC TCT GGT GTT 120
 GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCT GTG CGT AAT CAA TCA TTG GAT CTT GCT GAA CAA 180
 GAA TTA GTC GAT TGT GCT TCC CAA CAC GGT TGT CAT GGT GAT ACC ATT CCA GAA GGT ATT 240
 GAA TAC ATC CAA CAT AAT GGT GTC GTC CAA GAA AGC TAC TAT CGA TAC GTT GCA CAG GAA 300
 CAA TCA TGC CGA CGA CCA AAT GCA GAT CGT TTC GGT ATC TCA AAC TAT TGC CAA ATT TAC 360

CCA CCA AAT GTA AAC AAA ATT GAA GAA GCT TTG GCT CAA ACC CAC AGC GCT ATT GCC GTC 420
ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT GAT GGC CAG ACA ATC ATT CAA 480
GAA GAT AAT GGT TAC CAA ACC AAC TAT CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA 540
CAA GGT GTC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TTT GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT 600
TAC GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA TAT GTT GTC 660
ATT CTC 666

突变体 11:

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

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

实施例 8

具有对特异性变态反应疫苗改善的安全性的突变的重组草变态 反应原 (Phl p 5)

在本实施例中, 当前发明对草花粉变态反应原概念的应用由一

个变态反应原 Phl p 5 作为例子。对其他草花粉变态反应原的处理可通过相当的程序进行。

突变的重组 Phl p 5 分子的设计

SED ID NO. 5 表示 Phl p 5.0103 克隆的核苷酸和推定的氨基酸序列，该克隆是野生型的同种型。

SED ID NO. 5: Phl p 5.0103 的核苷酸和推定的氨基酸序列。

```

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgcggctacacccccgcc      60
A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A      20
acccccgcgcgcgcgcgcggagcggagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
T P A A P A G A E P A G K A T T E E Q K      40
ctgatcgagaagatcaacgcgcggttcaaggcggccttggcgcgtgccgcgcgcgtcccg      180
L I E K I N A G F K A A L A A A A G V P      60
ccagcggacaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgcgcctccaacaaggccttc      240
P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F      80
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcgaatccagctccaaggcgcgcgtc      300
A E G L S G E P K G A A E S S S K A A L      100
acctccaagctcgacgcgcgcctacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
T S K L D A A Y K L A Y K T A E G A T P      120
gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcacatcgcgcggc      420
E A K Y D A Y V A T V S E A L R I I A G      140
acctcgagggtccacgcgcgtcaagccccgcggcgcgaggaggtcaagggtcatccccgcgcgc      480
T L E V H A V K P A A E E V K V I P A G      160
gagctgcagggtcatcgagaagggtcgacgcgcgccttcaagggtcgctgccaccgcgcgccaac      540
E L Q V I E K V D A A F K V A A T A A N      180
gcgcgcgcgcgccaacgcacaagttcacccgtcttcgaggcgcgccttcaacgcacgccatcaag      600
A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K      200
gcgagcacgggcgcgcgcctacgagagctacaagttcatccccgcgccttgaggcgcgcgtc      660
A S T G G A Y E S Y K F I P A L E A A V      220
aagcaggcctacgcgcgcaccgctcgccaccgcgcgcggaggtcaagtacactgtctttgag      720
K Q A Y A A T V A T A P E V K Y T V F E      240
accgcactgaaaaaggccatcacccgccatgtccgaagcacagaaggctgccaaagcccgcc      780
T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A      260
gccgctgccaccgcgcaccgcaaccgcgcgcgttggcgcggccaccggcgccgcgcaccgcgc      840
A A A T A T A T A A V G A A T G A A T A      280
gctactggtggctacaaagtc      861

A T G G Y K V

```

图 32 表示用 ClustalW 算法以 BLAST 搜索在 ExPaSy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>) 上进行的序列比对, 其中用表示于 SED ID NO. 5 中的 Phl p 5.0103 的氨基酸序列作为输入序列。该比对包括来自草物种类群 5 变态反应原的序列, 即 Phl p 5、Poa p 5、Lol p 5、Hol l 5、Pha a 5、Hor v 9 和 Hor v 5。在图 38 中, 与 Phl p 5.0103 蛋白质序列相同位置上氨基酸相同的氨基酸残基在灰色背景上用黑体突出。不相同的氨基酸以白色背景用黑色印刷。

表面结构图象

代表草花粉类群 5 变态反应原的氨基酸序列具有某些程度的相似性, 且一些分子表面保守 (灰色带), 参见图 39。图 39 表示当将 Phl p 5.0103 蛋白质序列迭加到 Phl p 5 分子结构模型上时, 从 4 个不同的角度观察的表面外形。该结构模型以两个半部包含该分子, 模型 A (氨基酸 34-142) 在图 39A 中表示, 且模型 B (氨基酸 149-259) 在图 39B 中表示

将高度溶剂暴露的氨基酸选来用于突变, 这些氨基酸在空间上 25-30 Å 范围的距离内分布在整个表面。在下面的部分中, 给出了下述信息: 认为适合用于突变的氨基酸列表 (A)、设计的突变的列表 (B) 和代表设计的突变的 DNA 序列 (C)。图 40A 和 B 分别表示作为例子的 1 号突变体模型 A 和模型 B 分子外形。灰色显示保守的氨基酸残基。黑色显示选来用于突变的氨基酸残基。

A. 选来用于突变的氨基酸列表

I45、R66、E133、R136、I137、D186、F188、K211、P214、Q222、P232、L243、Q254

B. 设计的突变的列表

突变体 1:

I45K, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 2:

R66N, E133S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 3:

I45K, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 4:

I45K, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 5:

I45K, E133S, D186H, Q222K, L243E, Q254K

突变体 6:

I45K, E133S, Q222K, P232G, L243E, Q254K

突变体 7:

I45K, E133S, F188I, P214G, L243E, Q254K

突变体 8:

I45K, E133S, F188I, K211N, L243E, Q254K

突变体 9:

R66N, R136S, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 10:

R66N, I137K, F188I, Q222K, L243E, Q254K

突变体 11:

I45K, E133S, D186H, P214G, L243E, Q254K

突变体 12:

I45K, E133S, D186H, K211N, L243E, Q254K

突变体 13:

I45K, E133S, P214G, P232G, L243E, Q254K

突变体 14:

I45K, E133S, K211N, P232G, L243E, Q254K

C. 突变体的核苷酸序列

突变体 1:

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

```

gccgatctcggttacggccccgccaccccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc      60
acccccgcgccccggccggagccgagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgagaagAAAaacgcccgttcaaggcggccttgccgctgccgcccggcgctccc      180
ccagcggacaaagtacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgccgcctccaacaaggccttc      240
gcccaggggcctctcggggcagcccaagggcgccgcgaatccagctccaaggccgcgctc      300
acctccaagctcgacgcccgcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360
gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcacatcatcgccggc      420
accctcgagggtccacgcccgtcaagcccgcggccgaggaggtcaagggtcatccccgcggc      480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcgccttcaagggtcgctgccaccgcccggccac      540
gccgccccgcgccaacgacaaagATTaccgtcttcgaggccgccttcaacgacgccatcaag      600
gcgagcacgggcccgcgctacgagagctacaagttcatccccgcctggaggccgcccgtc      660
aagAAAgcctacgcccaccgtcgccaccgcgcggaggtcaagtacactgtctttgag      720
accgcaGAAAAaaaggccatcacccgcatgtccgaagcaAAAAagggtgccagccccgc      780
gcccgtgccaccgccaccgcaaccgcgcggttgccgcggccaccggcgccgccaccgcc      840
gctactggtggctacaaaagtc      861

```

突变体 2:

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

```

gccgatctcggttacggccccgccaccccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc      60
acccccgcgccccggccggagccgagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag      120
ctgatcgagaagatcaacgcccgttcaaggcggccttgccgctgccgcccggcgctccc      180
ccagcggacaaagtacAACagttcgtcgcaaccttcggcgccgcctccaacaaggccttc      240
gcccaggggcctctcggggcagcccaagggcgccgcgaatccagctccaaggccgcgctc      300
acctccaagctcgacgcccgcctacaagctcgctacaagacagccgagggcgcgacgcct      360

```

gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc	420
accctcgaggtccacgcgcgtcaagcccgcgccgagggaggtcaaggatccccgcccgc	480
gagctgcaggtcatcgagaaggctgacgcgccttcaaggctcgctgccaccgcccgaac	540
gccgcccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgccttcaacgacgccatcaag	600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcgcgtc	660
aagAAAgcctacgcgcgccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag	720
accgcaGAAAAaaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAAagggtgccaaagcccgc	780
gcgctgccaccgcccaccgcaaccgcccgcgttggcgcgccaccggcgccgccaccgccc	840
gctactggtgggtacaaaagtc	861

突变体 3:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccggctacacccccgcc	60
acccccgcgcccccgccggagcggagccagcaggttaaggcgaacgacgaggagcagaag	120
ctgatcgagaagAAAAacgcgcgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgcgtccccg	180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgccgcctccaacaaggccttc	240
gcggaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcggaatccagctccaaggccgcgctc	300
acctccaagctcgacgcgcctacaagctcgccataagacagccgagggcgccgacgcct	360
gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctcAGCatcatcgccggc	420
accctcgaggtccacgcgcgtcaagcccgccgagggaggtcaaggatccccgcccgc	480
gagctgcaggtcatcgagaaggctgacgcgccttcaaggctcgctgccaccgcccgaac	540
gccgcccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgccttcaacgacgccatcaag	600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcgcgtc	660
aagAAAgcctacgcgcgccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag	720
accgcaGAAAAaaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAAagggtgccaaagcccgc	780
gcgctgccaccgcccaccgcaaccgcccgcgttggcgcgccaccggcgccgccaccgccc	840
gctactggtgggtacaaaagtc	861

突变体 4:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccggctacacccccgcc	60
acccccgcgcccccgccggagcggagccagcaggttaaggcgaacgacgaggagcagaag	120
ctgatcgagaagAAAAacgcgcgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgcgtccccg	180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgccgcctccaacaaggccttc	240
gcggaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcggaatccagctccaaggccgcgctc	300
acctccaagctcgacgcgcgcctacaagctcgccataagacagccgagggcgccgacgcct	360
gaggccaagtacgacgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcAAAatcgccggc	420
accctcgaggtccacgcgcgtcaagcccgccgagggaggtcaaggatccccgcccgc	480
gagctgcaggtcatcgagaaggctgacgcgccttcaaggctcgctgccaccgcccgaac	540
gccgcccccgccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgccttcaacgacgccatcaag	600
gcgagcacggggcgccctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcgcgtc	660
aagAAAgcctacgcgcgccaccgtcgccaccgcccggagggtcaagtacactgtctttgag	720
accgcaGAAAAaaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAAagggtgccaaagcccgc	780
gccgctgccaccgcccaccgcaaccgcccgcgttggcgcgccaccggcgccgccaccgccc	840
gctactggtgggtacaaaagtc	861

突变体 5:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccggctacacccccgcc	60
--	----

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

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
acccccgccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgacgacgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAacgcccgttcaaggcgcccttgccgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggacaagtagcaggaagttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaggccttc 240
gcccaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctc 300
acctccaagctcgacgcccgtacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgct 360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcccgtcaagcccggccgaggaggtcaagggtcatccccgccggc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcccgttcaagggtcgctgccaccgcccgaac 540
gccgccccgcccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgccatcaag 600
gcgagcacggcgccgctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcccgtc 660
aagcaggcctacgcccaccgctcgccaccgcccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagcccgcc 780
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcccgttgccgcccgaaccggcgccgccaccgcc 840
gctactgggtggctacaaagtc 861

```

突变体 9:

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

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
acccccgccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgacgacgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagatcaacgcccgttcaaggcgcccttgccgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggacaagtagAACacgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaggccttc 240
gcccaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctc 300
acctccaagctcgacgcccgtacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgct 360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctcAGCcatcatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcccgtcaagcccggccgaggaggtcaagggtcatccccgccggc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcccgttcaagggtcgctgccaccgcccgaac 540
gccgccccgcccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgccatcaag 600
gcgagcacggcgccgctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcccgtc 660
aagAAAgcctacgcccaccgctcgccaccgcccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagcccgcc 780
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcccgttgccgcccgaaccggcgccgccaccgcc 840
gctactgggtggctacaaagtc 861

```

突变体 10:

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

```

gccgatctcgggttacggccccgccacccagctgccccggccgcccgtacacccccgcc 60
acccccgccgccccggccggagcggagccagcaggttaaggcgacgacgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagatcaacgcccgttcaaggcgcccttgccgctgcccggcggtcccg 180
ccagcggacaagtagAACacgttcgtcgcaaccttcggcgccgctccaacaaggccttc 240
gcccaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgccaatccagctccaaggccgcgctc 300
acctccaagctcgacgcccgtacaagctcgccctacaagacagccgagggcgcgacgct 360
gaggccaagtagcagcgcctacgtcgccaccgtaagcgaggcgctccgcAAAatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcccgtcaagcccggccgaggaggtcaagggtcatccccgccggc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcccgttcaagggtcgctgccaccgcccgaac 540
gccgccccgcccaacgacaagATTaccgtcttcgaggccgcttcaacgacgccatcaag 600
gcgagcacggcgccgctacgagagctacaagttcatccccgccctggaggccgcccgtc 660
aagAAAgcctacgcccaccgctcgccaccgcccggaggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaggccatcacggccatgtccgaagcaAAAaaggctgccaagcccgcc 780

```

gccgctgccaccgcaaccgcaaccgcccgttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

突变体 11:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccgggtacaccccgcc 60
acccccgcgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgcccgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgcgtccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcccgaatccagctccaaggccgcgtc 300
acctccaagctcgacgcgcctacaagctcgcctacaagacagccgagggcgcgacgcct 360
gaggccaagtaacgacgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcgcgtcaagcccgcggccgaggaggtcaaggctcatccccgcggc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcgccttcaaggctcgtgccaccgcgcgccaac 540
gcccgcgcgcgccaacCATaagttcacgctcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
gcgagcacggcgggcgccctacgagagctacaagttcatcGGCgccttgaggccgcgctc 660
aagcaggcctacgcccaccgctcgccaccgcgcggagggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaggccatcacgcgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaa jcccgcc 780
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcgcggttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

突变体 12:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccgggtacaccccgcc 60
acccccgcgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgcccgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgcgtccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcccgaatccagctccaaggccgcgctc 300
acctccaagctcgacgcgcctacaagctcgcctacaagacagccgagggcgcgacgcct 360
gaggccaagtaacgacgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcgcgtcaagcccgcggccgaggaggtcaaggctcatccccgcggc 480
gagctgcaggtcatcgagaaggtcgacgcgccttcaaggctcgtgccaccgcgcgccaac 540
gcccgcgcgcgccaacCATaagttcacgctcttcgaggccgcttcaacgacgcatcaag 600
gcgagcacggcgggcgccctacgagagctacaAACTtcatccccgccttgaggccgcgctc 660
aagcaggcctacgcccaccgctcgccaccgcgcggagggtcaagtacactgtctttgag 720
accgcaGAAAAaaggccatcacgcgcatgtccgaagcaAAAaaggctgccaaagccgcc 780
gccgctgccaccgccaccgcaaccgcgcggttggcgcgccaccggcgccgccaccgcc 840
gctactggtggctacaaagtc 861

突变体 13:

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

gccgatctcggttacggccccgccacccagctgccccggcgccgggtacaccccgcc 60
acccccgcgccccggcgagcgagccagcaggttaaggcgacgaccgaggagcagaag 120
ctgatcgagaagAAAaacgcccgttcaaggcgcccttggccgctgccgcccgcgtccc 180
ccagcggacaagtaacaggacgttcgtcgcaaccttcggcgcgccctccaacaaggccttc 240
gcgaggggcctctcgggcgagcccaaggcgccgcccgaatccagctccaaggccgcgctc 300
acctccaagctcgacgcgcctacaagctcgcctacaagacagccgagggcgcgacgcct 360
gaggccaagtaacgacgcctacgtcgccaccgtaagcAGCgcgctccgcatcatcgccggc 420
acctcgagggtccacgcgcgtcaagcccgcggccgaggaggtcaaggctcatccccgcggc 480

方法:

来自变态反应患者的 PBL (外周血淋巴细胞) 被用于下面的研究。

为了维持 T-细胞所呈对的 bet v 1 同种型的多样性, 用具有天然纯化的 bet v 1 的 PBL 建立了 8 个 bet v 1 特异性 T 细胞系, 如以前发表的流程所述 (26)。

将 10 个 PBL 和 8 个 T-细胞系用桦木提取物 (Bet v)、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 种不同的突变体 (在别处所述): 2595、2628、2637、2744、2773 来刺激。随后发现 2637 突变体部分解折叠, 将不予讨论。

简单扼要地: 在一个具有 96 圆底孔的平板上每孔加入 2×10^5 的 PBL。以 4 份重复 (quadroplicates) 的 3 种不同的浓度加入不同的桦木样品并使其生长 6 天。在第 6 天, 将具有最高浓度的桦木的每孔半数体积 (100 μ l) 的细胞收获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, 在一个具有 96 圆底孔的平板上每孔加入 3×10^4 的 T-细胞, 并用自身辐射的 PBL (1×10^5 细胞/孔) 和 3 种不同浓度的不同桦木样品来刺激。1 天后, 将来自各孔具有最高浓度的桦木的细胞收获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。将闪烁液加入到滤器中并以如在 PBL 中描述的方法计数。

收集来自 4 等份 (quadroplicates) 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 培养物显示对桦木的特异性刺激。通常, 对不同桦木样品的 PBL 增殖相似, 尽管可看到变化。在 3 个 PBL 中, nBet v 1 比 rBet v 1 和突变体更好刺激增殖。突变体桦木样品几乎与 rBet v 1 一样刺激了 PBL (图 41)。图 41 表示上述 Bet v 1 制备物的刺激指数。刺激指数 (SI) 是刺激的样品的增殖 (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 (*mucobacterium tuberculosis*) 的纯化的蛋白质衍生物, 它充当正对照。

细胞因子的生产是由 IFN-gamma 控制的且随 PBL 增殖按比例增加。Th1/Th2 替换的信号不明显 (图 42-44)。图 42 表示具有 Th0 状况的患者, 图 43 表示 Th1 状况且图 44 表示 Th2 状况。细胞因子生产用显示为条形图的 pg/ml 测量的且 IL-5/IFN-gamma 之间的比率是较下面的虚线 (Y-轴右边)。用 cpm 测量的增殖在 Y-轴右边表示为实线。培养基 (medium) 和 MBP (麦芽糖结合蛋白质) 作为背景对照而包括。

8 个 T-细胞系建立在 nBet v 1 上, 且除一个之外, 其余的全部对所有桦木样品同样好地增殖。4 个 T-细胞系基于 IL-5 和 IFN-gamma 的比率 ($\text{Th2} > 5$ 、 $5 > \text{Th0} > 0.2$ 、 $0.2 > \text{Th1}$) 而分泌 Th0 样的细胞因子。3 个 T-细胞系分泌 Th1 的细胞因子且 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。这些数据暗示对于 T-细胞的刺激, Bet v 1 的同种型或这 4 个突变体可替换在天然变态反应原制备物中发现的单独的同种型的混合物。因而, 基于重组变态反应原或这 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 10

用重组和突变体 Bet v 1 蛋白质在免疫接种后诱导 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，它能够结合到抗原并阻止人 IgE 抗体对该抗原的结合。

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在小鼠中的免疫接种实验中检验。

通过用重组 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。将不同的蛋白质缀合到 1.25 mg/ml 的铝胶上（氢氧化铝凝胶，1.3% pH 8.0-8.4, Superfos Biosector）。该小鼠用或者 1 µg 的蛋白质/剂量或者 10 µg 的蛋白质/剂量来免疫接种。血液样品在第 0、14、35、49 和 63 天从眶放血（orbital bleed）获取。

特异性 IgG 抗体水平用 rBet v 1 包被的微量滴定板和生物素化的兔抗小鼠 IgG 抗体（Jackson）作为探测抗体通过直接的 ELISA 来分析。用重组 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 野生型蛋白质具有高度交叉反应性的抗体。

为了估计阻断抗体的诱导，将来自桦木变态反应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的小鼠（对照）或上述免疫接种的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，将珠子洗涤，其结合的生物素化的 **rBet v 1** 用丫啶（**acridinium**）标记的链酶抗生物素来探测。珠子和来自未免疫接种的小鼠的血清的温育没有改变 **rBet v 1** 与珠子的结合。相反的，珠子与来自用重组 **Bet v 1 227** 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。因而，在第 63 天，来自所有高剂量（10 µg/剂量）免疫接种组的一种或多种血清样品能够减少超过 80% 的 **Bet v 1** 与珠子的结合。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。

参考文献:

1. WO 97/30150 (Pangenetics B.V., 诱导免疫学耐受的分子)
2. WO 92/02621 (Biomay Biotechnik Produktions- und Handelsgesellschaft mbH, 桤木花粉变态反应原及其应用)
3. WO 90/11293 (Immunologic Pharmaceutical Corporation, The University of North Carolina at Chapel Hill, 来自豚草的变态反应蛋白质及其用途)
4. Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A, Okudaira H, Okumura Y: “用于变态反应原特异性免疫治疗的主要屋尘螨变态反应原 Der f 2 工程”。自然生物技术学 (Nat Biotechnol) 15, 754-758 (1997)。
5. Smith AM, Chapman MD: “用目标对于预测的表面残基的寡核苷酸定向的诱变将抗原性位点在 Der p 2 上的定位”。临床实验变态反应 (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: “一个来自屋尘螨 *Dermatophagoides farinae* 的新的 39-kD 变态反应原分子上 IgE 抗原决定部位的结构”。变态反应和免疫学国际档案 (Int Arch Allergy Immunol) 103, 357-364 (1994)。
7. Förster E, Dudler T, Gmachl M, Aberer W, Urbanek R, Suter M: “天然的和重组酶活性或无酶活性的蜜蜂毒液磷脂酶 A2 与膜翅目昆虫变态反应原具有相同的从患者嗜碱性粒细胞释放组胺的潜能”。变态反应和临床免疫学杂志 (J Allergy Clin Immunol) 95, 1229-1235 (1995)。
8. Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA: “Ara h 1 上 IgE-结合抗原决定部位的作图和突变分析, 一种豆科的豌豆球蛋白蛋白质和一种花生过敏性中的主要变态反应原”。欧洲生物化学杂志 (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: “主要花生变态反应原 Ara h 2 的免疫主要 IgE 结合抗原决定部位的确定和突变分析”。生物化学和生物物理学档案 (Arch Biochem Biophys) 342, 244-253 (1997)。

10. Ferreira F, Rohlf s A, Hoffmann-Sommergruber k, Schenk S, Ebner C, Briza P, Jilek A, Kraft D, Breitenbach M, Scherner O: “通过定点突变对树木花粉变态反应原 IgE 结合性质的调制”。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, “通过定点突变对变态反应原 IgE 反应性的调制: 免疫治疗的 hypeallergenic 变体的潜在用途”, FASEB 实验生物学杂志 (FASEB Journal for Experimental Biology) Vol. 12, No. 2, 1998 年 2 月, 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: “由单克隆抗体限定的连续桦木抑制蛋白抗原决定部位的分子和结构分析”。生物化学杂志 (J Biol Chem) 271, 29915-29921 (1996)。

13. Alvarez AM, Fukuhara E, Nakase M, Adachi T, Aoki N, Nakamura R, Matsuda T: “属于编码潜在的水稻变态反应原的 alpha-淀粉酶/胰蛋白酶抑制基因家族的 4 个水稻种子 cDNA 克隆”。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, 免疫学杂志 (Journal of Immunology)

Vol. 160, No. 6, 1998 年 3 月 15 日, 2780-2785.

15. Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, Aasmul-Olsen S, Larsen MR, Mørtz E, Roepstorff P, Larsen JN: “具有真实 N-末端且与麦芽糖结合蛋白质融合克隆的纯化的的重组 *Bet v 1* 的特征化”。*Prot Exp Purification* 8, 365-373 (1996a)。

16. Ipsen h, Wihl J-Å, Petersen BN, Løwenstein H: “对树木花粉主要变态反应原 *Aln g I*、*Bet v I* 和 *Cor a I* 的患者 IgE 反应的特征作图”。*临床实验变态反应 (Clin. Exp. Allergy)* 22, 391-9, (1992)

17. Gajhede M, Osmark p, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Løw(e)nstein H 和 Spangfort MD: “*Bet v 1* 的 X-射线和 NMR 结构, 桦木花粉变态反应的起源”。*自然结构生物学 (Nature structural biology)* 3, 1040-1045 (1996)。

18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW 和 Lipman DJ: “基本的局部比对搜索工具”。*分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)* 215, 403-410 (1990)。

19. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG 和 Gibson TJ: “CLUSTAL W: 通过序列权衡、位置特异性缺口惩罚和权衡矩阵选择改善渐进性的多重序列比对的灵敏度”。*核酸研究 (Nucleic Acids Res.)* 22, 4673-4680 (1994)。

20. Saiki RK, Gelfand Dh, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: “用热稳定性 DNA 聚合酶的引物指导的 DNA 酶促扩增”。*科学 (Science)* 239, 487-491 (1988)。

21. Spangfort MD, larsen JN, Gajhede M: “在 2.0 Å 的分辨率对 *Bet v 1* 的结晶和初步 X-射线研究, 即一种导致 IgE 介导的变态反应的桦木花粉蛋白质”。*PROTEINS, Struc Func Genet* 26, 358-360 (1996b)。

22. Monsalve RI, Lu G 和 King TP: “通过在细菌或酵母中表达的重组毒液变态反应原, 小黄蜂 (*Vespula Vulgaris*) 和纸黄蜂 (*Polistes annularis*) 的抗原 5” (1999) 已投递。

23. Fang KSF, Vitale M, Fehlner P 和 King TP: “白脸大黄蜂毒液变态反应原抗原 5 的 cDNA 克隆和一级结构”。美国国家科学院进展 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85, 895 (1988)。

24. Lu G, Villalba M, Coscia MR, Hoffman DR 和 King TP: “来自大黄蜂、黄蜂和小黄蜂的毒液变态反应原抗原 5 的序列分析和抗原交叉反应性”免疫学杂志 (Journal of Immunology) 150, 2823-2830 (1993)。

25. Punnonen J: “变态反应疫苗和抗变态反应细胞因子的分子培育 (Molecular breeding)”。变态反应和免疫学国际档案 (Int Arch Allergy Immunol) 2000; 121: 173-182。

26. P.A. Würtzen, M. Wissenbach, H. Ipsen, A. Bufe, J. Arnved 和 R. J. J. van Neerven. 变态反应临床免疫学杂志 (*J Allergy Clin Immunol*), 1999; 104: 115-23。

27. Sparholt SH, Larsen JN, Ipsen H, Schou C, van Neerven RJ. 临床实验变态反应 (*Clin. Exp. Allergy*) 1997 年 8 月; 27 (8): 932-41。

序列表

<110> ALK-ABELL?A/S

<120> 新型变态反应原突变体

<130> P199901213 WO

<140> PCT/DK01/00764

<141> 2001-11-16

<150> DK PA 2000 01718

<151> 2000-11-16

<150> US 60/298,170

<151> 2001-06-14

<150> US 60/249,361

<151> 2000-11-16

<160> 90

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 160

<212> PRT

<213> 白桦

<220>

<221> 突变体

<222> (28)..(28)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (32)..(32)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (78)..(78)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (145)..(145)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (156)..(156)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (160)..(160)
<223>

<400> 1

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

100	105	110
Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val		
115	120	125
Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu		
130	135	140
Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn		
145	150	155 160

<210> 2
<211> 159
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (5)..(5)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (42)..(42)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (78)..(78)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (123)..(123)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (134)..(134)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (156)..(156)

<223>

<400> 2

Gly	Val	Phe	Asn	Val	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Val	Ile	Pro	Ala	Ala
1			5					10					15		

Arg	Leu	Phe	Lys	Ala	Phe	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe	Pro	Lys
		20					25					30			

Val	Ala	Pro	Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	Ser	Asn	Ile	Ser	Gly	Asn	Gly
	35					40					45				

Gly	Pro	Gly	Thr	Ile	Lys	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Pro	Phe
	50				55					60					

Lys	Tyr	Val	Lys	Asp	Arg	Val	Asp	Glu	Val	Asp	His	Thr	Lys	Phe	Lys
65				70				75					80		

Tyr	Asn	Tyr	Ser	Val	Ile	Glu	Gly	Gly	Pro	Ile	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu
			85					90					95		

Lys	Ile	Ser	Asn	Glu	Ile	Val	Ile	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Gly	Gly	Ser
		100					105						110		

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 3
<211> 159
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (28)..(28)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (32)..(32)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108)..(108)
<223>

<400> 3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 4
<211> 159
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (5)..(5)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45)..(45)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (65)..(65)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (97)..(97)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (134)..(134)
 <223>

<400> 4

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
 20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

Ser Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
 100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 5
<211> 159
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (16)..(16)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (28)..(28)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (32)..(32)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108)..(108)
<223>

<220>

<221> 突变体
 <222> (152)..(152)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (153)..(153)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (155)..(155)
 <223>

<400> 5

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
 20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
 100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
 115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 6
<211> 160
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (28)..(28)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (32)..(32)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (78)..(78)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108)..(108)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (145)..(145)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (156)..(156)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (160)..(160)
 <223>

<400> 6

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
 20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
 100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
 115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu

130	135	140
Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn		
145	150	155 160
<210> 7		
<211> 160		
<212> PRT		
<213> 白桦		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (5)..(5)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (134)..(134)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (28)..(28)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (32)..(32)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (45)..(45)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (65)..(65)		
<223>		
<220>		

<221> 突变体
<222> (78)..(78)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (97)..(97)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108)..(108)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (145)..(145)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (156)..(156)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (160)..(160)
<223>

<400> 7

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Ser Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
145 150 155 160

<210> 8
<211> 160
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (5)..(5)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (123)..(123)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (156)..(156)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (160)..(160)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (134)..(134)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (42)..(42)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (78)..(78)
<223>

<400> 8

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
145 150 155 160

<210> 9

<211> 159

<212> PRT

<213> 白桦

<220>

<221> 突变体

<222> (28)..(28)

<223>

<220>

<221> 突变体
<222> (32).. (32)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (65).. (65)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (96).. (96)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (97).. (97)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108).. (108)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (109).. (109)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (125).. (125)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (127).. (127)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (145)..(145)
<223>

<400> 9

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Ser Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Gly Asn Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Tyr His Ser Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Glu Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 10
<211> 160
<212> PRT

<213> 白桦

<220>

<221> 突变体

<222> (5).. (5)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (28).. (28)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (32).. (32)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (42).. (42)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (45).. (45)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (78).. (78)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (103).. (103)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (108).. (108)

<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (123)..(123)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (134)..(134)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (156)..(156)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (160)..(160)
 <223>

<400> 10

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
 20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
145 150 155 160

<210> 11
<211> 160
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (5)..(5)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (42)..(42)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (65)..(65)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (78)..(78)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (97)..(97)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103)..(103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (123)..(123)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (134)..(134)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (156)..(156)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (160)..(160)
<223>

<400> 11

Gly	Val	Phe	Asn	Val	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Val	Ile	Pro	Ala	Ala
1				5					10					15	

Arg	Leu	Phe	Lys	Ala	Phe	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe	Pro	Lys
			20					25					30		

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
50 55 60

Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
145 150 155 160

<210> 12
<211> 160
<212> PRT
<213> 白桦

<220>
<221> 突变体
<222> (5)..(5)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (28)..(28)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (32).. (32)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (42).. (42)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (45).. (45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (65).. (65)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (78).. (78)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (97).. (97)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (103).. (103)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (108).. (108)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (123)..(123)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (134)..(134)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (156)..(156)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (160)..(160)
 <223>

<400> 12

Gly Val Phe Asn Val Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Thr Leu Phe Pro Gln
 20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Ser Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

Asn Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Lys Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

Ser Ile Ser Asn Glu Ile Val Ile Val Ala Thr Gly Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Ile Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Val Glu Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser His Ala Tyr Asn Asn
145 150 155 160

<210> 13
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (466)..(468)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (481)..(483)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (508)..(510)

<223>

<400> 13

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

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

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

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

tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile	
65 70 75 80	

gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	

gtt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt	336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	
100 105 110	

atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125

gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160

gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175

tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190

gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205

gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 14
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 14

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 15
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (466)..(468)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (481)..(483)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (499)..(501)
<223>

<400> 15

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu 1 5 10 15	48
cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly 20 25 30	96
tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu 35 40 45	144
gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp 50 55 60	192
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile 65 70 75 80	240
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr 85 90 95	288
gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly 100 105 110	336
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg 115 120 125	384
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile 130 135 140	432
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln 145 150 155 160	480
cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly 165 170 175	528
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp 180 185 190	576
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc	624

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 16
<211> 222
<212> PRT
<213> 屋尘螨

<400> 16

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 17
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (58)..(60)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (295)..(297)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (466)..(468)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (481)..(483)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (499)..(501)
 <223>

<400> 17
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg gaa act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att 240
 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
 65 70 75 80
 gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr

<210>	18
<211>	222
<212>	PRT
<213>	屋尘螨

Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 19
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (58)..(60)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (466)..(468)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (481)..(483)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (499).. (501)

<223>

<400> 19

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

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

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

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

tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att 240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
65 70 75 80

gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt 336
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa 480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 20

<211> 222

<212> PRT

<213> 屋尘螨

<400> 20

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg

115	120	125
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile		
130	135	140
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln		
145	150	155 160
Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly		
165	170	175
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp		
180	185	190
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile		
195	200	205
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu		
210	215	220

<210> 21
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (199)..(201)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (295)..(297)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (466)..(468)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (481)..(483)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (499)..(501)
 <223>

<400> 21
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca tlg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60
 tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att 240

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt 336
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
 100 105 110
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 22
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 22

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 23
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (58)..(60)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (199)..(201)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (466)..(468)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (481)..(483)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (499)..(501)

<223>

<400> 23

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

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

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

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

tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att	240
Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile	
65 70 75 80	

gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	

gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt	336
Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	
100 105 110	

atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt	384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg	
115 120 125	

gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc	432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile	
130 135 140	

aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa	480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln	
145 150 155 160	

gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175

tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190

gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205

gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 24
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 24

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Glu Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
 65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95

Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 25

<211> 666

<212> DNA

<213> 屋尘螨

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(666)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (58)..(60)

<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (148)..(150)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (199)..(201)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (295)..(297)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (466)..(468)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (481)..(483)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (499)..(501)
 <223>

<400> 25
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg cag act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45

gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp 50 55 60	192
tgt gct aac caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile 65 70 75 80	240
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr 85 90 95	288
gtt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly 100 105 110	336
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg 115 120 125	384
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile 130 135 140	432
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln 145 150 155 160	480
gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly 165 170 175	528
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp 180 185 190	576
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile 195 200 205	624
gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu 210 215 220	666

<210> 26
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 26

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Gln Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Asn Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 27
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (37)..(39)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (325)..(327)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (382)..(384)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (466)..(468)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (481)..(483)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (499)..(501)
 <223>

<400> 27
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60

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

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 29
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (37)..(39)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (325).. (327)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (382).. (384)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (466).. (468)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (481).. (483)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (499).. (501)
<223>

<400> 29
act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg 48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
1 5 10 15

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

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

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

tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cag ggt att 240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Gln Gly Ile
65 70 75 80

gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac 288
 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 85 90 95
 gtt gca gaa gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt 336
 Val Ala Glu Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly
 100 105 110
 atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cag 384
 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Gln
 115 120 125
 gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc gaa aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Glu Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cag gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Gln Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc 666
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 30
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 30

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

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

<210> 31
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (37)..(39)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (325)..(327)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382).. (384)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (466).. (468)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (481).. (483)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (499).. (501)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (574).. (576)

<223>

<400> 31

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

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

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

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

tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca gaa ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile	

65	70	75	80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac				288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr				
85 90 95				
ggt gca cag gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca gat cgt ttc ggt				336
Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly				
100 105 110				
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att gaa				384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu				
115 120 125				
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc				432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile				
130 135 140				
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cag aca atc att caa				480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln				
145 150 155 160				
gaa gat aat ggt tac caa acc aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt				528
Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly				
165 170 175				
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt ttt				576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe				
180 185 190				
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc				624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile				
195 200 205				
gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc				666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu				
210 215 220				

<210> 32

<211> 222

<212> PRT

<213> 屋尘螨

<400> 32

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Glu Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Gln Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Asp Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Glu
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Gln Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Glu Asp Asn Gly Tyr Gln Thr Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Phe
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 33
<211> 666
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (37)..(39)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (148)..(150)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (232)..(234)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (295)..(297)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (325)..(327)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (382)..(384)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (466)..(468)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (481)..(483)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (499)..(501)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (574)..(576)
 <223>

<400> 33
 act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct agc atc gat ttg 48
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Ser Ile Asp Leu
 1 5 10 15
 cga caa atg cga act gtc act acc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt 96
 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Thr Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
 20 25 30
 tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg 144
 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
 35 40 45
 gct gtg cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat 192
 Ala Val Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
 50 55 60

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

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 35
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (88)..(90)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (142)..(144)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (184)..(186)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (229)..(231)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (244)..(246)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (298)..(300)
<223>

<400> 35
gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
115 120 125

gat
Asp

387

<210> 36
<211> 129
<212> PRT
<213> 屋尘螨

<400> 36

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
115 120 125

Asp

<210> 37

<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (88)..(90)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (142)..(144)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (184)..(186)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (229)..(231)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (244)..(246)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<400> 37

gat	caa	gtc	gat	gtc	aaa	gat	tgt	gcc	aat	cat	gaa	atc	aaa	gaa	gtt	48
Asp	Gln	Val	Asp	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	
1			5					10						15		

ttg	gta	cca	gga	tgc	cat	ggt	aac	gaa	cca	tgt	atc	att	ggc	cgt	ggt	96
Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Asn	Glu	Pro	Cys	Ile	Ile	Gly	Arg	Gly	
			20					25						30		

aaa	cca	ttc	caa	ttg	gaa	gct	tta	ttc	gaa	gcc	aat	caa	aac	tca	gcg	144
Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Ser	Ala	
			35					40						45		

aca	gct	aaa	att	gaa	atc	aaa	gct	tca	atc	gat	ggt	tta	agc	gtt	gat	192
Thr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Val	Asp	
			50					55						60		

gtt	c�c	ggt	atc	gat	cca	aat	gca	tgc	cat	tat	atg	aac	tgt	cca	ttg	240
Val	Pro	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Cys	His	Tyr	Met	Asn	Cys	Pro	Leu	
65							70					75			80	

gtt	aac	gga	caa	caa	tat	gat	att	aaa	tat	aca	tgg	aat	gtt	cca	aaa	288
Val	Asn	Gly	Gln	Gln	Tyr	Asp	Ile	Lys	Tyr	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Lys	
							85					90			95	

att	gca	cca	aaa	tct	gaa	aat	gtt	gtc	gtc	act	gtt	aaa	gtt	ttg	ggt	336
Ile	Ala	Pro	Lys	Ser	Glu	Asn	Val	Val	Val	Thr	Val	Lys	Val	Leu	Gly	
							100							105		110

gat	aat	ggt	gtt	ttg	gcc	tgt	gct	att	gct	act	cat	gct	aaa	atc	cag	384
Asp	Asn	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Ala	Ile	Ala	Thr	His	Ala	Lys	Ile	Gln	
							115					120			125	

gat																387
Asp																

<210> 38

<211> 129

<212> PRT

<213> 屋尘螨

<400> 38

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 39

<211> 387

<212> DNA

<213> 屋尘螨

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (43)..(45)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (70)..(72)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (88)..(90)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (142)..(144)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (229)..(231)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (244)..(246)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (298)..(300)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<400> 39
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15
 ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30
 aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45
 aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60
 gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80
 gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95
 att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110
 gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125
 gat 387
 Asp

<210> 40
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 40

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 41
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (70)..(72)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (88)..(90)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (184)..(186)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (229)..(231)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (244)..(246)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (298)..(300)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (382)..(384)
 <223>

<400> 41
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt	96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly	
20 25 30	
aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca aaa	144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys	
35 40 45	
aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat	192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp	
50 55 60	
gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg	240
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu	
65 70 75 80	
gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa	288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys	
85 90 95	
att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt	336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly	
100 105 110	
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag	384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln	
115 120 125	
gat	387
Asp	

<210> 42
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 42

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys

35	40	45
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp		
50	55	60
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu		
65	70	75 80
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys		
	85	90 95
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly		
100	105	110
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln		
115	120	125

Asp

<210> 43
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (88)..(90)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (142)..(144)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (184)..(186)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (229)..(231)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (244)..(246)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (298)..(300)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (382)..(384)
 <223>

<400> 43
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15
 ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att ggc cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30
 aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tat atg aac tgt cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 44
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 44

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
 20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

Asp

<210> 45
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (88)..(90)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (184)..(186)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (229)..(231)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (244)..(246)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (298)..(300)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (142)..(144)

<223>

<400> 45

gat	caa	gtc	gat	gtc	aaa	gat	tgt	gcc	aat	cat	gaa	atc	aaa	aaa	gtt	48
Asp	Gln	Val	Asp	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	
1			5					10					15			

ttg	gta	cca	gga	tgc	cat	ggg	aac	gaa	cca	tgt	atc	att	ggc	cgt	ggg	96
Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Asn	Glu	Pro	Cys	Ile	Ile	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30			

aaa	cca	ttc	caa	ttg	gaa	gct	tta	ttc	gaa	gcc	aat	caa	aac	tca	gcg	144
Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Ser	Ala	
			35					40					45			

aca	gct	aaa	att	gaa	atc	aaa	gct	tca	atc	gat	ggg	tta	agc	gtt	gat	192
Thr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Ser	Val	Asp	
			50					55				60				

gtt	ccc	ggg	atc	gat	cca	aat	gca	tgc	cat	tat	atg	aac	tgt	cca	ttg	240
Val	Pro	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Cys	His	Tyr	Met	Asn	Cys	Pro	Leu	

65	70	75	80	
ggt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa				288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys				
	85	90	95	
att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt				336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly				
	100	105	110	
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag				384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln				
	115	120	125	
gat				387
Asp				

<210> 46
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 46

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Asn Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 47
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (91)..(93)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (142)..(144)
<223>

<220>

<221> 突变体
 <222> (184)..(186)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (220)..(222)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (244)..(246)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (298)..(300)
 <223>

<400> 47
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15
 ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30
 aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45
 aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60
 gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80
 gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95
 att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 48
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 48

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

Asp

<210> 49
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (91)..(93)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (142)..(144)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (184)..(186)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (220)..(220)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (244)..(246)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (382)..(384)
<223>

<400> 49
gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

att gca cca aaa tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

gat
Asp

387

<210> 50
<211> 129
<212> PRT
<213> 屋尘螨

<400> 50

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 51

<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (91)..(93)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (142)..(144)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (220)..(222)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (244)..(246)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (298)..(300)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<400> 51

gat	caa	gtc	gat	gtc	aaa	gat	tgt	gcc	aat	cat	gaa	atc	aaa	gaa	gtt	48
Asp	Gln	Val	Asp	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	
1			5					10					15			

ttg	gta	cca	gga	tgc	cat	ggt	aac	gaa	cca	tgt	atc	att	cat	agc	ggt	96
Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Asn	Glu	Pro	Cys	Ile	Ile	His	Ser	Gly	
			20				25						30			

aaa	cca	ttc	caa	ttg	gaa	gct	tta	ttc	gaa	gcc	aat	caa	aac	tca	gcg	144
Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Ser	Ala	
			35				40					45				

aca	gct	aaa	att	gaa	atc	aaa	gct	tca	atc	gat	ggt	tta	gaa	gtt	gat	192
Thr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	
			50				55					60				

gtt	ccc	ggt	atc	gat	cca	aat	gca	tgc	aac	tat	atg	aaa	tgt	cca	ttg	240
Val	Pro	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Cys	Asn	Tyr	Met	Lys	Cys	Pro	Leu	
65					70					75				80		

gtt	aac	gga	caa	caa	tat	gat	att	aaa	tat	aca	tgg	aat	gtt	cca	aaa	288
Val	Asn	Gly	Gln	Gln	Tyr	Asp	Ile	Lys	Tyr	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Lys	
			85						90				95			

att	gca	cca	aac	tct	gaa	aat	gtt	gtc	gtc	act	gtt	aaa	gtt	ttg	ggt	336
Ile	Ala	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Val	Val	Thr	Val	Lys	Val	Leu	Gly	
			100					105					110			

gat	aat	ggt	gtt	ttg	gcc	tgt	gct	att	gct	act	cat	gct	aaa	atc	cag	384
Asp	Asn	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Ala	Ile	Ala	Thr	His	Ala	Lys	Ile	Gln	
			115				120					125				

gat																387
Asp																

<210> 52

<211> 129

<212> PRT
<213> 屋尘螨

<400> 52

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 53
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (43)..(45)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (70)..(72)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (91)..(93)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (220)..(222)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (244)..(246)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (298)..(300)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (184)..(186)

<223>

<400> 53

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 54

<211> 129

<212> PRT

<213> 屋尘螨

<400> 54

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 55
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (43)..(45)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (91)..(93)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (142)..(144)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (184)..(186)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (220)..(222)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (244)..(246)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (298)..(300)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (382)..(384)
 <223>

<400> 55
 gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa gaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att cat agc ggt	96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly	
20 25 30	
aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg	144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala	
35 40 45	
aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat	192
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp	
50 55 60	
gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg	240
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu	
65 70 75 80	
gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa	288
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys	
85 90 95	
att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt	336
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly	
100 105 110	
gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag	384
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln	
115 120 125	
gat	387
Asp	

<210> 56
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 56

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Glu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala

35	40	45
Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp		
50	55	60
Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu		
65	70	75 80
Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys		
	85	90 95
Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly		
	100 105	110
Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln		
	115 120	125

Asp

<210> 57
<211> 387
<212> DNA
<213> 屋尘螨

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (70)..(72)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (91)..(91)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (142)..(144)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (184)..(186)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (220)..(222)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (244)..(246)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (298)..(300)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (382)..(384)

<223>

<400> 57

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa aaa gtt	48
Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val	
1 5 10 15	

ttg gta cca gga tgc cat ggt aac gaa cca tgt atc att cat agc ggt	96
Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly	
20 25 30	

aaa cca ttc caa ttg gaa gct tta ttc gaa gcc aat caa aac tca gcg	144
Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala	
35 40 45	

aca gct aaa att gaa atc aaa gct tca atc gat ggt tta agc gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc aac tat atg aaa tgt cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aac gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt cca aaa 288
 Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aac tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt ttg ggt 336
 Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
 100 105 110

gat aat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cag 384
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 58
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 58

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Asn Glu Pro Cys Ile Ile His Ser Gly
 20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Leu Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Ala
 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Ser Val Asp
 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys Asn Tyr Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Asn Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

Ile Ala Pro Asn Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Leu Gly
100 105 110

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Gln
115 120 125

Asp

<210> 59
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (562)..(564)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (664)..(666)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (728)..(730)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760)..(762)

<223>

<400> 59

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc	48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
1 5 10 15	

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt	96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly	
20 25 30	

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc	144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly	
35 40 45	

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag	192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys	
50 55 60	

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc	240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe	
65 70 75 80	

gcg gag ggc ctc teg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc	288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser	
85 90 95	

aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac	336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr	
100 105 110	

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc	384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val	

115	120	125	
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130	135	140	432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145	150	155	480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165	170	175	528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu 180	185	190	576
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195	200	205	624
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr 210	215	220	672
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu 225	230	235	720
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala 245	250	255	768
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly 260	265	270	816
gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val 275	280	285	861

<210> 60

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 60

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 61
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (196)..(198)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (562)..(564)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (664)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (727)..(729)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (760)..(762)
<223>

<400> 61
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60
tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr

100	105	110	
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val 115 120 125			384
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130 135 140			432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145 150 155 160			480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165 170 175			528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu 180 185 190			576
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195 200 205			624
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr 210 215 220			672
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu 225 230 235 240			720
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala 245 250 255			768
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly 260 265 270			816
gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val 275 280 285			861

<210> 62

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 62

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 63
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (406)..(408)
<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (562)..(564)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (664)..(666)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (726)..(728)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (760)..(762)
 <223>

<400> 63
 gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30
 aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45
 ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60
 tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser

85	90	95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr 100 105 110			336
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val 115 120 125			384
gcc acc gta agc gag gcg ctc agc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130 135 140			432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145 150 155 160			480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165 170 175			528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu 180 185 190			576
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc gcc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195 200 205			624
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr 210 215 220			672
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu 225 230 235 240			720
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala 245 250 255			768
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly 260 265 270			816
gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val 275 280 285			861

<210> 64
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 64

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 65

<211> 861

<212> DNA

<213> 梯牧草

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(861)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (133)..(135)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (409)..(411)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (562)..(564)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (664)..(666)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (726)..(728)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760)..(762)

<223>

<400> 65

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc	48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
1 5 10 15	

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt	96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly	
20 25 30	

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc	144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly	
35 40 45	

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag	192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys	
50 55 60	

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc	240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe	

65	70	75	80	
gcg gag ggc ctc tgc ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc				288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser				
85		90	95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac				336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr				
100	105		110	
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc				384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val				
115	120		125	
gcc acc gta agc gag gcg ctc cgc aaa atc gcc ggc acc ctc gag gtc				432
Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val				
130	135		140	
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc				480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly				
145	150	155	160	
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc				528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala				
165	170		175	
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag				576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu				
180	185		190	
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag				624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu				
195	200		205	
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac				672
Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr				
210	215		220	
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag				720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu				
225	230	235	240	
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct				768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala				
245	250		255	
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc				816
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly				
260	265		270	

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 66
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 66

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 67
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体

<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (559)..(561)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (664)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (726)..(728)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (760)..(762)
<223>

<400> 67
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys

50	55	60	
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc			240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe			
65	70	75	80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc			288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser			
85	90	95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac			336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr			
100	105	110	
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc			384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val			
115	120	125	
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc			432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val			
130	135	140	
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc			480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly			
145	150	155	160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc			528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala			
165	170	175	
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag			576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu			
180	185	190	
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag			624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu			
195	200	205	
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac			672
Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr			
210	215	220	
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag			720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu			
225	230	235	240
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct			768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala			
245	250	255	

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 68
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 68

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 69

<211> 861

<212> DNA

<213> 梯牧草

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(861)

<223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (133)..(135)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (397)..(399)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (664)..(666)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (694)..(696)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (726)..(728)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (760)..(762)
 <223>

<400> 69
 gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30
 aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly

35	40	45	
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag			192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys			
50	55	60	
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc			240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe			
65	70	75	80
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc			288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser			
85	90	95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac			336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr			
100	105	110	
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc			384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val			
115	120	125	
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc			432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val			
130	135	140	
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc			480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly			
145	150	155	160
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc			528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala			
165	170	175	
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag			576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu			
180	185	190	
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag			624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu			
195	200	205	
agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac			672
Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr			
210	215	220	
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ggc gag gtc aag tac act gtc ttt gag			720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu			
225	230	235	240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 70

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 70

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 71

<211> 861

<212> DNA

<213> 梯牧草

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(861)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (133)..(135)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (397)..(399)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (562)..(564)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (640)..(642)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (726)..(728)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (760)..(762)
 <223>

<400>	71	
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc	48	
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly		
1 5 10 15		
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt	96	
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly		

20	25	30	
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly 35 40 45			144
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys 50 55 60			192
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe 65 70 75 80			240
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser 85 90 95			288
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr 100 105 110			336
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val 115 120 125			384
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130 135 140			432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145 150 155 160			480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165 170 175			528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu 180 185 190			576
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195 200 205			624
agc tac aag ttc atc ggc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr 210 215 220			672

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 72

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 72

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 73

<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (562)..(564)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (631)..(633)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (730)..(732)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (760)..(762)
<223>

<400> 73
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

48

1	5	10	15	
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc cgc gcc gga gcg gag cca gca ggt				96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly				
20	25	30		
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc				144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly				
35	40	45		
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag				192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys				
50	55	60		
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc				240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe				
65	70	75	80	
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc				288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser				
85	90	95		
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac				336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr				
100	105	110		
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc				384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val				
115	120	125		
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc				432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val				
130	135	140		
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc				480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly				
145	150	155	160	
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc				528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala				
165	170	175		
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag				576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu				
180	185	190		
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag				624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu				
195	200	205		

agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 74
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 74

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val

275	280	285
<210> 75		
<211> 861		
<212> DNA		
<213> 梯牧草		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(861)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (196)..(198)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (406)..(408)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (562)..(564)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (664)..(666)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (730)..(732)		
<223>		
<220>		
<221> 突变体		
<222> (760)..(762)		
<223>		

```

<400> 75
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1          5          10          15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
          20          25          30

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
          35          40          45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
          50          55          60

tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240
Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65          70          75          80

gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
          85          90          95

aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
          100          105          110

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
          115          120          125

gcc acc gta agc gag gcg ctc agc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
          130          135          140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc      480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145          150          155          160

gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc      528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
          165          170          175

acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag      576
Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
          180          185          190

```

gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 76

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 76

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly

260	265	270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr	Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val	
275	280	285

<210> 77
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (196)..(198)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (409)..(411)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (562)..(564)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (664)..(666)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (730)..(732)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760).. (762)

<223>

<400> 77

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag atc aac gcc ggc 144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

tac aac acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

gcc acc gta agc gag gcg ctc cgc aaa atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag att acc gtc ttc gag 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
 180 185 190

gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

agc tac aag ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag aaa gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
 210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 78
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 78

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Asn Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Glu Ala Leu Arg Lys Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Ile Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Lys Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala

245

250

255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 79
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (556)..(558)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (640)..(642)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (727)..(729)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760)..(762)

<223>

<400> 79

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc	48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
1 5 10 15	
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt	96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly	
20 25 30	
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc	144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly	
35 40 45	
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag	192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys	
50 55 60	
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc	240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe	
65 70 75 80	
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc	288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser	
85 90 95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac	336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr	
100 105 110	
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc	384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val	
115 120 125	
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc	432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val	
130 135 140	
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc	480
His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly	
145 150 155 160	

gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190

gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

agc tac aag ttc atc ggc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 80
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 80

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu

225 230 235 240

Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 81
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (556)..(558)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (631)..(633)
<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (727)..(729)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760)..(762)

<223>

<400> 81

```
gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc      48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1           5           10           15
```

```
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt      96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
           20           25           30
```

```
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc      144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
           35           40           45
```

```
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag      192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
           50           55           60
```

```
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc      240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65           70           75           80
```

```
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc      288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
           85           90           95
```

```
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac      336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
           100          105          110
```

```
aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc      384
Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
           115          120          125
```

```
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc      432
Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
           130          135          140
```

cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac cat aag ttc acc gtc ttc gag 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190

gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220

gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ccg gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 82

<211> 287

<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 82

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn His Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr

210	215	220
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu		
225	230	235 240
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala		
	245	250 255
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly		
	260	265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val		
	275	280 285

<210> 83
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (640)..(642)
<223>

<220>

<221> 突变体
 <222> (694)..(696)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (727)..(729)
 <223>

<220>
 <221> 突变体
 <222> (760)..(762)
 <223>

<400> 83

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc 48
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt 96
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
 20 25 30

aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc 144
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
 35 40 45

ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag 192
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
 50 55 60

tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc 240
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80

gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc 288
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95

aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac 336
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc 384
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125

gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc 432
 Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140

 cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc 480
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160

 gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc 528
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175

 acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag 576
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190

 gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag 624
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205

 agc tac aag ttc atc ggc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac 672
 Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220

 gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ggc gag gtc aag tac act gtc ttt gag 720
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240

 acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct 768
 Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala
 245 250 255

 gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc 816
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly
 260 265 270

 gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc 861
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 84
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 梯牧草

<400> 84

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu

195	200	205
Ser Tyr Lys Phe Ile Gly Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr		
210	215	220
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu		
225	230	235 240
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala		
245	250	255
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly		
260	265	270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val		
275	280	285

<210> 85
<211> 861
<212> DNA
<213> 梯牧草

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(861)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (133)..(135)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (397)..(399)
<223>

<220>
<221> 突变体
<222> (631)..(633)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (694)..(696)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (727)..(729)

<223>

<220>

<221> 突变体

<222> (760)..(762)

<223>

<400> 85

gcc gat ctc ggt tac ggc ccc gcc acc cca gct gcc ccg gcc gcc ggc	48
Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly	
1 5 10 15	
tac acc ccc gcc acc ccc gcc gcc ccg gcc gga gcg gag cca gca ggt	96
Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly	
20 25 30	
aag gcg acg acc gag gag cag aag ctg atc gag aag aaa aac gcc ggc	144
Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly	
35 40 45	
ttc aag gcg gcc ttg gcc gct gcc gcc ggc gtc ccg cca gcg gac aag	192
Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys	
50 55 60	
tac agg acg ttc gtc gca acc ttc ggc gcg gcc tcc aac aag gcc ttc	240
Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe	
65 70 75 80	
gcg gag ggc ctc tcg ggc gag ccc aag ggc gcc gcc gaa tcc agc tcc	288
Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser	
85 90 95	
aag gcc gcg ctc acc tcc aag ctc gac gcc gcc tac aag ctc gcc tac	336
Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr	
100 105 110	

aag aca gcc gag ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac gcc tac gtc Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val 115 120 125	384
gcc acc gta agc agc gcg ctc cgc atc atc gcc ggc acc ctc gag gtc Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val 130 135 140	432
cac gcc gtc aag ccc gcg gcc gag gag gtc aag gtc atc ccc gcc ggc His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly 145 150 155 160	480
gag ctg cag gtc atc gag aag gtc gac gcc gcc ttc aag gtc gct gcc Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala 165 170 175	528
acc gcc gcc aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu 180 185 190	576
gcc gcc ttc aac gac gcc atc aag gcg agc acg ggc ggc gcc tac gag Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu 195 200 205	624
agc tac aac ttc atc ccc gcc ctg gag gcc gcc gtc aag cag gcc tac Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr 210 215 220	672
gcc gcc acc gtc gcc acc gcg ggc gag gtc aag tac act gtc ttt gag Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu 225 230 235 240	720
acc gca gaa aaa aag gcc atc acc gcc atg tcc gaa gca aaa aag gct Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala 245 250 255	768
gcc aag ccc gcc gcc gct gcc acc gcc acc gca acc gcc gcc gtt ggc Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly 260 265 270	816
gcg gcc acc ggc gcc gcc acc gcc gct act ggt ggc tac aaa gtc Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val 275 280 285	861

<210> 86
<211> 287
<212> PRT

<213> 梯牧草

<400> 86

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Lys Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Val Ser Ser Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
130 135 140

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu

180	185	190
Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu		
195	200	205
Ser Tyr Asn Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr		
210	215	220
Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu		
225	230	235 240
Thr Ala Glu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Lys Lys Ala		
	245	250 255
Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly		
	260	265 270
Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val		
	275	280 285

<210> 87
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> 屋尘螨

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(666)
 <223>

<400> 87	
act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg cga act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg	144
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	

35	40	45	
gct tac cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat			192
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp			
50	55	60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att			240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile			
65	70	75	80
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac			288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr			
85	90	95	
gtt gca cga gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt			336
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly			
100	105	110	
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt			384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg			
115	120	125	
gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc			432
Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile			
130	135	140	
aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cga aca atc att caa			480
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln			
145	150	155	160
cgc gat aat ggt tac caa cca aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt			528
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly			
165	170	175	
tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg			576
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp			
180	185	190	
gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc			624
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile			
195	200	205	
gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc			666
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu			
210	215	220	

<210> 88

<211> 222

<212> PRT

<213> 屋尘螨

<400> 88

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 89

<211> 387

<212> DNA

<213> 屋尘螨

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<223>

<400> 89

gat caa gtc gat gtc aaa gat tgt gcc aat cat gaa atc aaa aaa gtt 48
 Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15

ttg gta cca gga tgc cat ggt tca gaa cca tgt atc att cat cgt ggt 96
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
 20 25 30

aaa cca ttc caa ttg gaa gcc gtt ttc gaa gcc aac caa aac aca aaa 144
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys
 35 40 45

acc gct aaa att gaa atc aaa gcc tca atc gat ggt tta gaa gtt gat 192
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60

gtt ccc ggt atc gat cca aat gca tgc cat tac atg aaa tgc cca ttg 240
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

gtt aaa gga caa caa tat gat att aaa tat aca tgg aat gtt ccg aaa 288
 Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

att gca cca aaa tct gaa aat gtt gtc gtc act gtt aaa gtt atg ggt 336

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
 100 105 110

gat gat ggt gtt ttg gcc tgt gct att gct act cat gct aaa atc cgc 384
 Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

gat 387
 Asp

<210> 90
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 屋尘螨

<400> 90

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
 20 25 30

Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys
 35 40 45

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95

Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
 100 105 110

Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

Asp

图1

用于突变体1号的突变特异的寡核苷酸引物。
下划线指示突变的核苷酸。

<i>Bet v 1</i> 有义	5'- AATTATGAGACTGAGACC <u>ACCTCTGT</u> TATCCCAGCAGCTCG -3'
<i>Bet v 1</i> 无义	3'- TTAATACTCTGACTCTGGT <u>TGGAGACA</u> ATAGGGTCGTCGAGC -5'
有义引物	5'- TGAGAC <u>CCCCCTCTGT</u> TATCCCAG -3'
无义引物	3'- ATACTCTGACTCTGGGGGAGACA -5'

图2

用于对Bet v 1 (No. 2801) 进行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'-ACAGAGGGGGTCTCAGTCTCATA
2	有义	4: 186Bv, 31-mer 5'-GATACCCTCTTTCCACAGGTTGCACCCCAAG
2	无义	5: 187Bv, 31-mer 5'-ACCTGTGGAAAGAGGGTATCGCCATCAAGGA
3	有义	6: 188Bv, 23-mer 5'-AACATTTTCAGGAAATGGAGGGCC
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'-GGACCATGCAAACTTCAAATACA
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'-AGGCCTGAGGGAAAGCTGATCTT
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'-CCATCACCAGTTGCCACTATCTTT
全	无义	18: 200Bv, 15-mer 5'-CATGCCATCCGTAAG

图3

所有Bet v 1突变体的概况

1 (A-C)		
GGTGTGTTTAATTATGAGACTGAGACCACCTCTGTTATCCCAGCAGCTCGACTGT'TCAAG	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)		
GCCTTTATCCTTGATGGCGATAACCTCTTTCCAAAGGTTGCACCCCAAGCCATTAGCAGT	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)		
GTTGAAAACATTGAAGGAAATGGAGGGCCTGGAACCATTAAGAAGATCAGCTTTCCCCGAA	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)		
GGCCTCCCTTTCAAGTACGTGAAGGACAGAGTTGATGAGGTGGACCACACAAACTTCAAA	240	
G L P F K Y V K D R V D E V D H T-A N F K	80	
TACAATTACAGCGTGATCGAGGGCGGTCCCATAGGCGACACATTGGAGAAGATCTCCAAC		
Y N Y S V I E G G P I G D T L E K I S N	300	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		
H T K G D H E V K A E Q V K A S K E M G	420	140
GAGACACTTTTGAAGGGCCGTTGAGAGCTACCTCTTGGCACACTCCGATGCCTACAATAA		
E T L L R A V E S Y L L A H S D A Y N stop	480	159

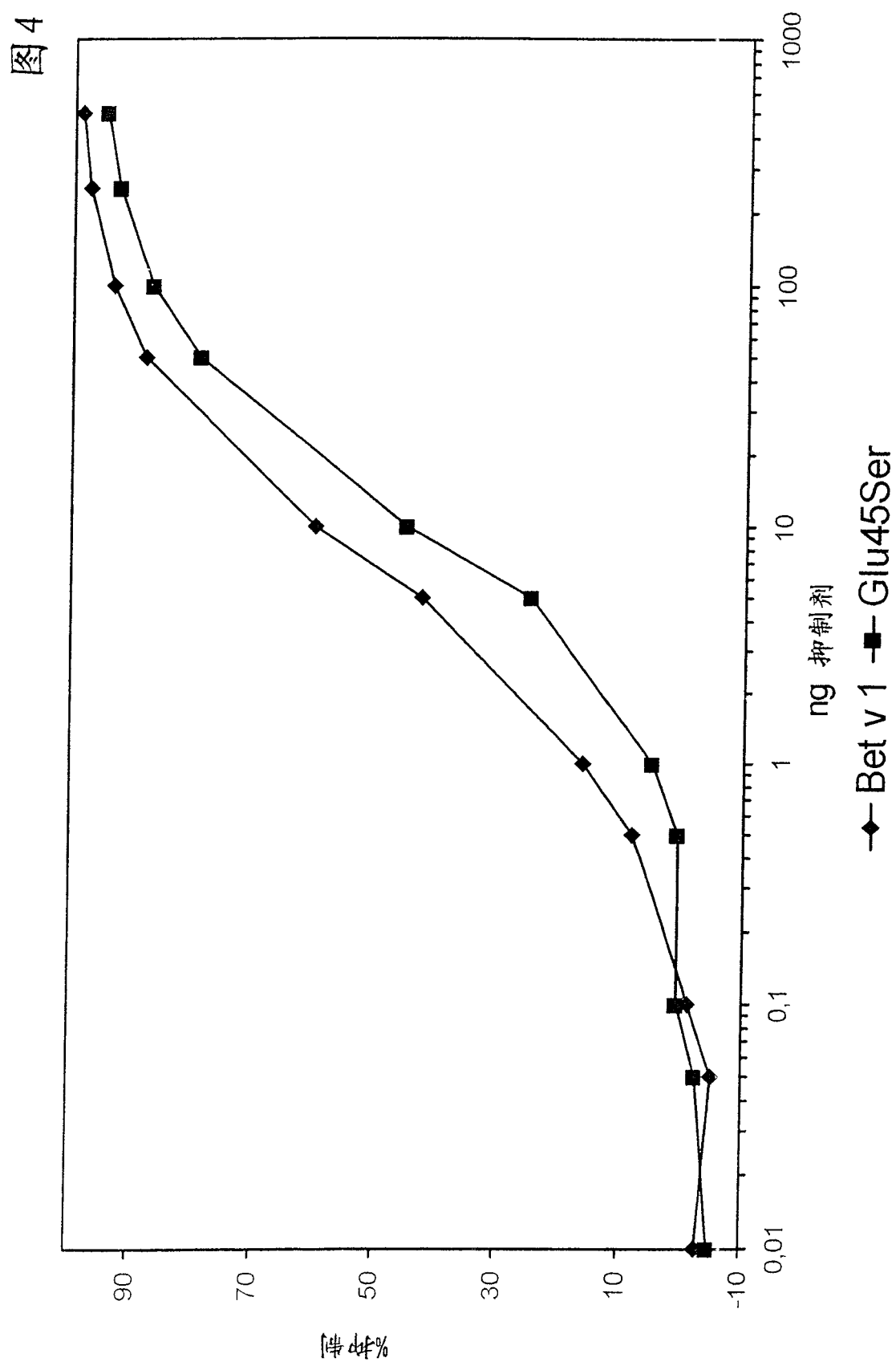
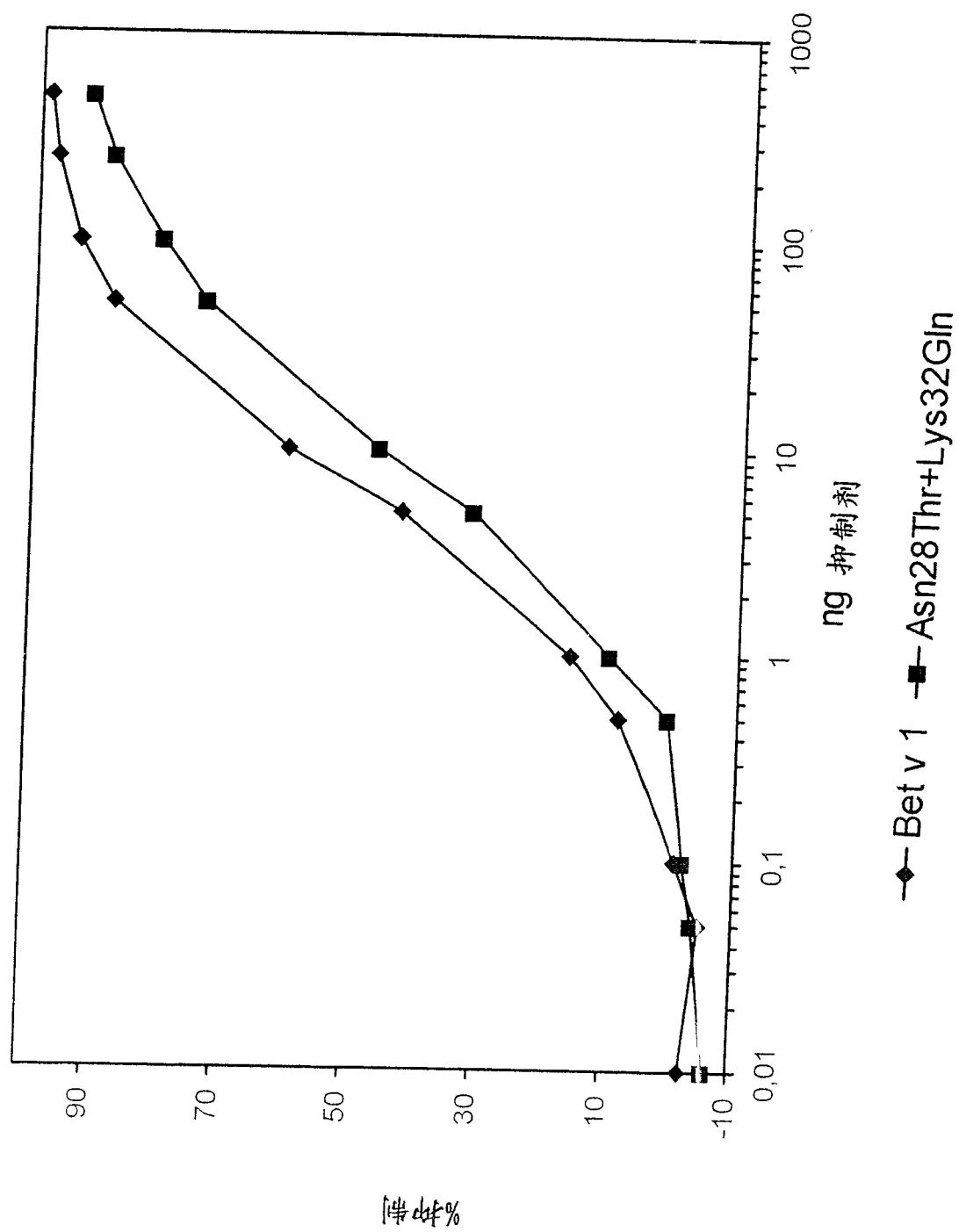
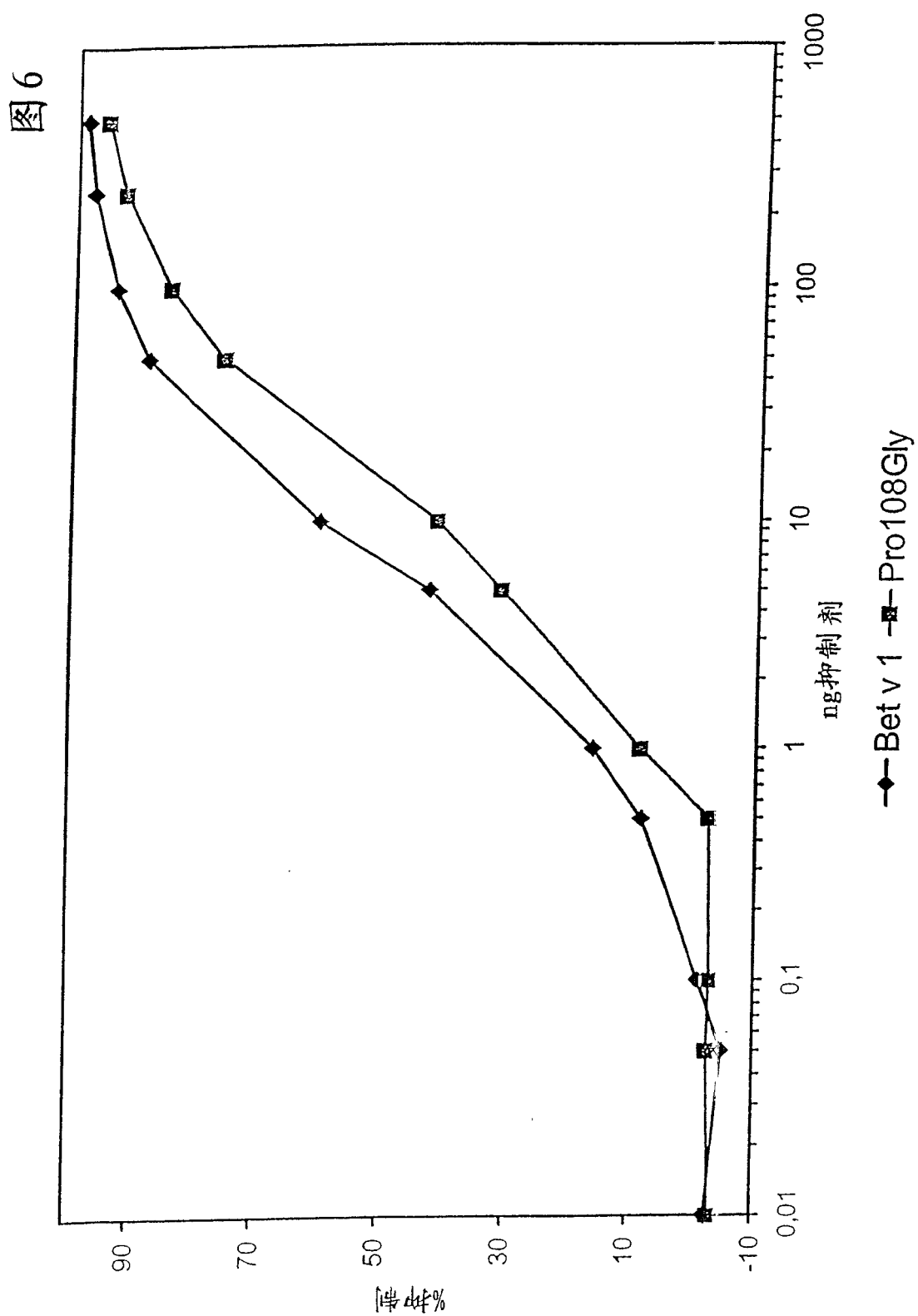
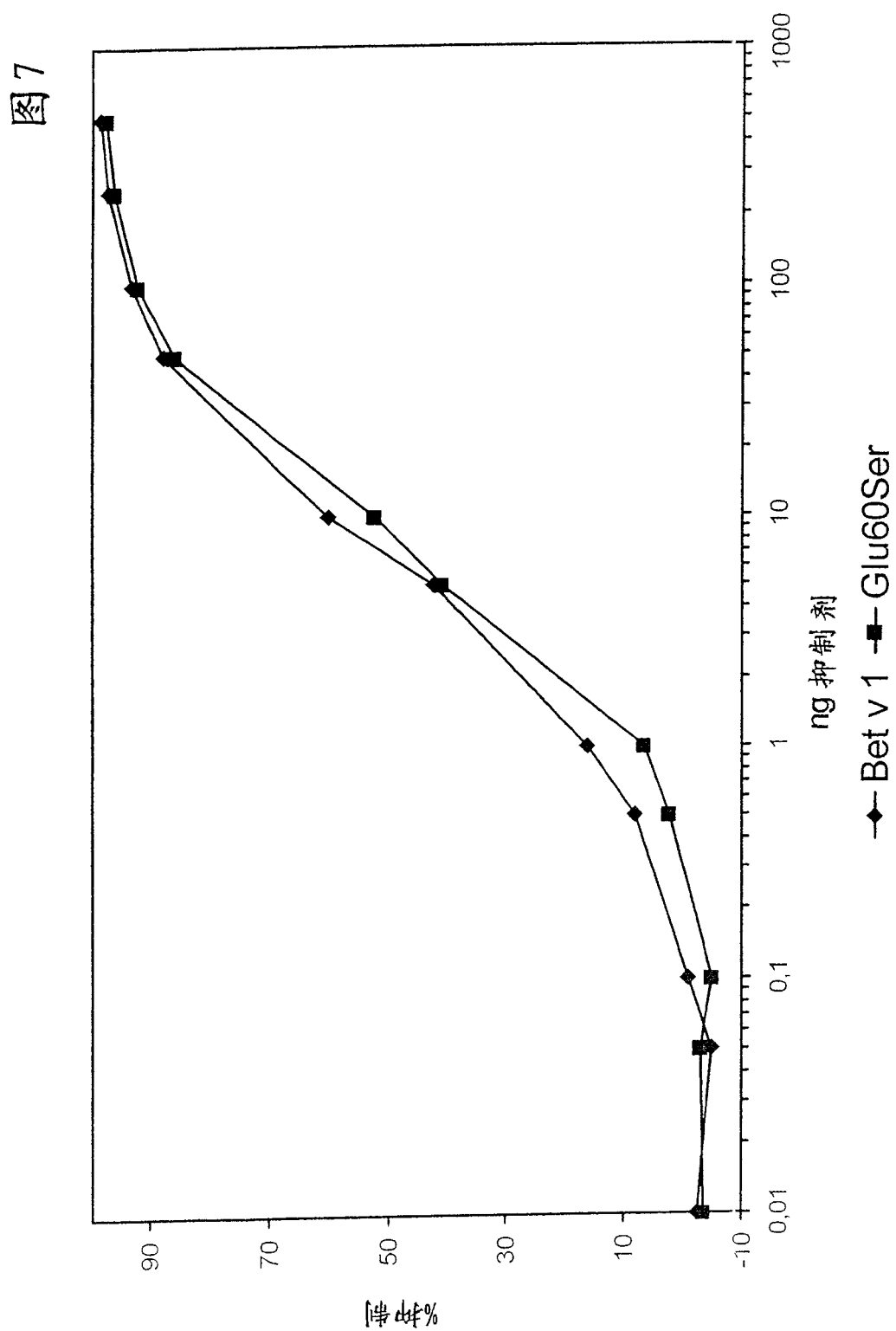
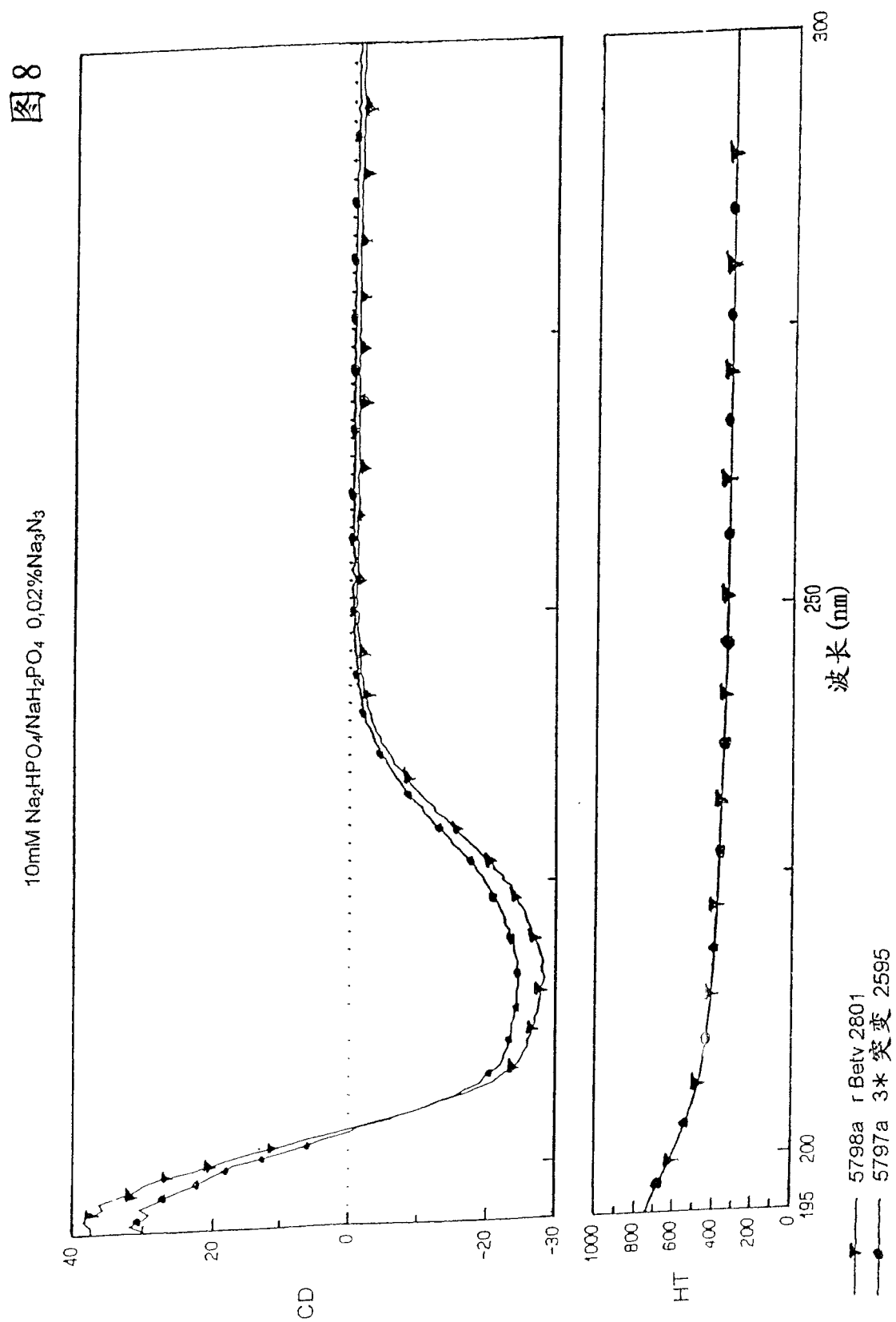


图5









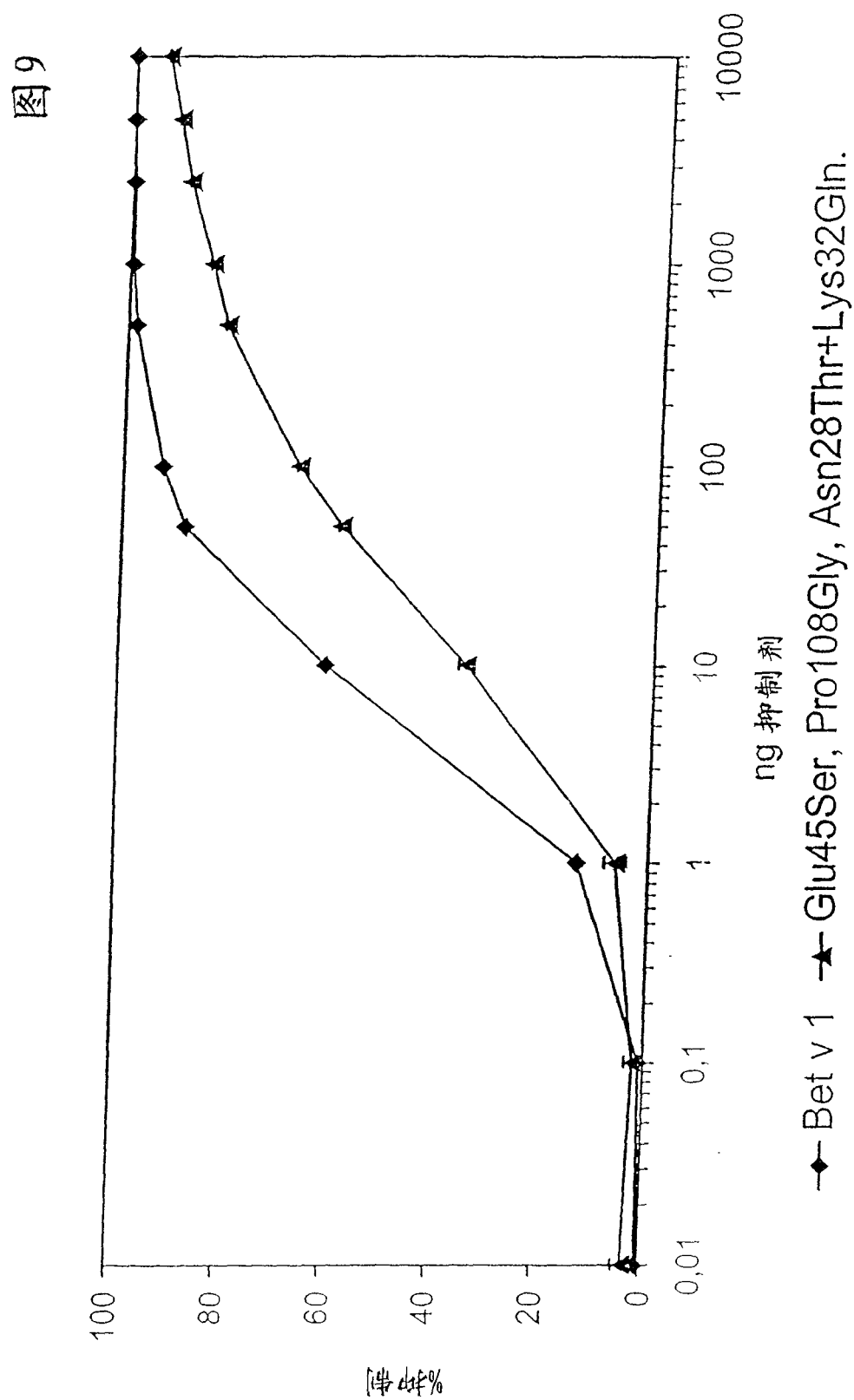


图10

黄胡蜂抗原5中的保守残基

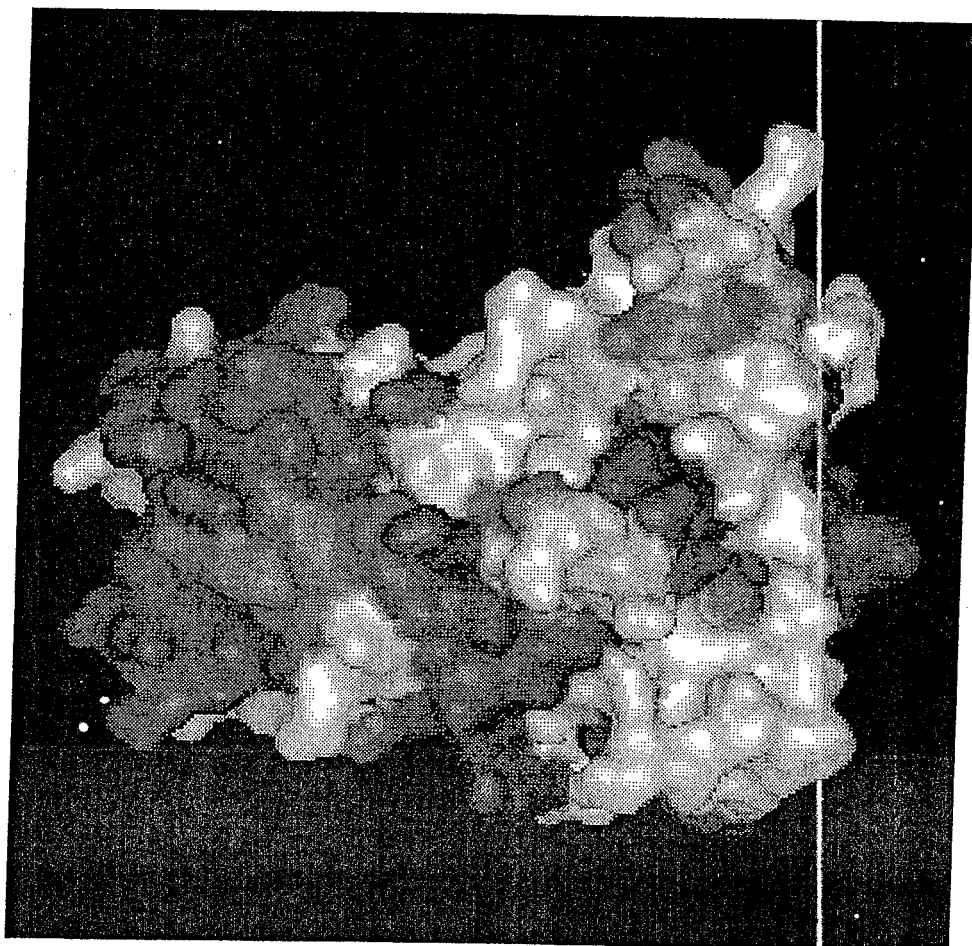


图10(续)

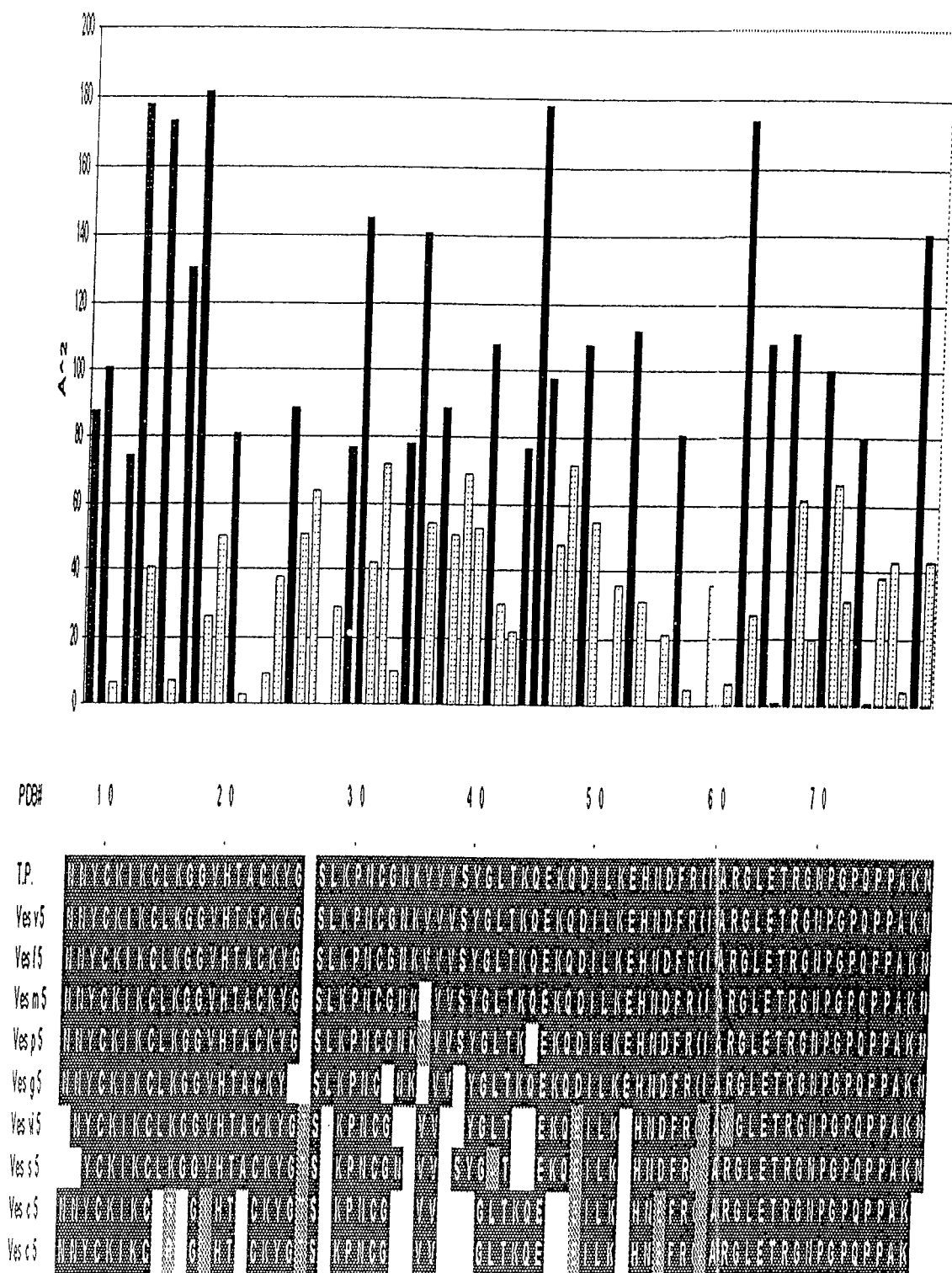


图10(续)

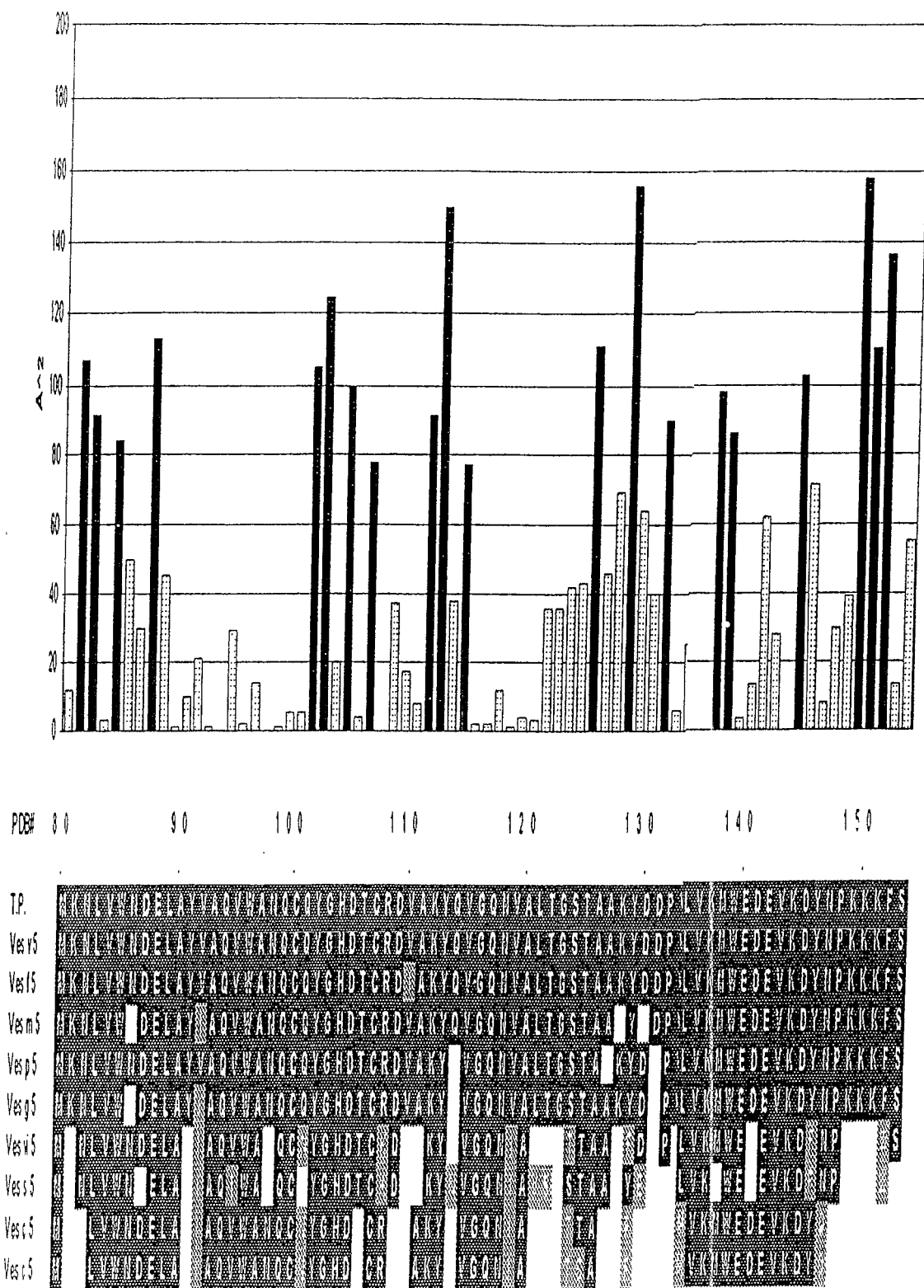


图10(续)

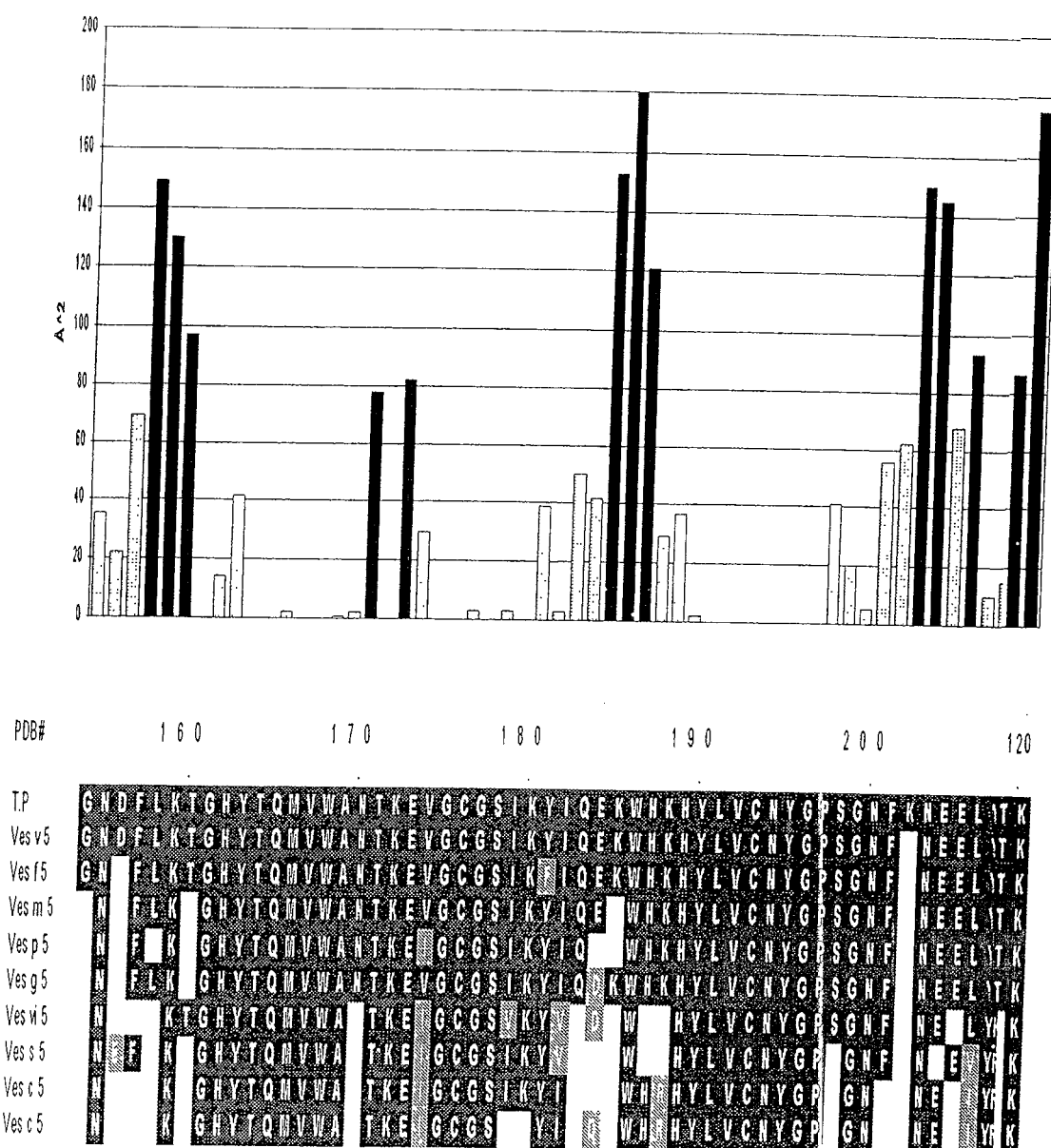


图11

用于Ves v 5突变体的突变特异的寡核苷酸引物
下划线指示突变的核酸

Ves v 5 mutant 1 (K72A)

Ves v 5 有义	5'- ACCACAGCCTCCAGCGAAGAATATGAAAAATTTGGTATGGA -3'
Ves v 5 无义	3'- TGGTGTCGGAGGTCGCTTCTTATACTTTTAAACCATACCT -5'
有义引物	5'- CCAGCGGCTAATATGAAAAAT -3'
无义引物	3'- GTCGGAGGTCGCGATTATAC -5'

Ves v 5 mutant 2 (Y96A)

Ves v 5 有义	5'- GGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACTTGCAGGGATG -3'
Ves v 5 无义	3'- CCGATTAGTTACAGTTATACCAAGTGCTATGAACGTCCTAC -5'
有义引物	5'- TGTCAGCTGGTCACGATACT -3'
无义引物	3'- TTAGTTACAGTTCGACCAAGTG -5'

图12

对Ves v 5进行定点突变的寡核苷酸引物

全有义 1: XhoI起始, 38-mer:

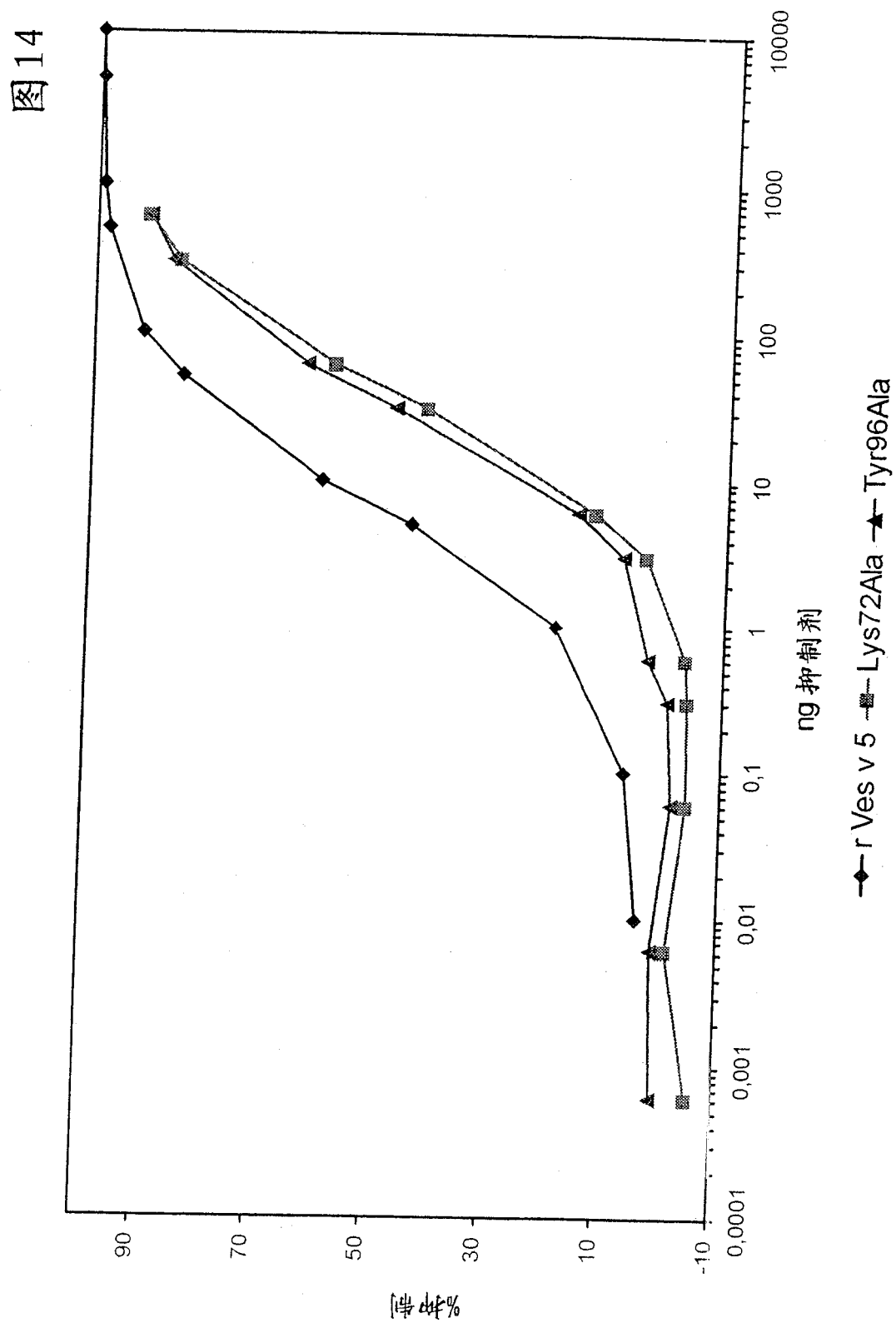
EcoRI
5'-CCGCTCGAGAAAAGAAACAATTATTGTAAAATAAAATG
L E K R N N Y C K I K
Kex2 切割位点 Ves v 5的氨基末端

1 有义	1: K72As	21-mer	5'-CCAGCGGCTAATATGAAAAAT
1 无义	2: K72Aa	21-mer	5'-CATATTAGCCGCTGGAGGCTG
2 有义	3: Y96As	21-mer	5'-TGTCAAGCTGGTCACGATACT
2 无义	4: Y96Aa	21-mer	5'-GTGACCAGCTTGACATTGATT
全无义	7: CT-pPICZαA,	21-mer	5'-ATTCATCAGCTGCGAGATAGG

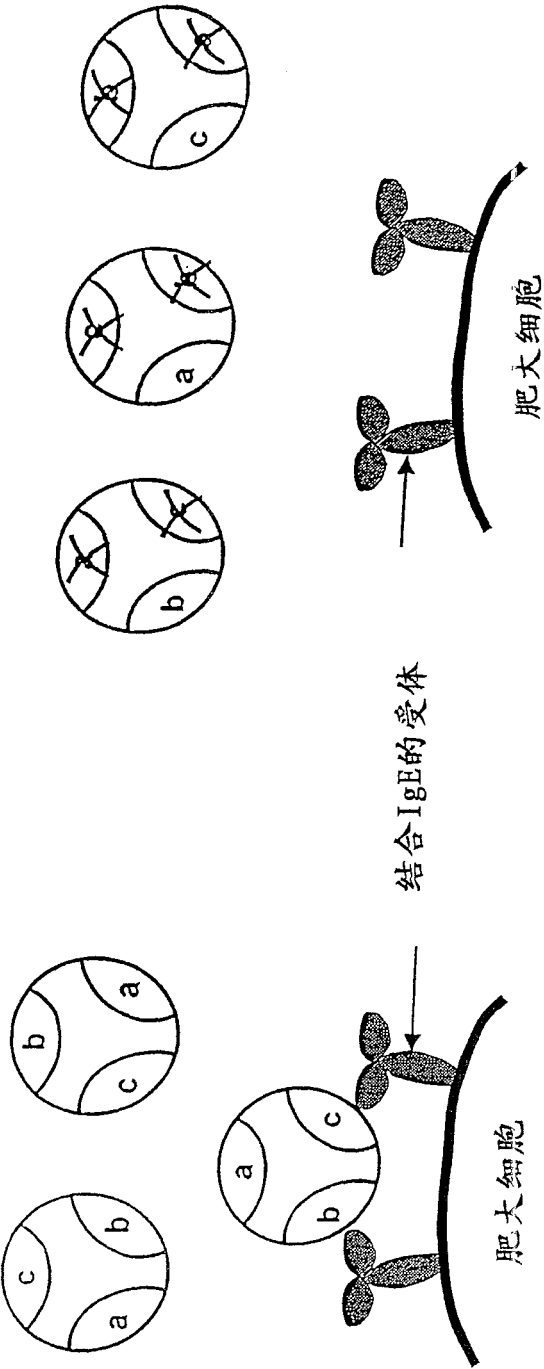
图13

Ves v 5突变体的概况

1	AACAATTATTGTAAAAATAAAATGTTTGAAAGGAGGTGTCCATACTGCCTGCAAATATGGA	60
1	N N Y C K I K C L K G G V H T A C K Y G	20
61	AGTCTTAAACCGAATTGCGGTAATAAGGTAGTGGTATCCTATGGTCTAACGAAACAAGAG	120
21	S L K P N C G N K V V V S Y G L T K Q E	40
121	AAACAAGACATCTTAAAGGAGCACAAATGACTTTAGACAAAAAATTGCACGAGGATTGGAG	180
41	K Q D I L K E H N D F R Q K I A R G L E	60
1 [K72A] (AAG-GCT)		
181	ACTAGAGGTAATCCTGGACCACAGCCTCCAGCGAAGAATATGAAAAATTTGGTATGGAAC	240
61	T R G N P G P Q P P A K N M K N L V W N	80
2 [Y95A] (TA-GC)		
241	GACGAGTTAGCTTATGTCGCCCAAGTGTGGGCTAATCAATGTCAATATGGTCACGATACT	300
81	D E L A Y V A Q V W A N Q C Q Y G H D T	100
301	TGCAGGGATGTAGCAAAATATCAGGTTGGACAAAACGTAGCCTTAACAGGTAGCACGGCT	360
101	C R D V A K Y Q V G Q N V A L T G S T A	120
361	GCTAAATACGATGATCCAGTTAAACTAGTTAAATGTGGGAAGATGAAGTGAAAGATTAT	420
121	A K Y D D P V K L V K M W E D E V K D Y	140
421	AATCCTAAGAAAAAGTTTTCGGGAAACGACTTTCTGAAAACCGGCCATTACACTCAAATG	480
141	N P K K K F S G N D F L K T G H Y T Q M	160
481	GTTTGGGCTAACACCAAGGAAGTTGGTTGTGGAAGTATAAAATACATTCAAGAGAAATGG	540
161	V W A N T K E V G C G S I K Y I Q E K W	180
541	CACAAACATTACCTTGTATGTAATTATGGACCCAGCGGAACTTTAAGAATGAGGAACTT	600
181	H K H Y L V C N Y G P S G N F K N E E L	200
601	TATCAAACAAAGTAA	612
201	Y Q T K stop	204



点突变对主要的IgE的抗原决定部位的作用
具有3个抗原决定部位的假设模型



交联 图15A

无交联

图15B

图16

DNA 序列

Der p 2 (以 SWISSPROT 序号 P49278 注音符指示 DNA 序列)

起点

```

1   cacaaattct tctttcttc ttactactga tcattaatct gaaaacaaaa ccaaacaac
61  cattcaaat gatgtacaaa atttgtgtc ttccattgtt ggtcgcagcc gttgctcgtg
121 atcaagtcga tgtcaaagat tgtgccaatc atgaaatcaa aaaagtittg gtaccaggat
181 gccatggttc agaaccatgt atcattcatc gtggtaaacc attccaattg gaagccgttt
241 tcgaagccaa ccaaaacaca aaaacggcta aaattgaaat caaagcctca atcgatggtt
301 tagaagttga tgttcccggt atcgatccaa atgcatgcca ttacatgaaa tgcccattgg
361 ttaaaggaca acaatatgat attaaatata catggaatgt tccgaaaatt gcaccaaaat
421 ctgaaaatgt tgcgtcact gttaaagtta tgggtgatga tgggttttg gcctgtgcta
481 ttgctactca tgctaaaac cgcgattaaa tcaaacaaaa ttattgatt ttgtaatcac
541 aatgattga tttcttcc aaaaaaaaaa taaataaaat ttgggaatt c

```

氨基酸序列

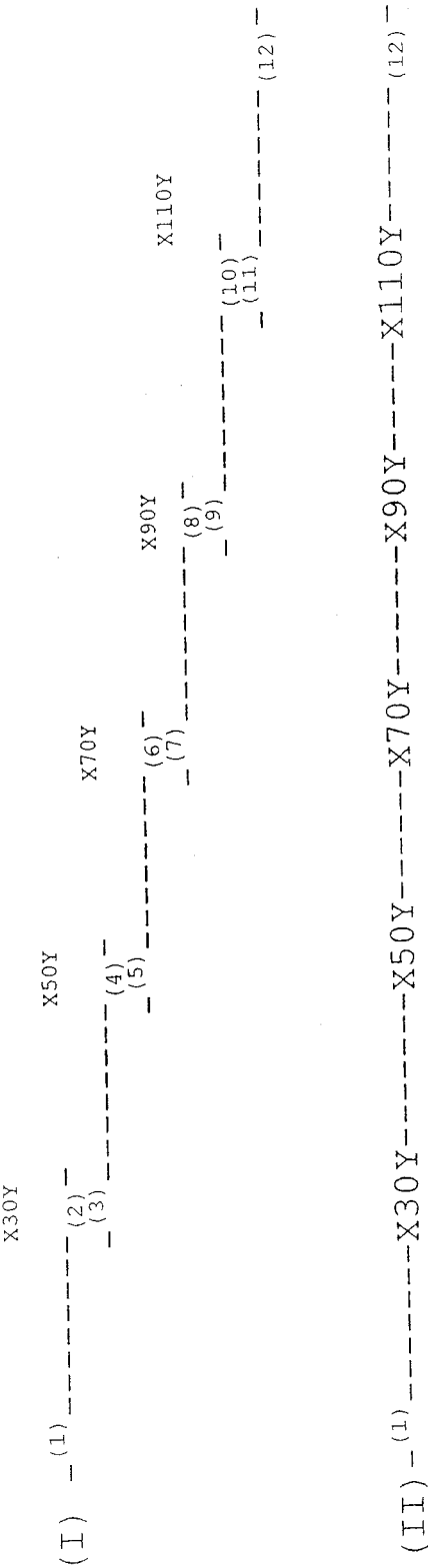
Der p 2 (序号 P49278 SWISSPROT; 包括信号肽1-17)

```

1   mmykilclsl lvaavardqv dvkdcanhei kkvlvpgchg sepciihrhk pfqlavfea
61  nqntktakie ikasidglev dvpgidpnac hymkcplvkg qqydikytwn vpkiapksen
121 vvvtkvmgd dgvlacaiat hakird

```

图17



线代表DNA序列
线上括号内数字代表有义寡核苷酸引物：
(1), (3), (5), (7), (9), (11).
线上括号内数字代表无义寡核苷酸引物：
(2), (4), (6), (8), (10), (12).
标注X(位置)Y代表突变
(1)代表包括蛋白质N-末端的有义寡核苷酸引物。
(12)代表包括蛋白质C-末端的反义寡核苷酸引物。

图 18

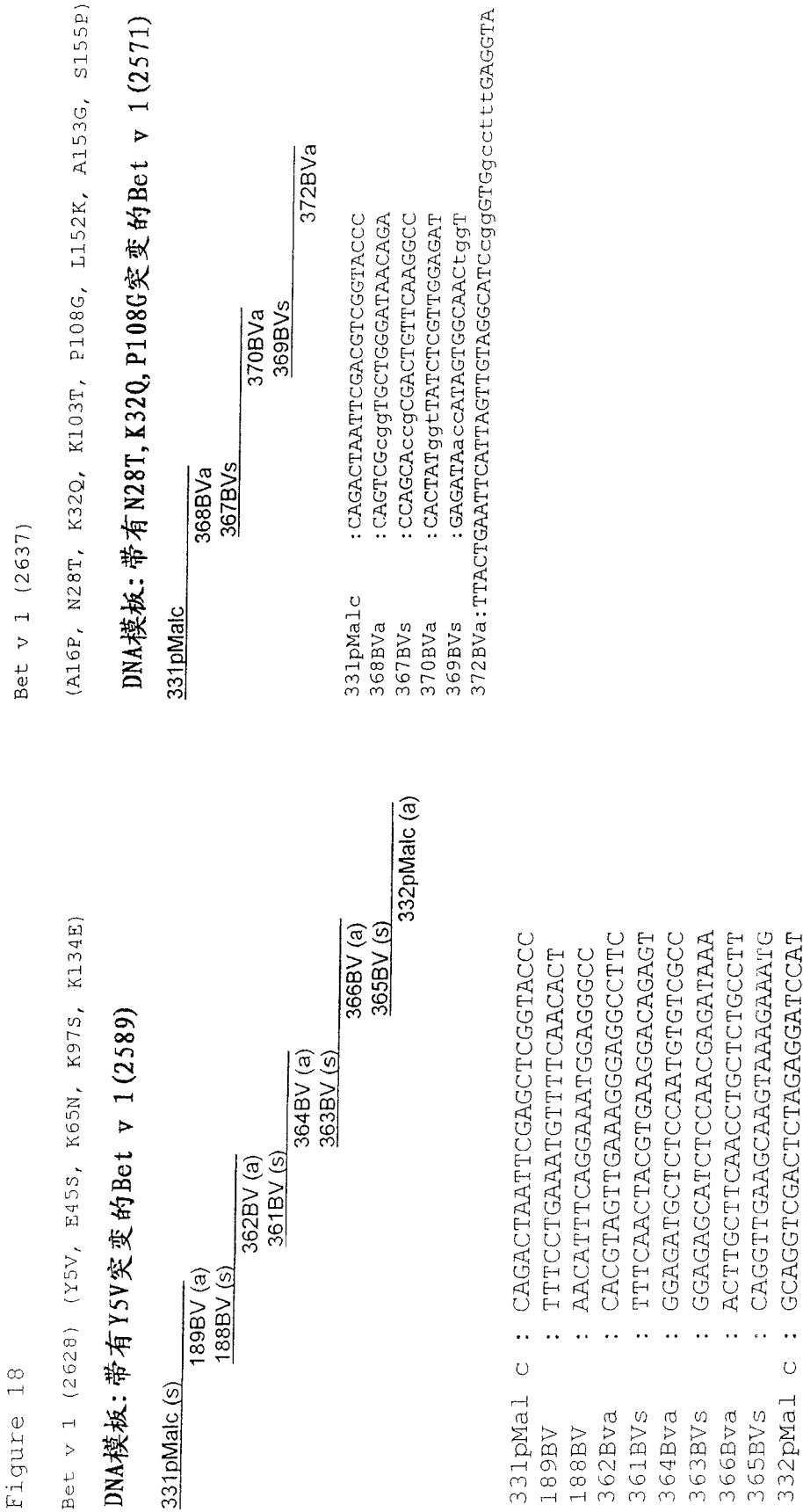
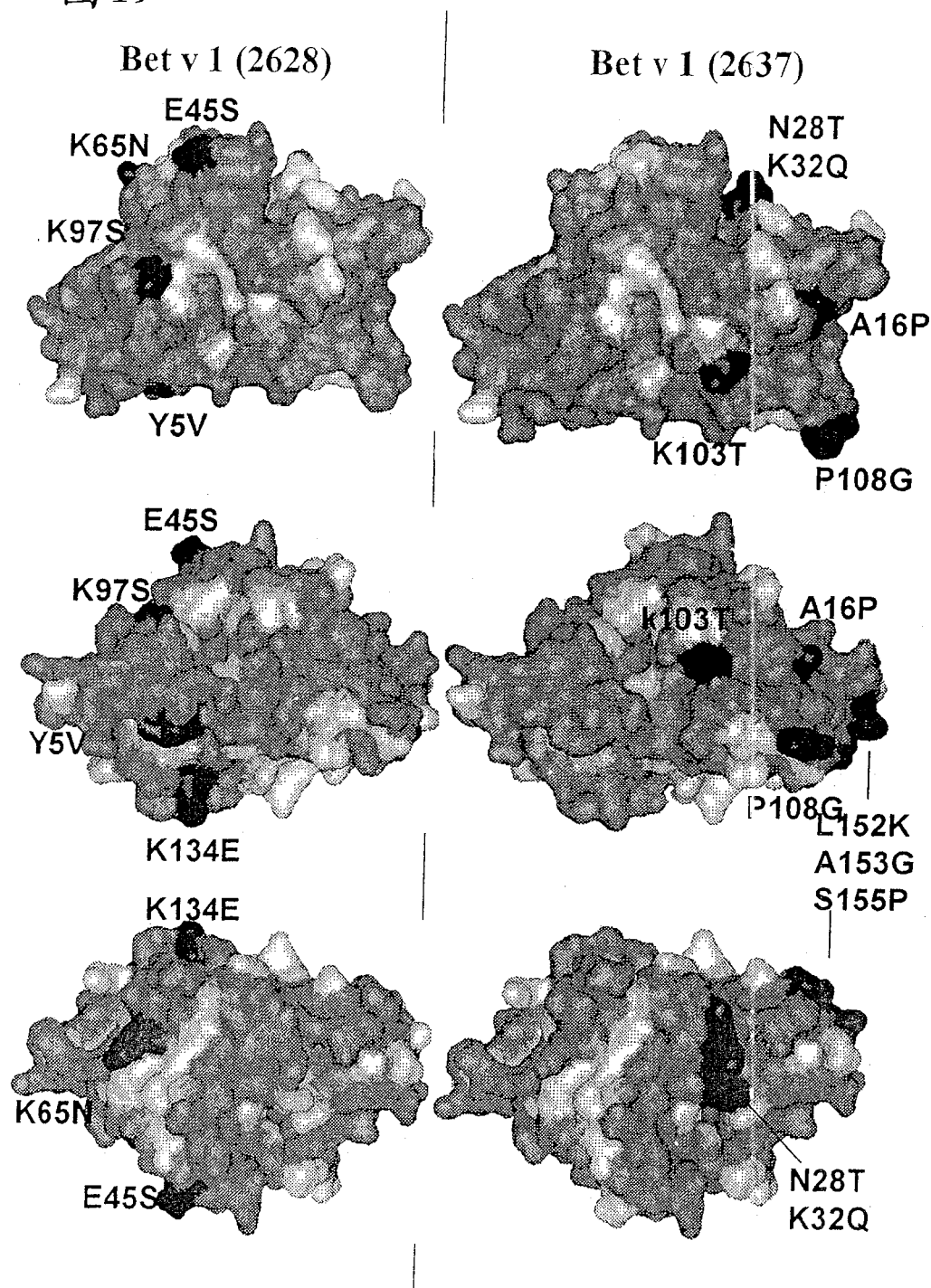


图 19



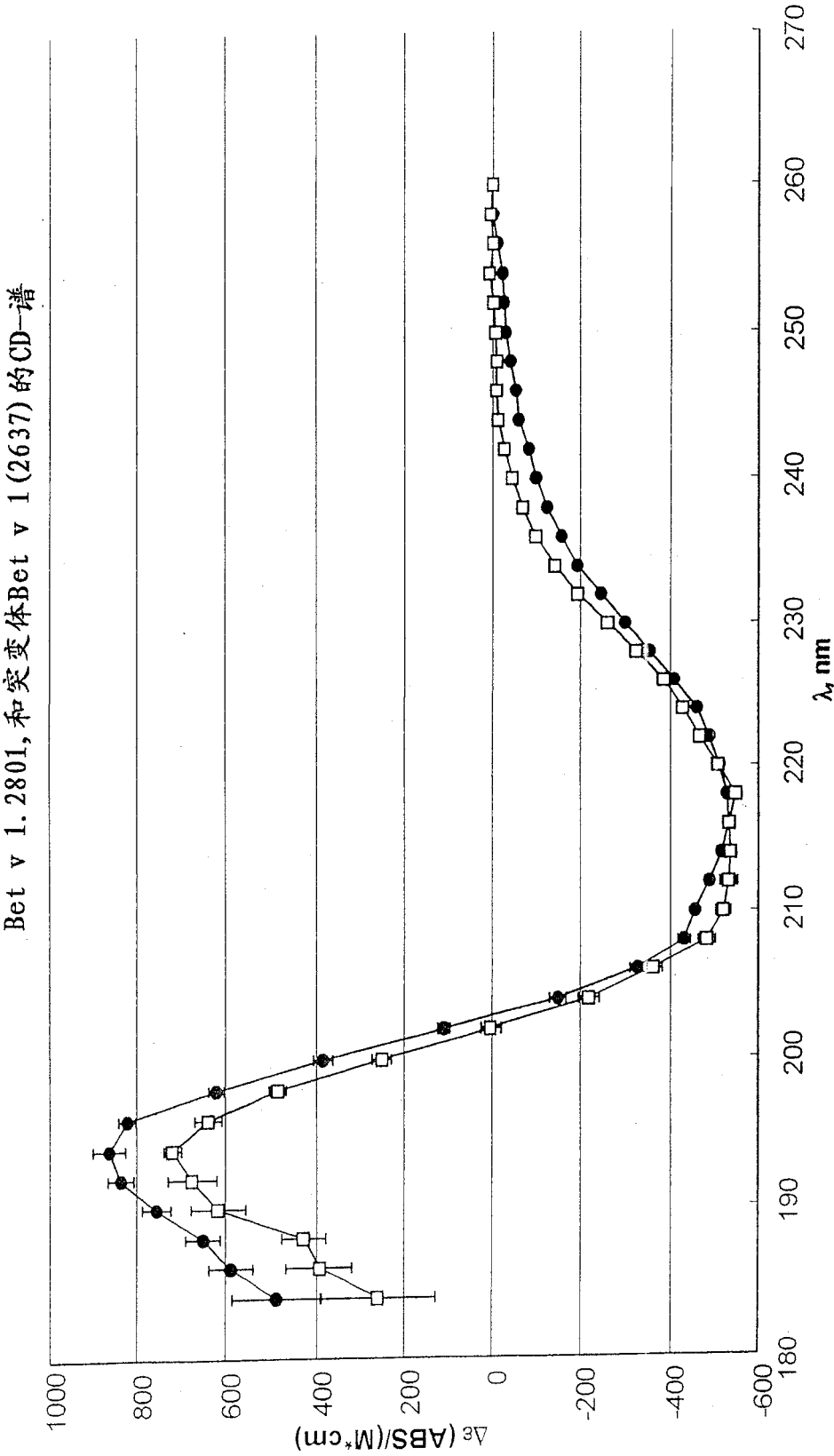
Bet v 1的分子表面。

左侧: Bet v 1(2628), 右侧: Bet v 1(2637)

灰色: 主链+在Fagales中保守95-100%的氨基酸。

黑色: 引入的点突变。

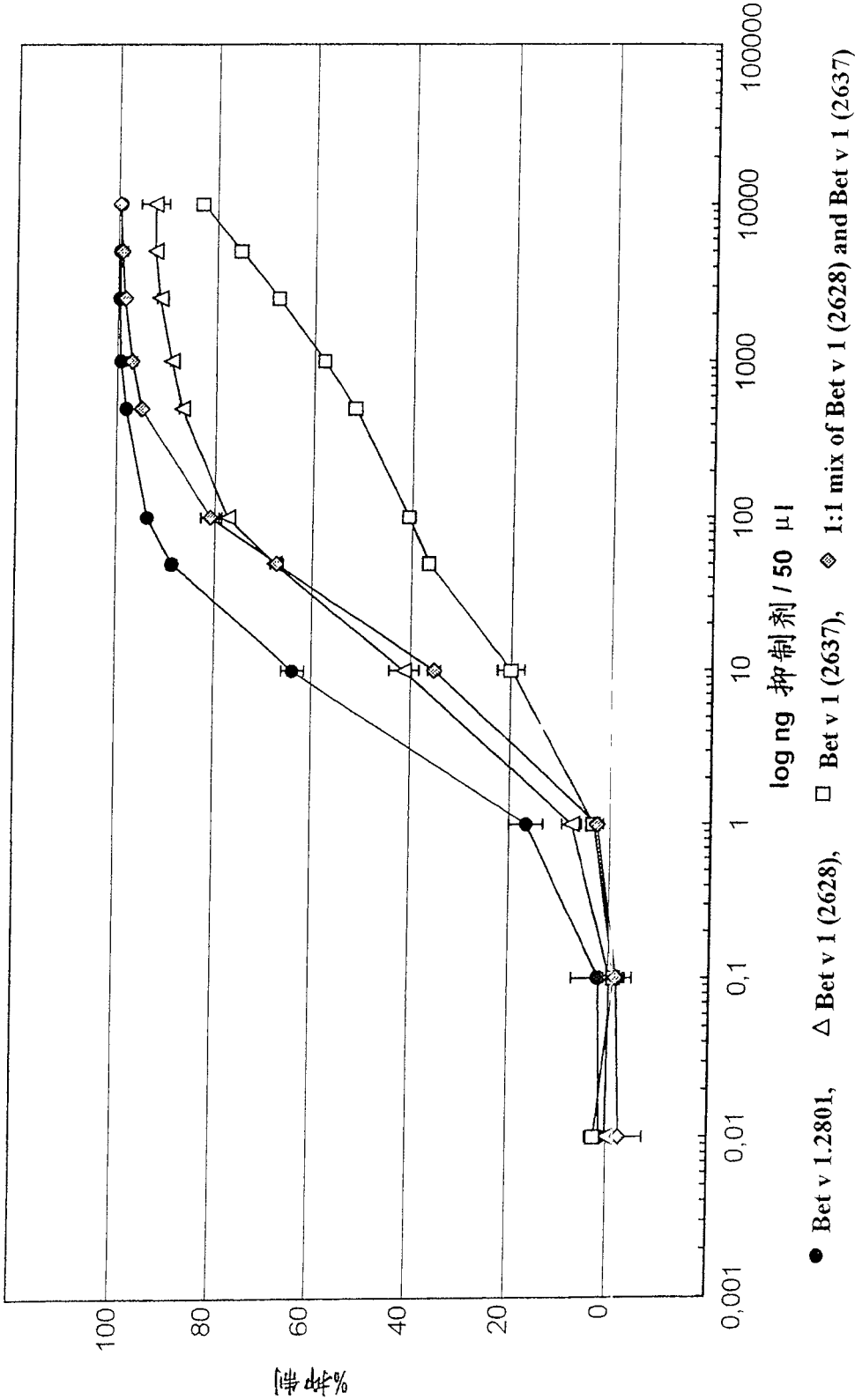
图 20



Bet v 1(2637) 的CD谱, 空方格, 和天然折叠的Bet v 1.2801的CD谱
黑圆, 都于20℃获得

图21

用Bet v 1.2801和突变的Bet v 1变态反应原
抑制人血清IgE结合Bet v 1.2801



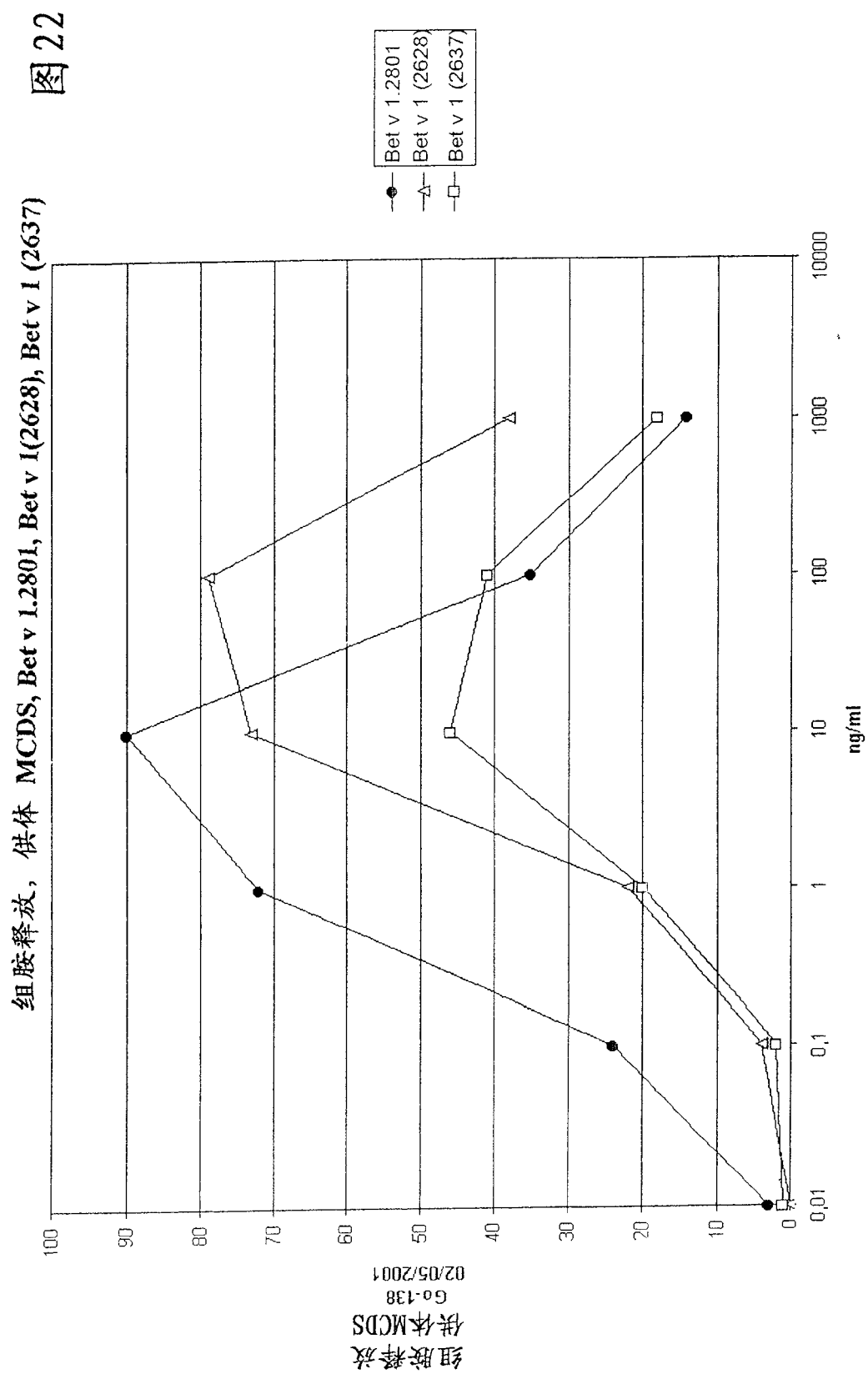
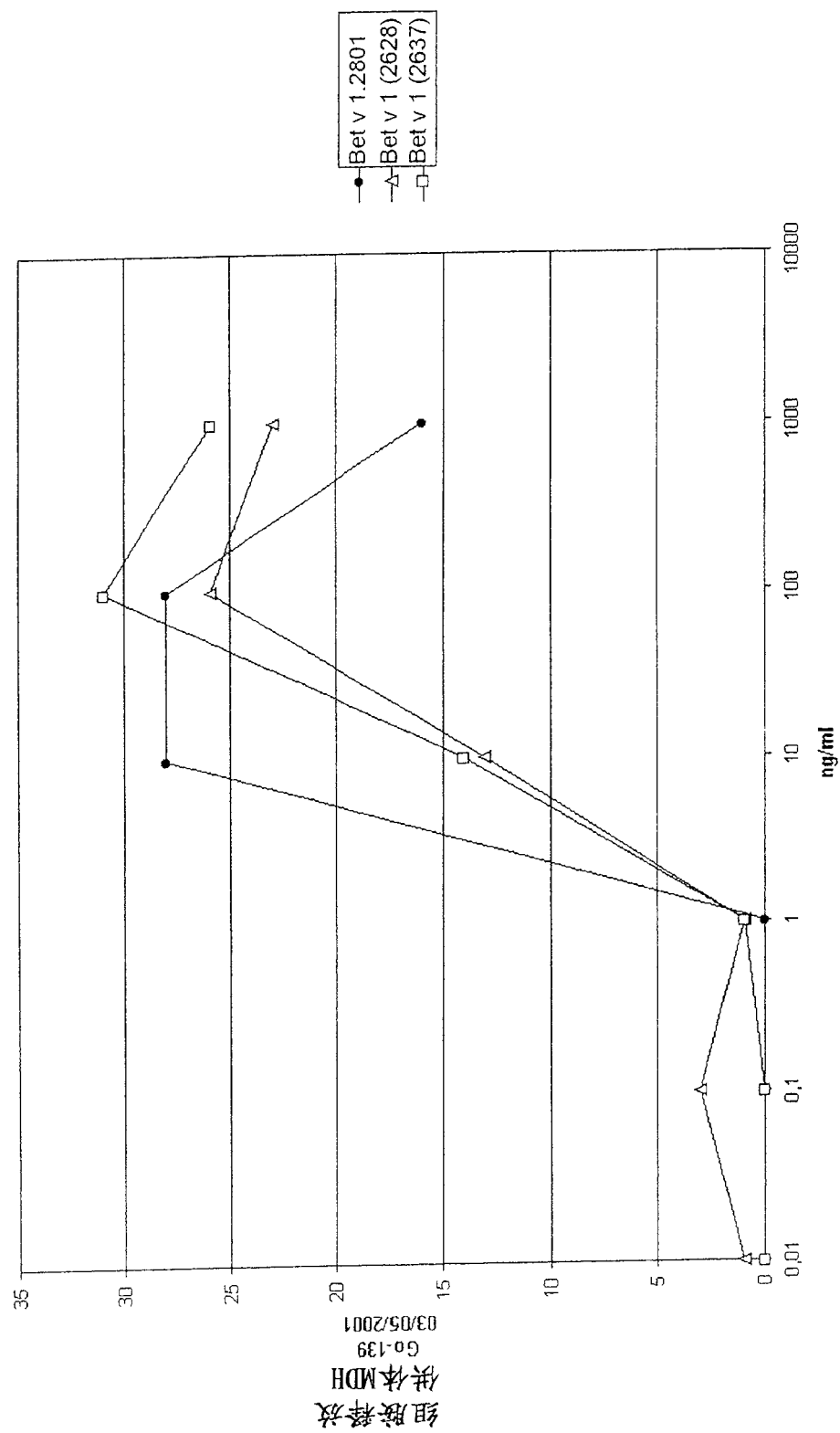
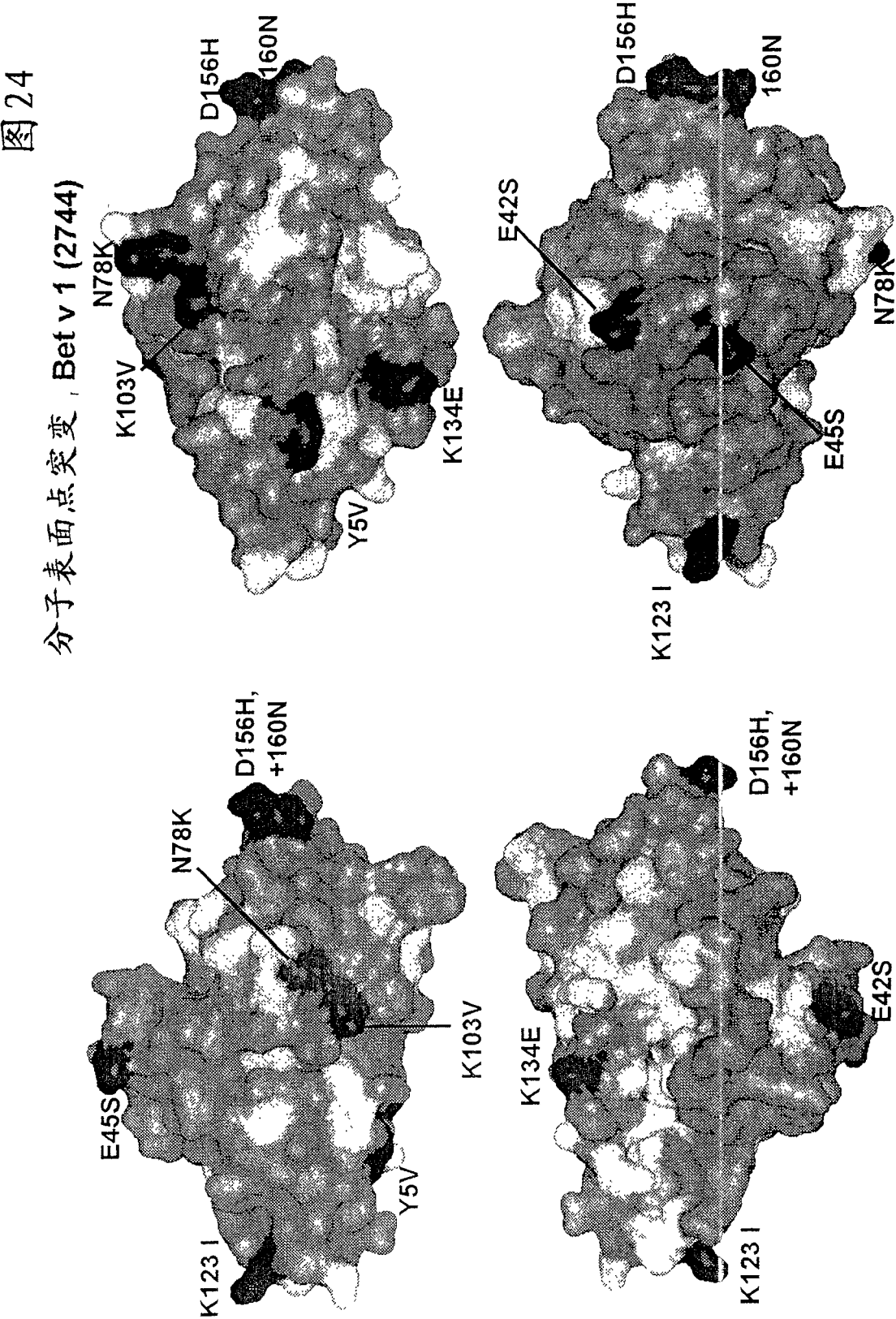


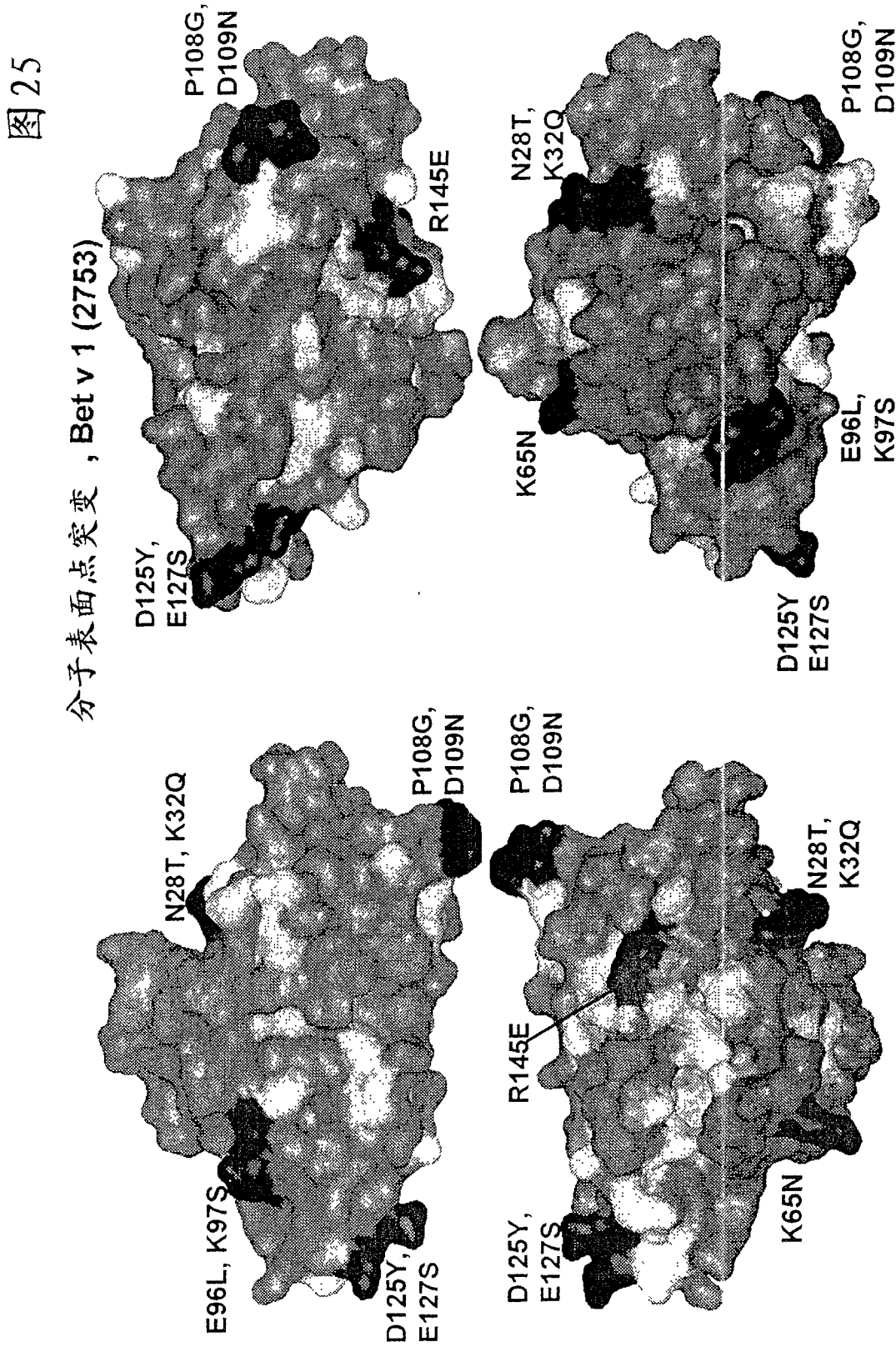
图 23

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



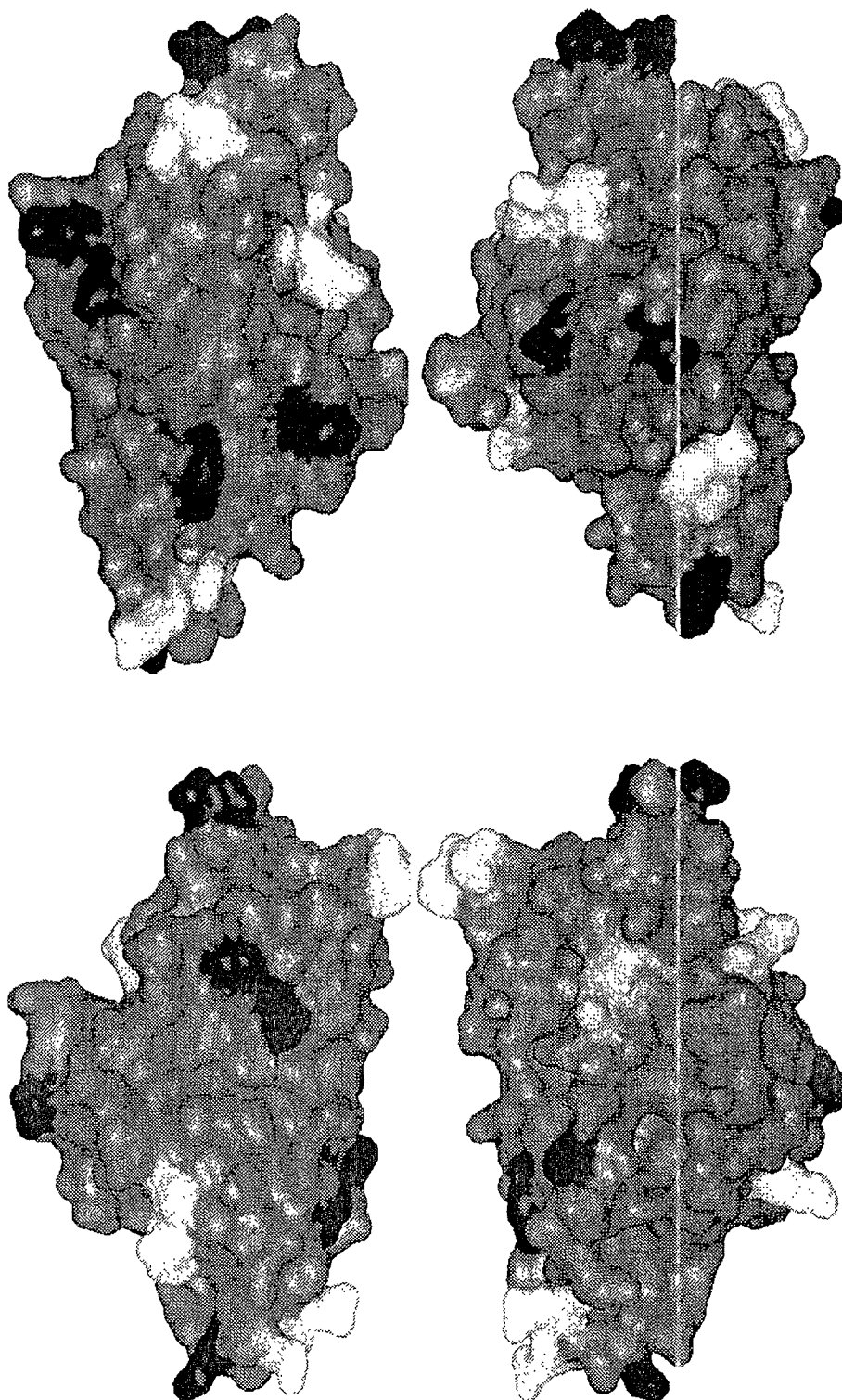


灰: 主链+在Fagales中以95-100%保守的氨基酸残基, 黑色: 点突变



灰：主链+在Fagales中以95-100%保守的氨基酸残基，黑色：点突变

分子表面点突变的分布，Bet v 1(2744) [白]，和Bet v 1(2753) [黑] 图 26



灰：分子表面；在Fagales中保守性为95-100%的氨基酸

黑：突变体 (Y5V, K134E), (E42S, E45S), (N78K, K103V), K123 I, (D156H, +160N)

白：突变体 (N28T, K32Q), K65N, (E96L, K97S), (P108G, D109N), (D125Y, E127S), R145E

图 27

Bet v 1.2801和突变体Bet v 1 (2744) 圆二色谱, pH7.13, T 20C.

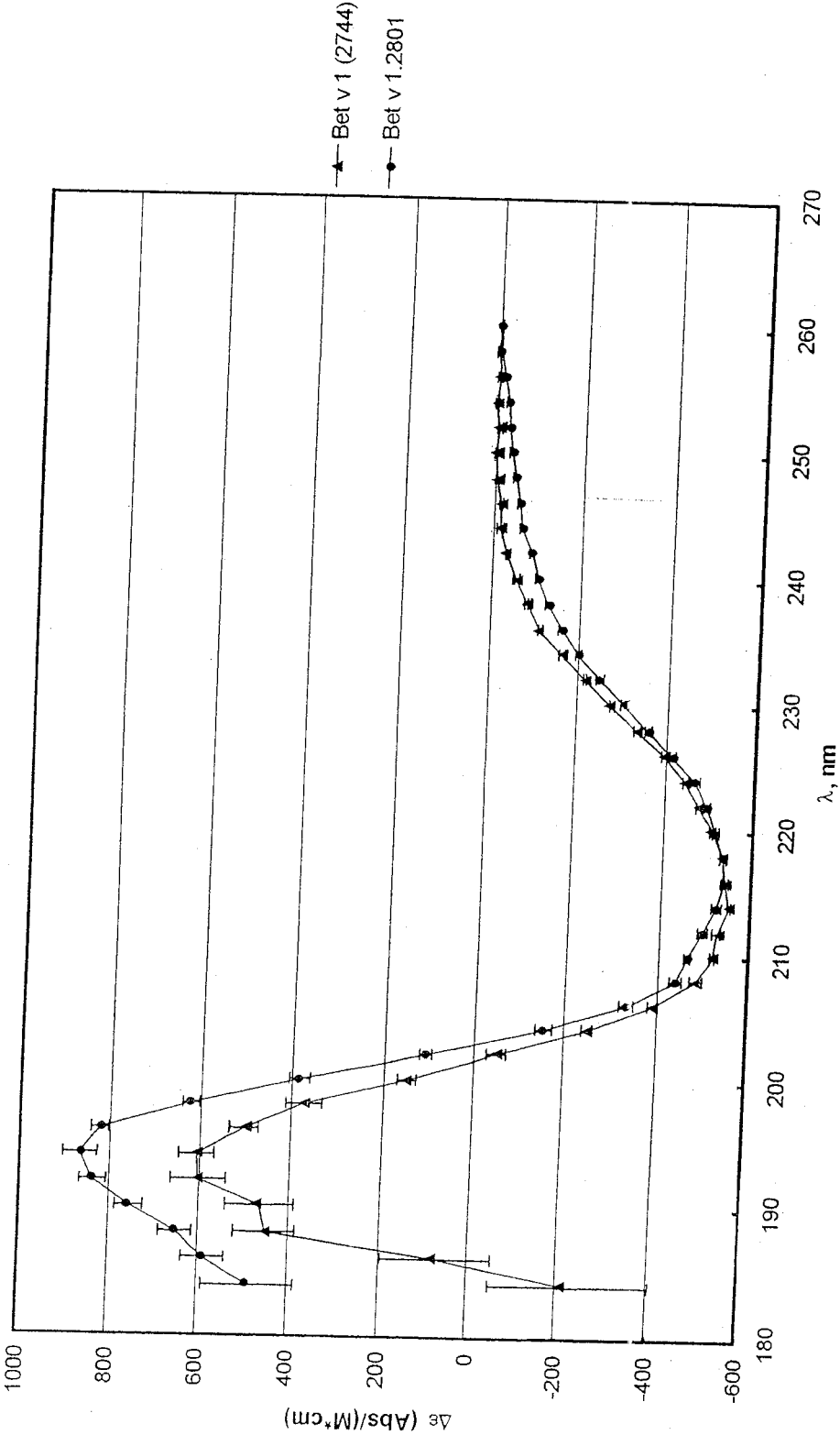


图 28

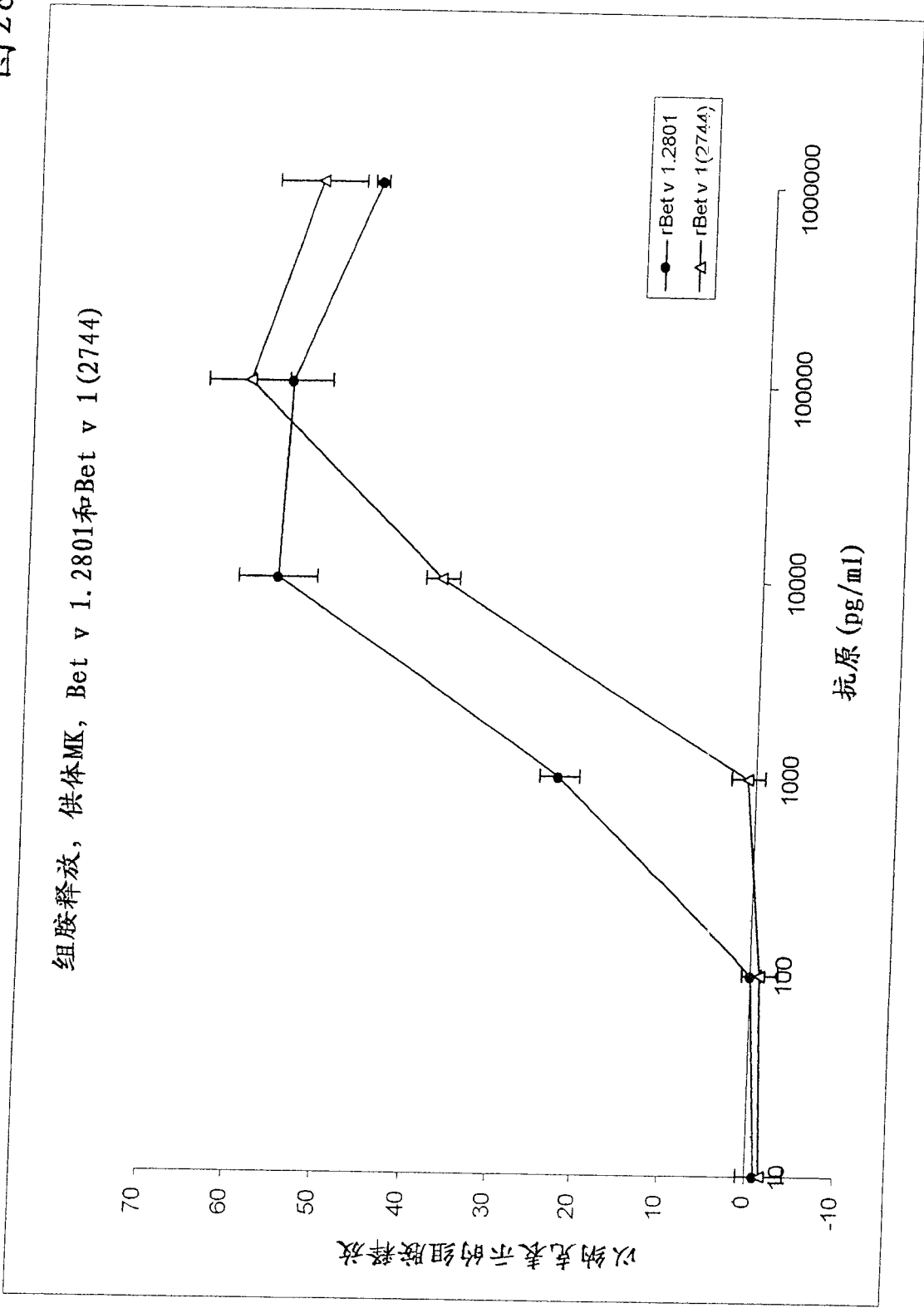


图 29A

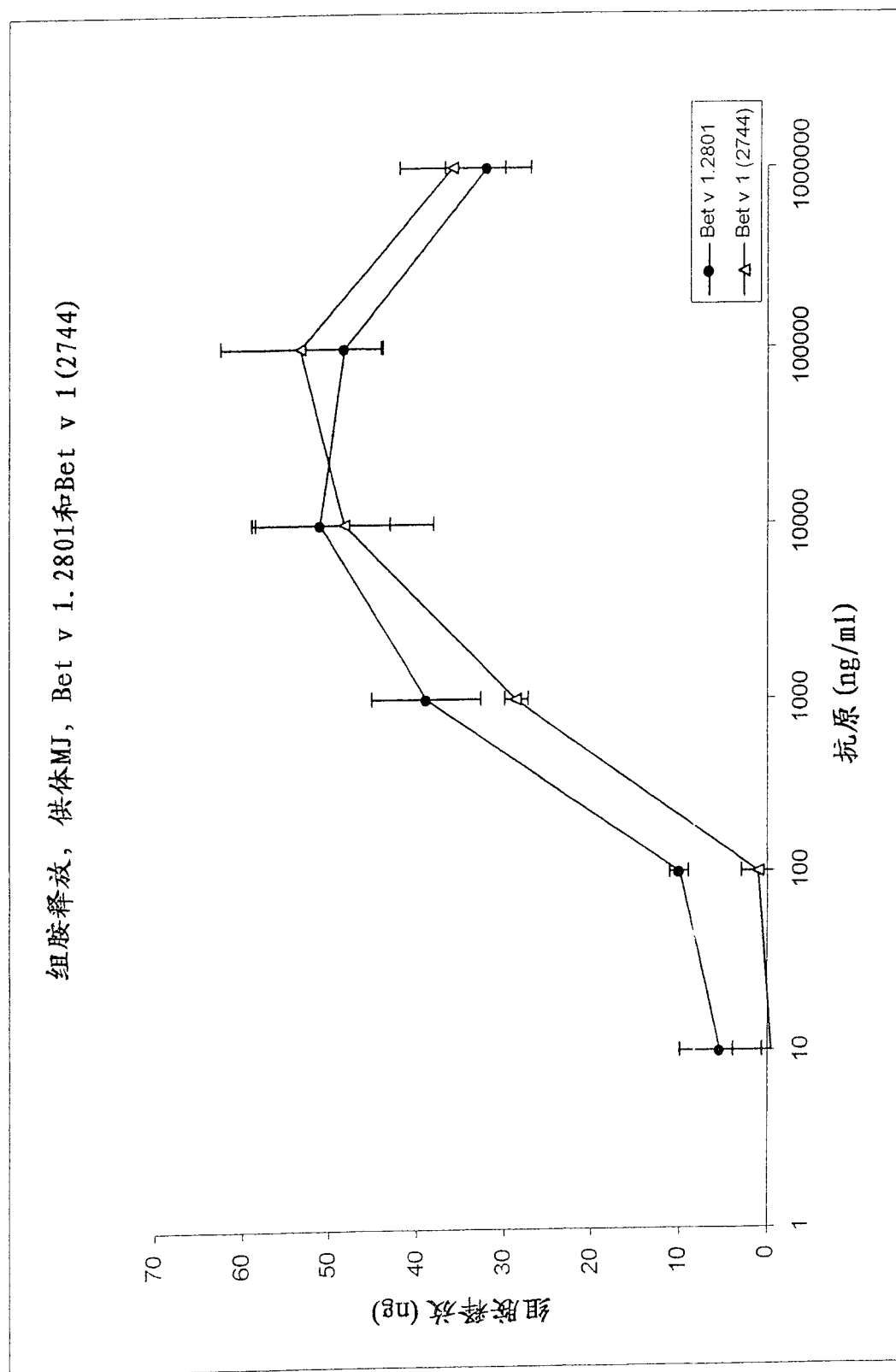


图 29B

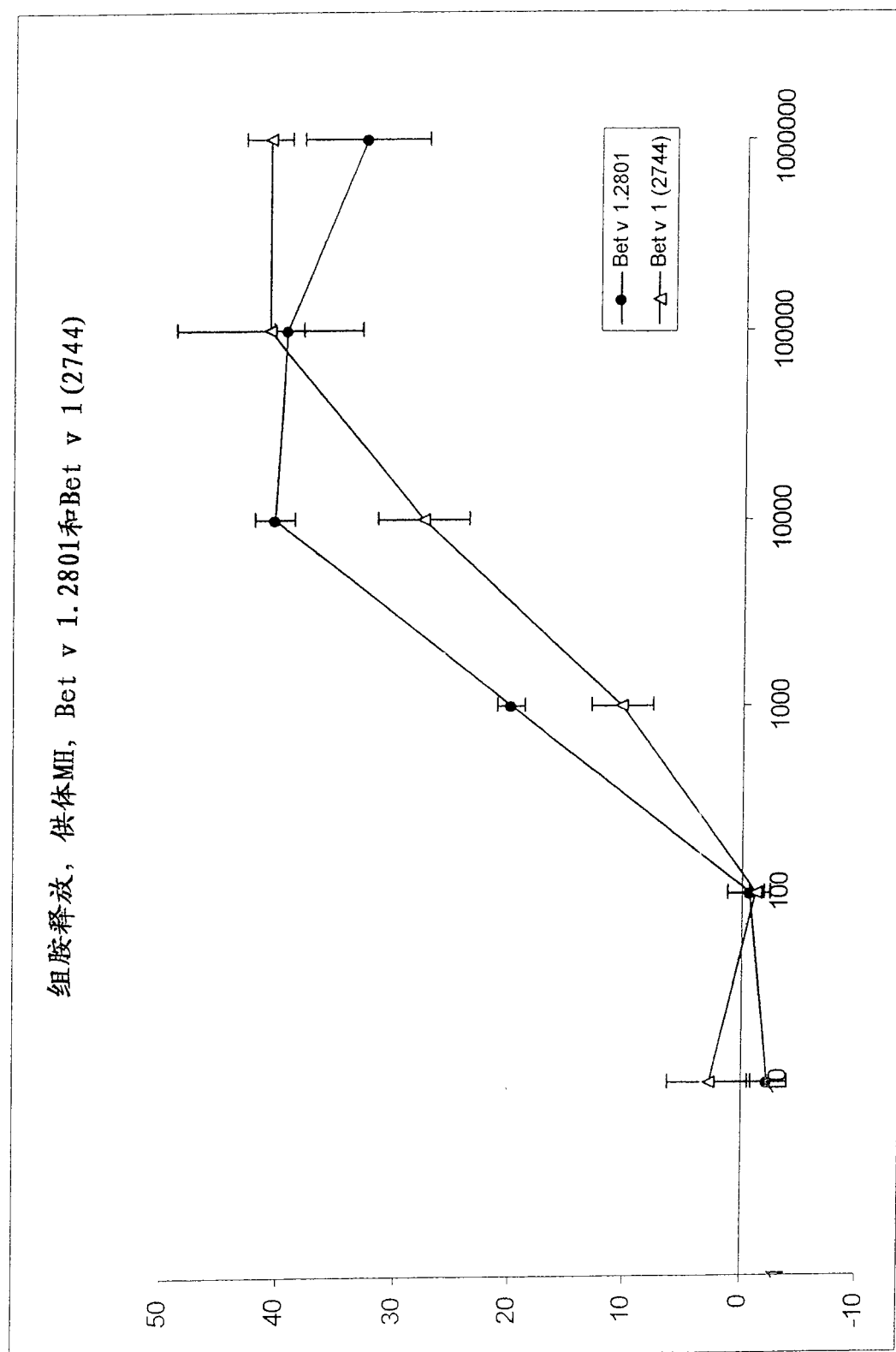


图 29C

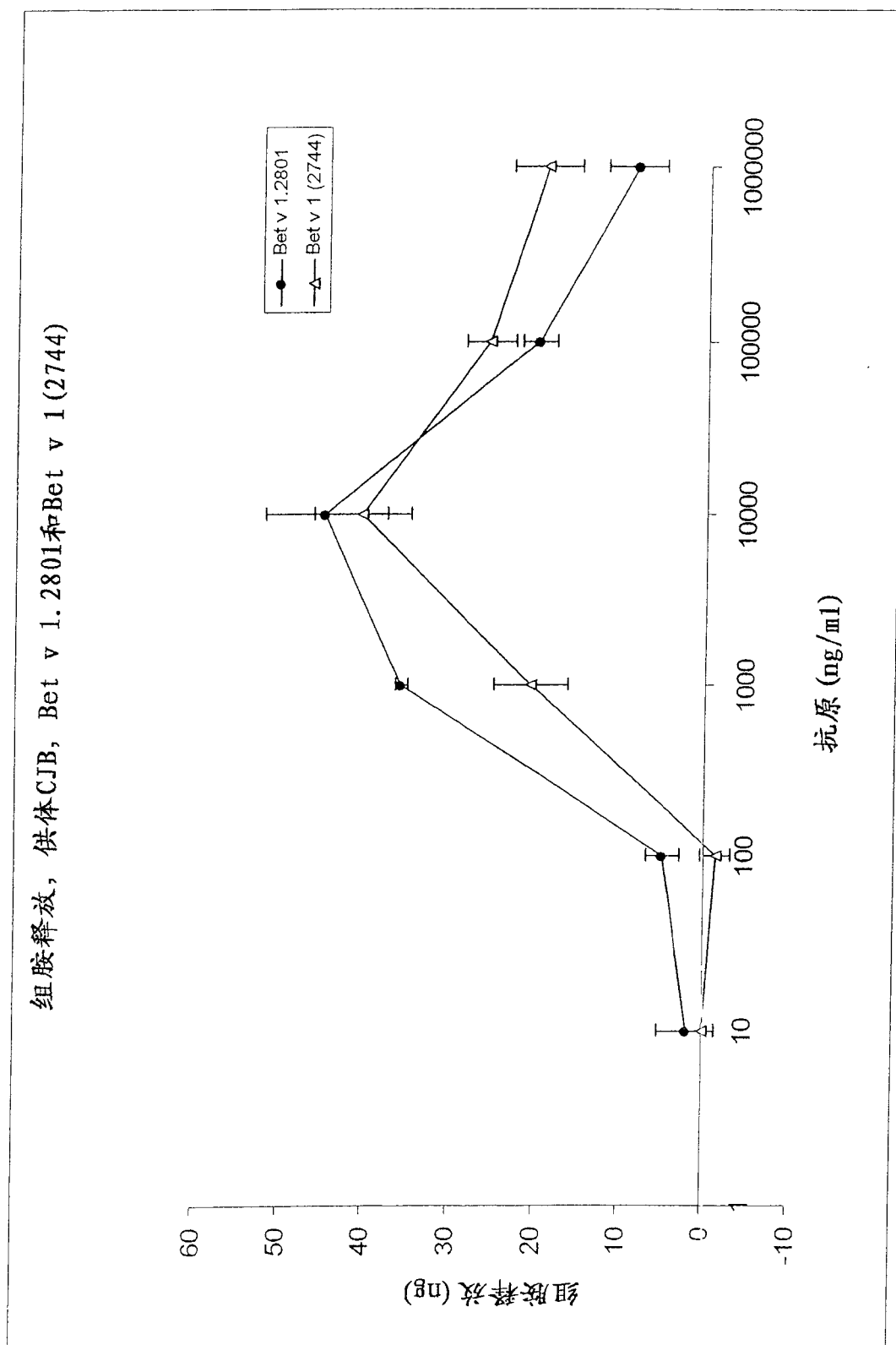


图 29D

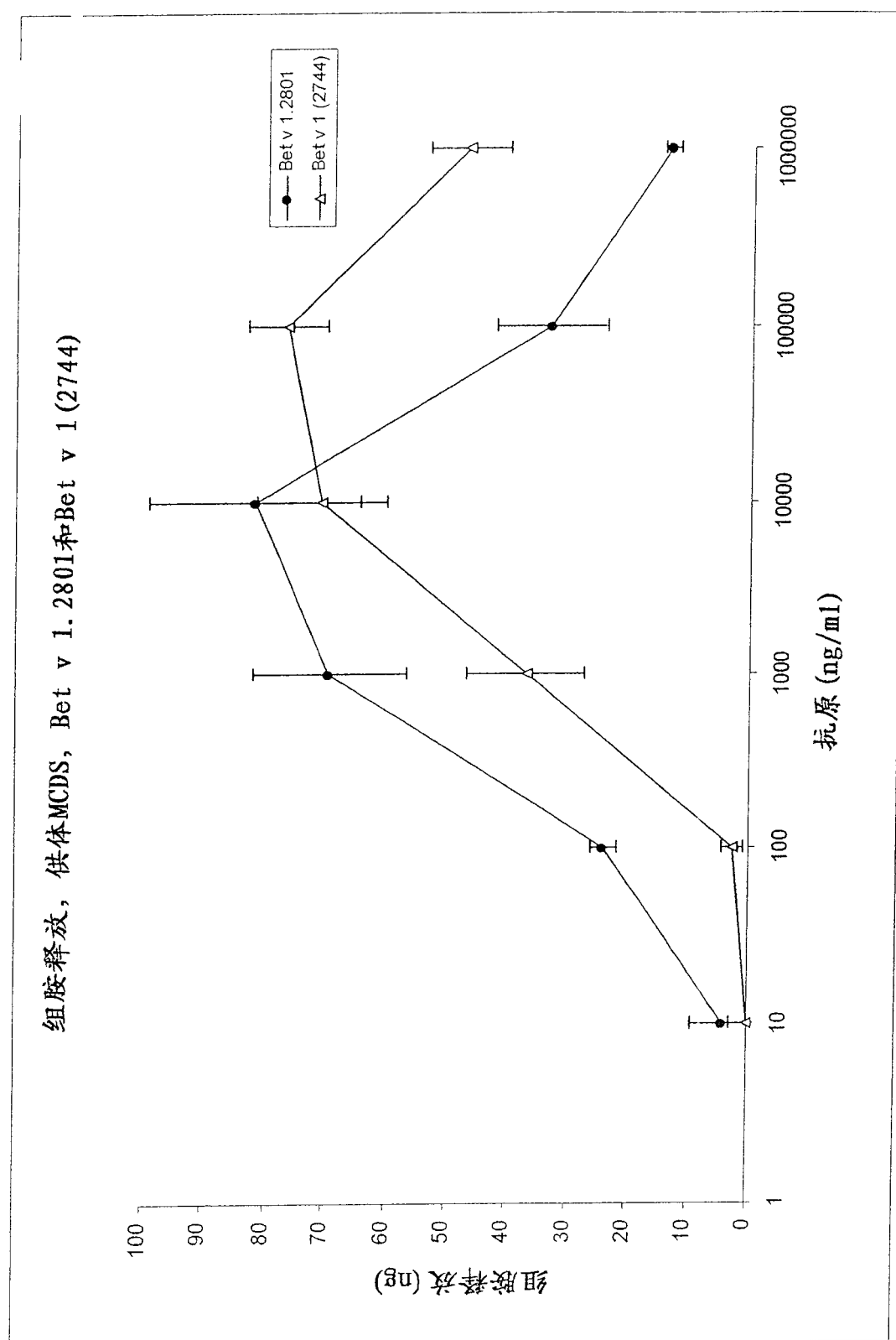
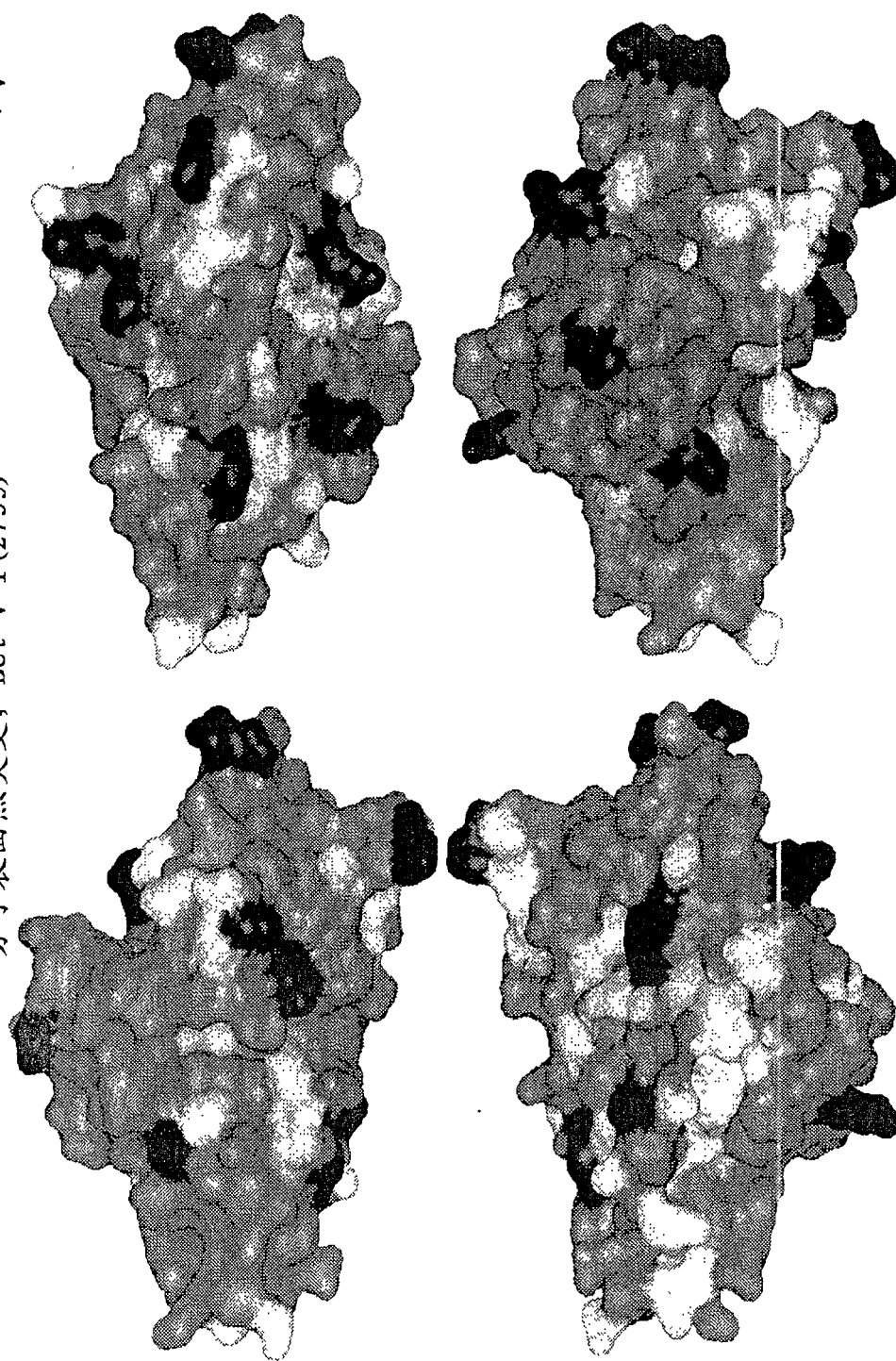


图30

分子表面点突变, Bet v 1 (2733)



灰: 主链+在Fagales中保守性95~100%的氨基酸

黑: 点突变: Y5V, N28T, K32Q, E45S, K65N, N78K, K97S, K103V, P108G, K134E, R145E, D156H, +160N

图 31

对Der p 2进行定点突变的寡核苷酸引物

K6A	有义	OB43	42-mer	5'-CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCGCCGATTGTGCC-3'	<i>Xho I</i>
	反义	OB28	39-mer	5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'	<i>Xba I</i>
K15E	有义	OB44	67-mer	5'-CCGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTGTGCC AACCATGAAATCAAGAAGTTTGG-3'	<i>Xho I</i>
	反义	OB28	39-mer	5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'	<i>Xba I</i>
H30N	有义	OB46	54-mer	5'-CGGGGTACCCAGGATGTCATGGTTCAGAACCATGTATCATTA CCGTGGTAAACC-3'	<i>Kpn I</i>
	反义	OB28	39-mer	5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'	<i>Xba I</i>
E62S	有义	OB47	33-mer	5'-GCCTCAATCGATGGTTTATCAGTTGATGTTCCCC-3'	
	反义	OB48	33-mer	5'-GGGAACATCAACTGTATAAACCATCGATTGAGGC-3'	
H74N	有义	OB49	32-mer	5'-CATGGCAATGCAATTACATGAAATGCCCATTTGG-3'	<i>Sph I</i>
	反义	OB28	39-mer	5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'	<i>Xba I</i>
K82N	有义	OB50	50-mer	5'-CTACGCATGCCATTACATGAAATGCCCATTTGGTTAATGGACAA CAATATG-3'	<i>Sph I</i>
	反义	OB28	39-mer	5'-CGTTCTAGACTATTAAATCGCGGATTTTAGCATGAGTTGC-3'	<i>Xba I</i>

图 32 (Der p 2)

图32(Der p 2) (续)

		40	50	60	70	80
1 DERP2-ALK-G Derp 2		RGKPFQLEALFEANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
2 DERP2 CDNA Derp 2		RGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
3 DERP2-ISO101 Derp 2		RGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
4 DERP2-ISO102 Derp 2		RGKPFQLEALFEANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
5 DERP2-ISO104 Derp 2		RGKPFQLEAVFEANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
6 DERP2-ISO113 Derp 2		RGKPFQLEAVFEANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
7 DERP2-ISO120 Derp 2		RGKPFQLEALFEANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
8 1A9V Derp 2	PDB	RGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPPGIDPNACHYMKCPL				
9 DEF2 DERFA Derf 2	Q00855	RGKPFPTLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDGLEIDVPPGIDTNACHFMKCPL				
10 B61241 Derf 2	B61241	RGKPFPTLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDGLEIDVPPGIDTNACHFMKCPL				
11 1AHK Derf 2	PDB	RGKPFPTLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDGLEIDVPPGIDTNACHFMKCPL				
12 A61501 Derf 2	A61501	RGKPFPTLEALFDANQNTKTAKTEIKASLDGLEIDVPPGIDTNACHFMKCPL				
13 Q96430 Eur m 2.0101 Q96430		RGTAFOLEAVFDANQNSNAAKIEIKATIDGVVEIDVPPGIDNNLCHFMKCPL				
14 Q91722 Eur m 2.0102 Q91722		RGTAFOLEAVFDANQNSNAAKIEIKATIDGVVEIDVPPGIDNNLCHFMKCPL				

图 32 (Der p 2) (续)

			90	100	110	120	
1 DERP2-ALK-G Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVLGDN	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
2 DERP2 CDNA Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDD	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
3 DERP2-ISO101 Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDD	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
4 DERP2-ISO102 Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDD	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
5 DERP2-ISO104 Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVIGDN	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
6 DERP2-ISO113 Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDD	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
7 DERP2-ISO120 Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDN	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
8 1A9V Derp2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDD	GVLA	CAI	ATHAKIRD			
9 DEF2 DERFA Derf2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKLIGDN	GVLA	CAI	ATHGKIRD			
10 B61241 Derf2	VKGQQYDAKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKLVGD	NGVLA	CAI	ATHAKIRD			
11 1A1K Derf2	VKGQQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKLIGDN	GVLA	CAI	ATHGKIRD			
12 A61501 Derf2	VKGQQYDAKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKLVGD	NGVLA	CAI	ATHAKIRD			
13 096430 Eurm 20101 096430	VKGQ EYDIKYTWNVPR IAPKSENVVVTVKL	LGDN	GVLA	CAI	ATHAKIRD		
14 091722 Eurm 20102 091722	VKGQ EYDIKYTWNVPR IAPKSENVVVTVKL	LGDN	GVLA	CAI	ATHAKIRD		

图 33: Der p 2

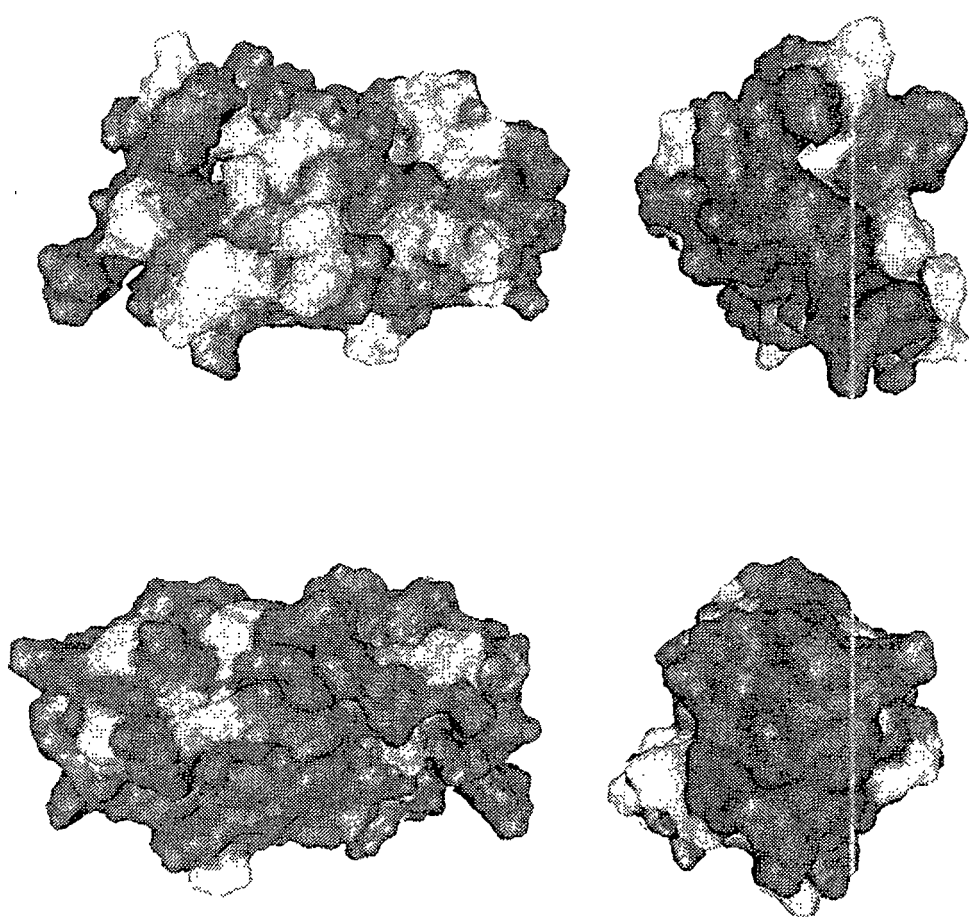


图34: Der p 2突变体

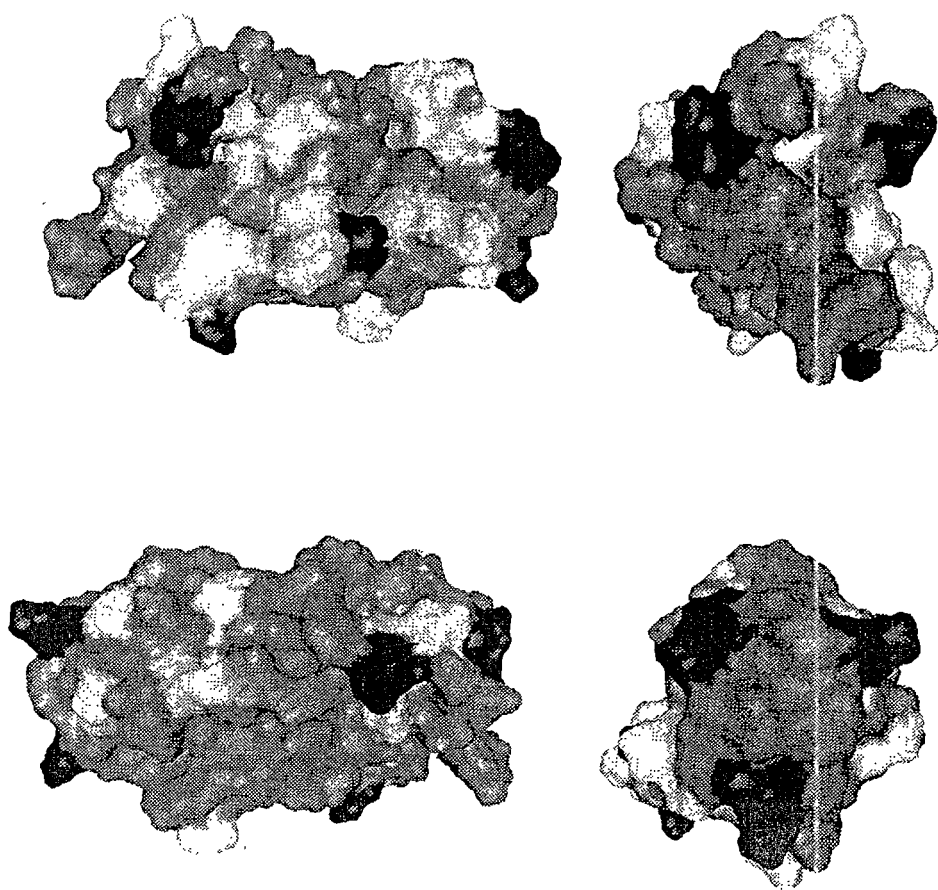


图 35A (Der p 1)

图35A (Der p 1) (续)

	40	30	20	10	1	10
Der p1 ALK						
sp1P08176NMAL DERT Der p1	KYVQSNKGAINHLS	DLSDLEFKNRFLMSAE	FEHLKTQFDLNAET	HACSH	GNAPAEID	
sp1Q9UE4Q9UE40	KYVESNKGAINHLS	DLSDLEFKNQFLMNA	FAEQ LKTQFDLNAET	YACSH	SVSLPSEID	
sp1Q9TZ3Q9TZ3			KNQFLMNAFAEQ	LKTQFDLNAET	YACSH	SVSLPSEID
sp1Q9TZ4Q9TZ4	KYVESNKGAINHLS	DLSDLEFKNQFLMNA	FAEQ LKTQFDLNAET	YACSH	SVSLPSEID	
sp1P1631NMAL DERT Der p1	KYVEANKGAINHLS	DLSDLEFKNRYLM	SAEFAEQ LKTQFDLNAET	SACRINS	SVNVPSEID	
sp1P2578QJEM1 EURMA Eur m1					TYACSH	SVSLPSEID
sp1AAG00520AAG00520 Der p1					SACRINS	SVNVPSEID

图 35A (Der p 1) (续)

	20	30	40	50	60	70
Der p1 ALK	L R Q H R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R N Q S I D L A E Q E L V D C A S Q H G C H G D T					
sqIP08176NMAL DERPT Der p1	L R Q H R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R N Q S I D L A E Q E L V D C A S Q H G C H G D T					
trf09UB9409UB40 Eur m1.0101	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A S T E S A Y L A Y R N M S I D L A E Q E L V D C A S Q N G C H G D T					
trf09TZ3109TZ3 Eur m1.0101	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A S T E S A Y L A Y R N M S I D L A E Q E L V D C A S Q N G C H G D T					
trf09TZ4109TZ4 Eur m1.0102	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A S T E S A Y L A Y R N M S I D L A E Q E L V D C A S Q N G C H G D T					
sqIP6311NMAL DERFA Der f1	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R N T S I D L S E Q E L V D C A S Q H G C H G D T					
sqIP25780EUM1 EURNA Eur m1	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A S T E S A Y L A Y R N M S I D L A E Q E L V D C A S Q N G C H G D T					
trfA4600520AAG0520 Der f1	L R S L R T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R N T S I D L S E Q E L V D C A S Q H G C H G D T					

图 35B (Der p 1)

	80	90	100	110	120	130
Der p 1 ALK						
sp P68176 MMAL_DERP1_Derp1	IPRGIEYIQHGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAREGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTH					
tr Q9UB94 Q9UB90	IPRGIEYIQHGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAREGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTH					
tr Q9TZ3 Q9TZ3	IPRGIEYIQHGVVQEHYYPYVAREQSCRRPNAREYGLKNYCOISPPDSNKKIRQALITQTH					
tr Q9TZ4 Q9TZ4	IPRGIEYIQHGVVQEHYYPYVAREQSCRRPNAREYGLKNYCOISPPDSNKKIRQALITQTH					
sp P68176 MMAL_DERP1_Derp1	IPRGIEYIQHGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAREYGLKNYCOISPPDSNKKIRQALITQTH					
sp P25780 EUM1_EURMA_Eurm1	IPRGIEYIQHGVVQEHYYPYVAREQSCRRPNAREYGLKNYCOISPPDSNKKIRQALITQTH					
tr AAG0520 AAG0520_Derp1	IPRGIEYIQHGVVQESYYPYVAREQSCRRPNAREYGLKNYCOISPPDSNKKIRQALITQTH					

图35B(Der p 1) (续)

	140	150	160	170	180	190
Derp1 ALK	S A I A V I I G I K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y S N A Q G V D Y W I V R N S W D T N					
spIP08176MMAL DERPT Derp1	S A I A V I I G I K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y S N A Q G V D Y W I V R N S W D T N					
hQ91B4Q1Q91B4Q Eurm1.0101	T A V A V I I G I K D L N A F R H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G N T Q G V D Y W I V R N S W D T T					
hQ91Z31Q91Z3 Eurm1.0101	T A V A V I I G I K D L N A F R H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G N T Q G V D Y W I V R N S W D T T					
hQ91Z41Q91Z4 Eurm1.0102	T A V A V I I G I K D L N A F R H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G N T Q G V D Y W I V R N S W D T T					
spIP16311MMAL DERFA Derf1	T A I A V I I G I K D L R A F Q H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G S T Q G D D Y W I V R N S W D T T					
spIP251601EUM1 EURMA Eurm1	T A V A V I I G I K D L N A F R H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G N T Q G V D Y W I V R N S W D T T					
hIPAA000521AA000520 Derf1	T A I A V I I G I K D L R A F Q H Y D G R T I I Q H D N G Y Q P H Y H A V N I V G Y G S T Q G V D Y W I V R N S W D T T					

图35B(Der p 1) (续)

		200	210	220
		.	.	.
Derp1ALK		WGDN	GYFA	ANIDL
		HNIE	EYPY	VVVL
splP08176NMAL_DERPT_Derp1		WGDN	GYFA	ANIDL
		HNIE	EYPY	VVVL
trQ9UB40Q9UB40	Eurm10101	WGDN	GYFA	ANINL
		HNIE	EYPY	VVVL
trQ9TZ31Q9TZ3	Eurm10101	WGDN	GYFA	ANINL
		HNIE	EYPY	VVVL
trQ9TZ41Q9TZ4	Eurm10102	WGDN	GYFA	ANINL
		HNIE	EYPY	VVVL
splP16311NMAL_DERFA_Derp1		WGDS	GYFQ	AGNNL
		HNIE	EYPY	VVVL
splP25781EUM1_EURMA_Eurm1		WGDN	GYFA	ANINL
		.	.	.
trIAAG005201AAG00520_Derp1		WGDS	GYFQ	AGNNL
		.	.	.

图36: Der p 1

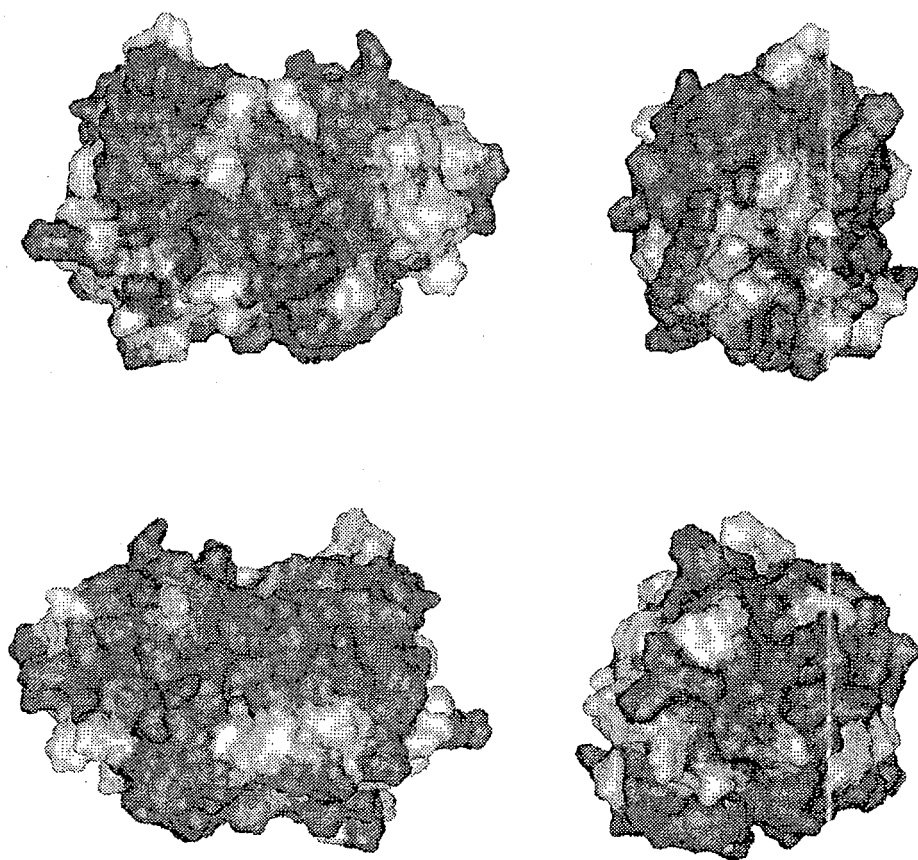


图37: Der p 1突变体

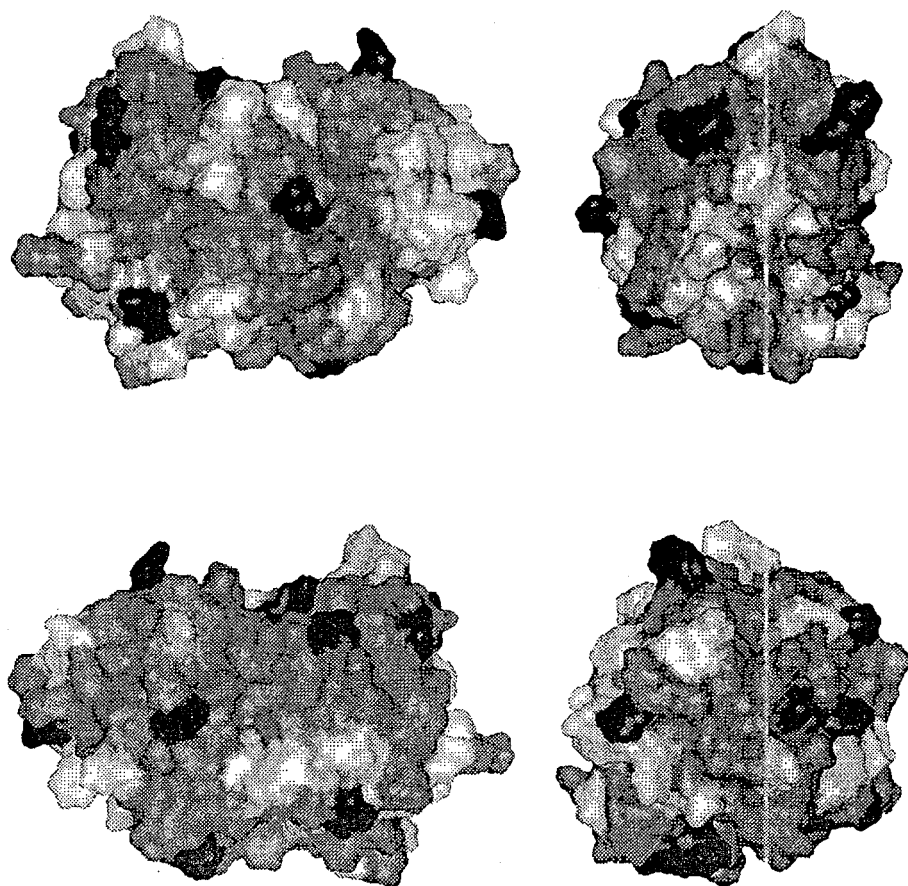


图 38A (Ph1 p 5)

图 38A (Ph1 p 5) (续)

			10	20	30	
tr 081341 081341	Phl p 5.0103		ATPAAPAAGYTPATPAAPAG		AEPAGKAT	
tr Q40960 Q40960	Phl p 5		ATPAAPAAGYTPATPAAPAE		AAPAGKAT	
sp Q40962 MP5A_PHLPR	Phl p 5 A		ATPAAPAAGYTPATPAAPAG		ADAAGKAT	
sp F22285 MP92_POAPR	Poa p 5 (KBG41)	PATLATPATPAAPAAGYTPAAPAG		AAP..	KAT	
sp F22286 MP93_POAPR	Poa p 5 (KBG60)	P.....	ATPAAPAAGYTPAAPAG		AAP..	KAT
tr 065319 065319	Phl p 5		GPATPAAPAE		AAPAGKAT	
tr 065320 065320	Phl p 5		GPATPAAPAE		AAPAGKAT	
tr 065321 065321	Phl p 5		GPATPAAPAE		AAPAGKAT	
tr 065318 065318	Phl p 5		GPATPAAPAE		AAPAGKAT	
tr P93467 P93467	Phl p 5		GPATPAAPAE		AAPAGKAT	
sp F22284 MP91_POAPR	Poa p 5 (KBG 31)	PPASKFPAKPAKVAAYTPAAPAG		AAP..	KAT	
sp Q40237 MP5B_LOLPR	Lol p 5B	.ATPATPAAPATAATPATPATPATP		AAVPSG	KAT	
tr Q9XF24 Q9XF24	Lol p 5A		YTPAAAATPATPAA	TP	AAAGGKAT	
tr Q9SC99 Q9SC99	Lol p 5C		YTPAAAATPATPAA	TP	AAAGGKAT	
tr 081343 081343	Phl p 5.0206		YAPATPAA	AG	AE	AGKAT
tr Q23972 Q23972	Hol I 5		YTPAAPAA	AG	A..	GGKAT
tr 081344 081344	Phl p 5.0207		YAPATPAA	AG	AE	AGKAT
tr AAG42255 AAG42255	Hol I 5B		YAPTTPAA	AG	AA	AGKITP
tr AAG42254 AAG42254	Poa p 5		YAPATPAA	AG	AA	AGKITP
tr 081342 081342	Phl p 5.0203		YAPATPAA	AG	AE	AGKAT
tr P93466 P93466	Phl p 5		YAPATPAA	AG	AE	AGKAT
sp Q40963 MP5B_PHLPR	Phl p 5B		YAPATPAA	AG	AA	AGKAT
tr Q9SBE0 Q9SBE0	Phl p 5.0204		YAPATPAA	AG	AE	AGKAT
tr Q23971 Q23971	Phl p 5.02					
sp P56166 MP53_PHAAG	Pha a 5.3		GTPPTPATP		AVPGAAAG	KAT
PHAAG	Pha a 5.1		TPPTPRTTP	...L	LP	PPRARDKA
tr Q04828 Q04828	Hor v 9		NINAPFPVFNRTTFIANAG		IE....	AE
tr Q39995 Q39995	Hor v 5 (30kDa)					

图 38A (Ph1 p 5) (续)

图 38B (Ph1 p 5)

图 38B (Ph1 p 5) (续)

40	50	60	70	80
TEEQKLI EKIN...	AGFKAALAAAAGVPPADKYRTFVATFG	AASNKAFAEGLSG		
TEEQKLI EKIN...	AGFKAALAAAAGVQPADKYRTFVATFG	AASNKAFAEGLSG		
TEEQKLI EKIN...	AGFKAALAGA.GVQPADKYRTFVATFG	PASNKAFAEGLSG		
TDEQKLI EKIN...	AGFKAAVAAAAGVPAVDKYKTFVATFG	TASNKAFAEALST		
TDEQKMI EKIN...	VGFKAAVAAAAGGVPAANKYKTFVATFG	AASNKAFAEALST		
TEEQKLI EKIN...	DGFKAALAAAAGVPPADKYKTFVATFG	AASNKAFAEGLSA		
TEEQKLI EKIN...	DGFKAALAAAAGVPPADKYKTFVATFG	AASNKAFAEGLSA		
TEEQKLI EKIN...	DGFKAALAAAAGVPPADKYKTFVATFG	AASNKAFAEGLSA		
TEEQKLI EKIN...	DGFKAALAAAAGVPPADKYKTFVATFG	AASNKAFAEGLSA		
TEEQKLI EKIN...	DGFKAALAAAAGVPPADKYKTFVATFG	AASNKAFAEGLSA		
TDEQKLI EKIN...	VGFKAAVAAAAGVPAASKYKTFVATFG	AASNKAFAEALST		
TEEQKLI EKIN...	AGFKAAVAAAAGVPPADKYKTFVETFG	TATNKAFAVEGLAS		
TDEQKLL EDVN...	AGFKAAVAAAANAPPADKFKIFEAA	SESSKGLLATS...		
TDEQKLL EDVN...	AGFKAAVAADANAPPADKFKIFEAA	SESSCKGLLATS...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
TDEQKLL EDVN...	AGFKTAVAAAANVPPADKYKTFEAA	TSSSKASIAAA...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
TQEQKLMEDIN...	VGFKAAVAAAAGAPPADKFKTFQAA	SSVEASAANKLN...		
TQEQKLMEDIN...	VGFKAAVAAAAGAPPADKFKTFQAA	SSVEASAANKLN...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
TEEQKLLIEDIN...	VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAA	TSSSKAATAK...		
...QKLL EDVN...	ASFKAAVAAAANKVPPADKYKTFEAA	TVLDRGSTEQSKA...		
THEQKLLIEDIN...	AAFK...WWPAS...APPADKYKTFEET...	AFSKANIAG...		
TLTSRSVEDIN...	AASRRPW...AS...VPPADKFKTFEADHVL	CVPNADVTS...		
LEPHFL LLLFTFSSSSSFTLLKTMIHFTDRSDN	NNKAMMRGREFRKATAEVLKG			
.....				

图 38B (Ph1 p 5) (续)

图 38C (Ph1 p 5)

					180	190	200
tr Q81341 Q81341	Phl p 5.0103				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
tr Q40960 Q40960	Phl p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
sp Q40962 MP5A_PHLPR	Phl p 5A				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D E I K A S T G G A		
sp P22265 MP92_POAPR	Poa p 5 (KBG41)				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
sp P22266 MP93_POAPR	Poa p 5 (KBG60)				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
tr Q65319 Q65319	Phl p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G A		
tr Q65320 Q65320	Phl p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G A		
tr Q65321 Q65321	Phl p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G A		
tr Q65318 Q65318	Phl p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G A		
tr P93467 P93467	Phl p 5				T A A N A A A A N D K F T V F E A A F N H A I K A S T G G A		
sp P22284 MP91_POAPR	Poa p 5 (KBG 31)				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G A		
sp Q40237 MP5B_LOLPR	Lol p 5B				T A A N A A P A N D K F T V F E N T F N N A I K V S L G A A		
tr Q9XF24 Q9XF24	Lol p 5A				T A A N A A P T H D K F T V F E S L F N K A L N E C T G G A		
tr Q9SC99 Q9SC99	Lol p 5C				T A A N A A P T H D K F T V F E S L F N K A L K E C T G G A		
tr Q81343 Q81343	Phl p 5.0206				T A A A T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q23972 Q23972	Hol 15				T A A N A A P V H D K F T V F E G L F N K A I K E S T G G A		
tr Q81344 Q81344	Phl p 5.0207				T A A A T A P A D . . . T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr AAG42255 AAG42255	Hol 15B				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K E S T G G A		
tr AAG42254 AAG42254	Poa p 5				T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K E S T G G A		
tr Q81342 Q81342	Phl p 5.0203				T A A A T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr P93466 P93466	Phl p 5				T A A A T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
sp Q40963 MP5B_PHLPR	Phl p 5B				T A A A T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q9SBE0 Q9SBE0	Phl p 5.0204				T A A A T A P A D D K F T V F E A A F N K A I K E S T G G A		
tr Q23971 Q23971	Phl p 5.02				T A A N A A P A N D K F T V F E T A F N K A L K E S T G G A		
sp P56186 MP53_PHAQ	Pha a 5.3	T V A T P L S H S			T A A N S A P A N D K F T V F E G A F N K A I K E R H G G P		
HAAQ	Pha a 5.1				T A A N S A P A N D K F T V F E G A F N K A I K E S T A G A		
tr Q04828 Q04828	Hor v 9				T A A D A A P A N D K F T V F E S L Q Q G P S R K P R G G A		
tr Q39995 Q39995	Hor v 5 (30x0a)				T A A D A A P A N D K F T V F E S L Q Q G P S R K P R G G A		

图 38D (Ph1 p 5)

210	220	230	240	250	260
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YQSYKFI PALEAA.	VKQSY AATVATAPAVKYTVFETAL	KKAITAMS	QAQKAAKPA		
YQSYKFI PALEAA.	VKQSY AATVATAPAVKYTVFETAL	KKAITAMS	QAQKAAKPA		
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAF	AMSE	AQKAAKPA	
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAT	SE	AQKAAKPA	
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQKAAKPA		
YQSYKFI PALEAA.	VKQSY AATVATAPAVKYTVFETAL	KKAITAMS	QAQKAAKPA		
YDSYKFIPTLVAA.	VKQAYAAKQATAPEVKYTVS	ETAL	KKAV	AMSE	AENEATPA
YETKFI PSLEAA.	VKQAY AATVA A APEVKYAVFE	AALT	TKAI	AMT	QAQKAGKPA
YETKFI PSLEAA.	VKQAYATTVA A APEVKYAVFE	AALT	TKAI	AMS	QAQKVAKPA
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YEAYKFI PSLETA.	VKQAY AATVATAPEVKYTVFETAL	KKAITAMSE	AQK	EAKPV	
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YDTYKSIP SLEAA.	VKQAY AATI A A APEVKFAVFE	KAALT	TKAI	AMAE	VQKVSQPV
YDTYKSIP SLEAA.	VKQAY AATI A A APEVKFAVFE	KAALT	TKAI	AMAE	VQKVSQPV
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YDTYKCIP SLEAA.	VKQAY AATVA A A P QVKYAVFE	AALT	TKAI	AMSE	VQKVSQPA
YESYKFI PSLEAA.	VKQAYASTVA A APEVKYAVFE	AALT	TKAI	AMS	QAQKVAQPA
TETKFI PSLEAA.	VKQAYGATVARAPEVKYAVFE	AGLT	TKAI	AMSE	AQKVAKPV
YETKFI PSLEAA.	VKQAYGATVARAPEVKYAVFE	AGLT	TKAI	AMSE	AQKVAKPP
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVA A APEVKFTVFQ	TALS	KAINAMT	QAGK	VAKPA
YESYKFI PALEAA.	VKQAY AATVA A APEVKFTVFQ	TALS	KAINAMT	QAGK	VAKPA

图 38D (Ph1 p 5) (续)

	280	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AAAGGYKTGAATPTAGGYKV.....	
.....	AAAGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AAAGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AATGGYKV.....	
.....	AAAGGYKV.....	
ATATPAAATATPAA	AGGYKV.....	
.....	AAAGGYKA.....	
.....	AAAGGYKA.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	AAAGGYKV.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	VSAGGYKV.....	
.....	VSAGGYKV.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	VAAGGYKV.....	
.....	TAAGGYKV.....	
.....	R...GGYKV.....	
.....	RVC RSHGT LQDA CLLR CRGGCQPVVWRGGSHRARGGYKV	
.....	TAGNYKV.....	
.....	TAGNYKV.....	

图39A: Ph1 p 5, 模式A

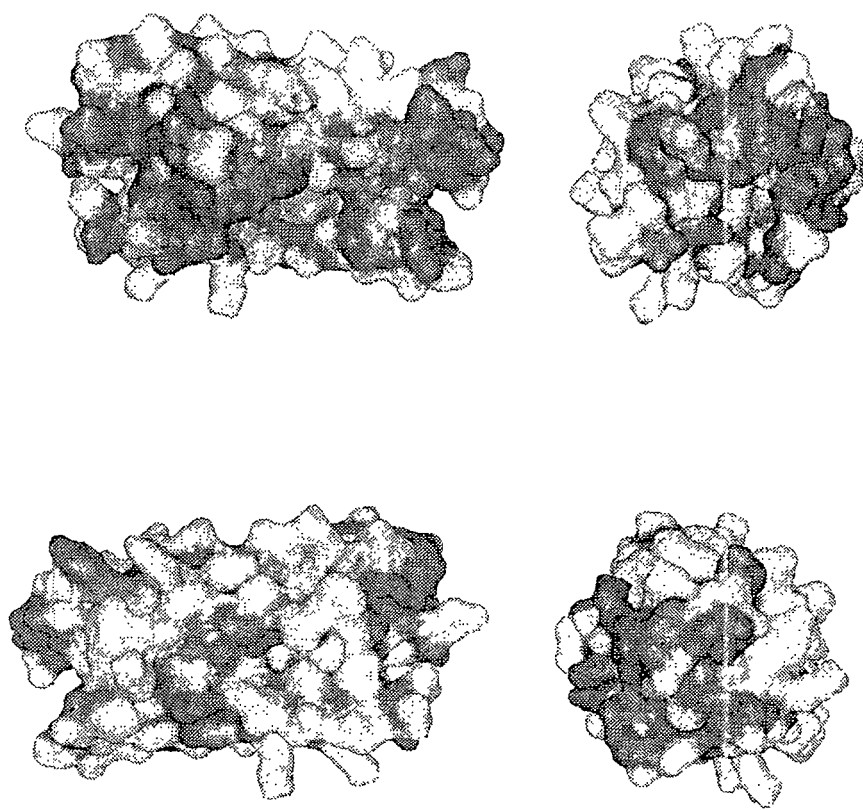


图 39B: Ph1 p 5, 模型B

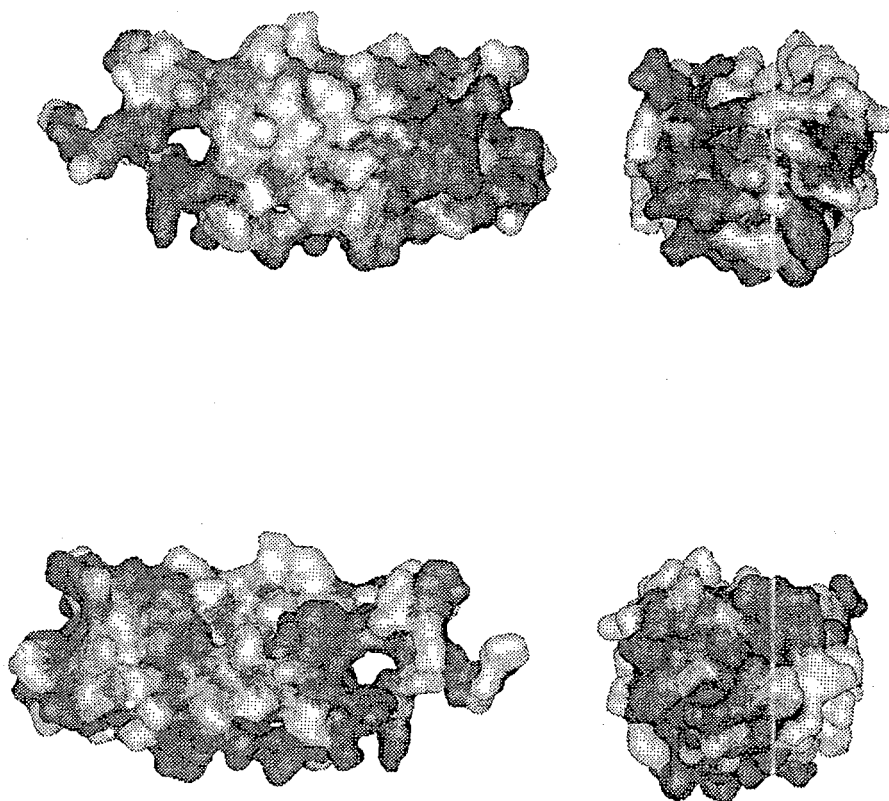


图40A: Ph1 p 5突变体, 模型A

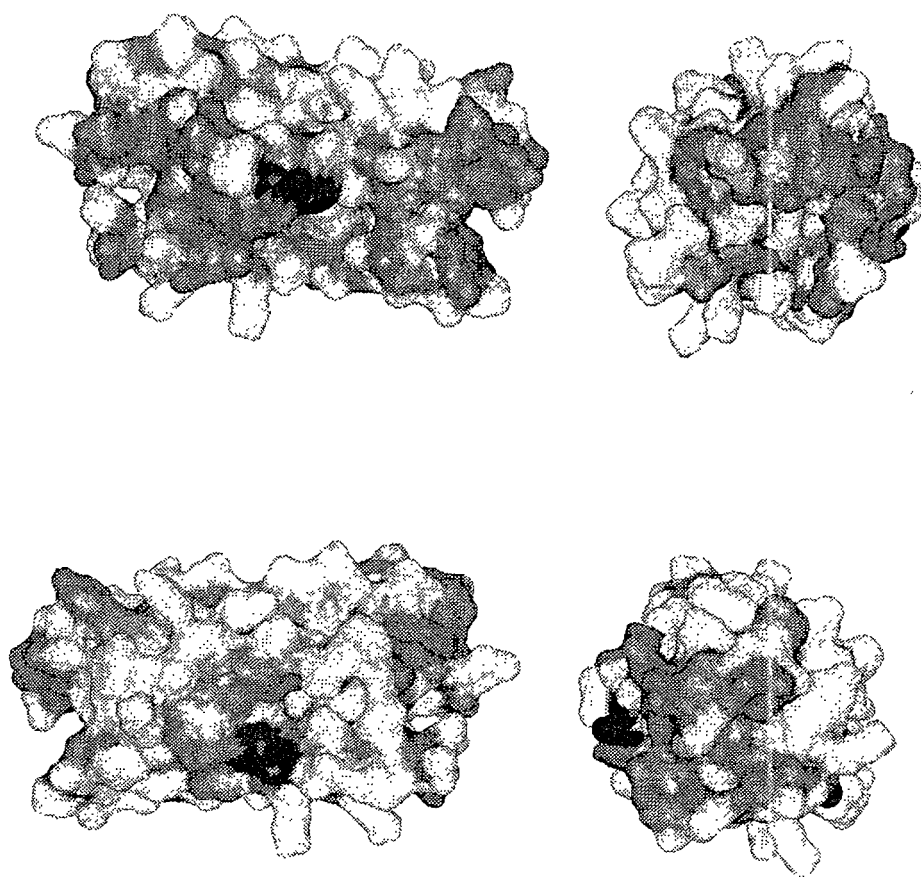


图40B: Ph1 p 5突变体, 模型B

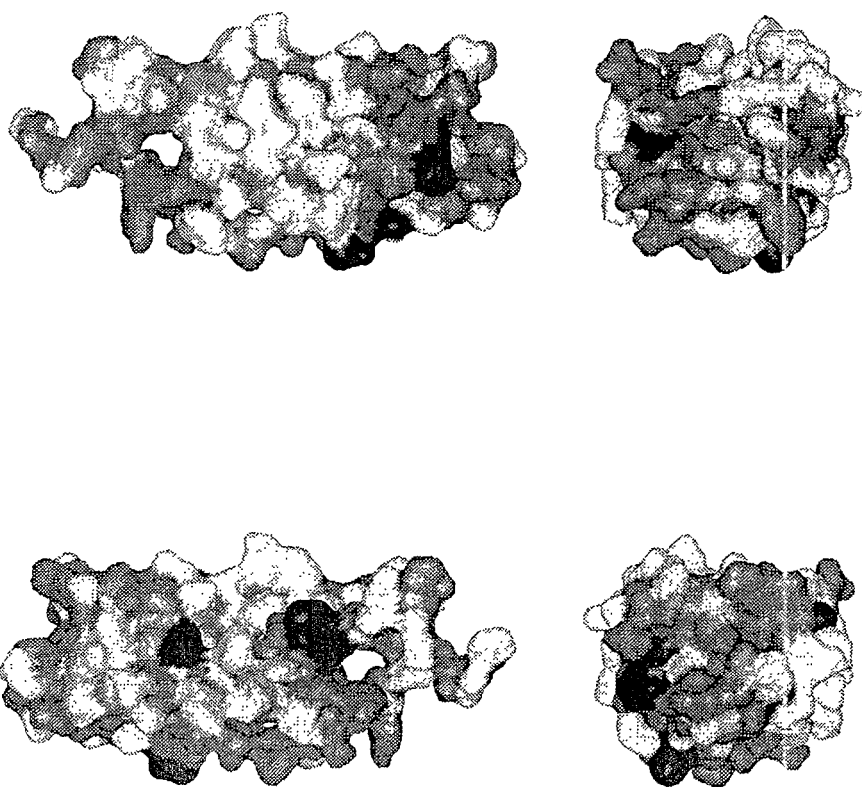


图41

患者PBL中Bet v 1-特异的增殖

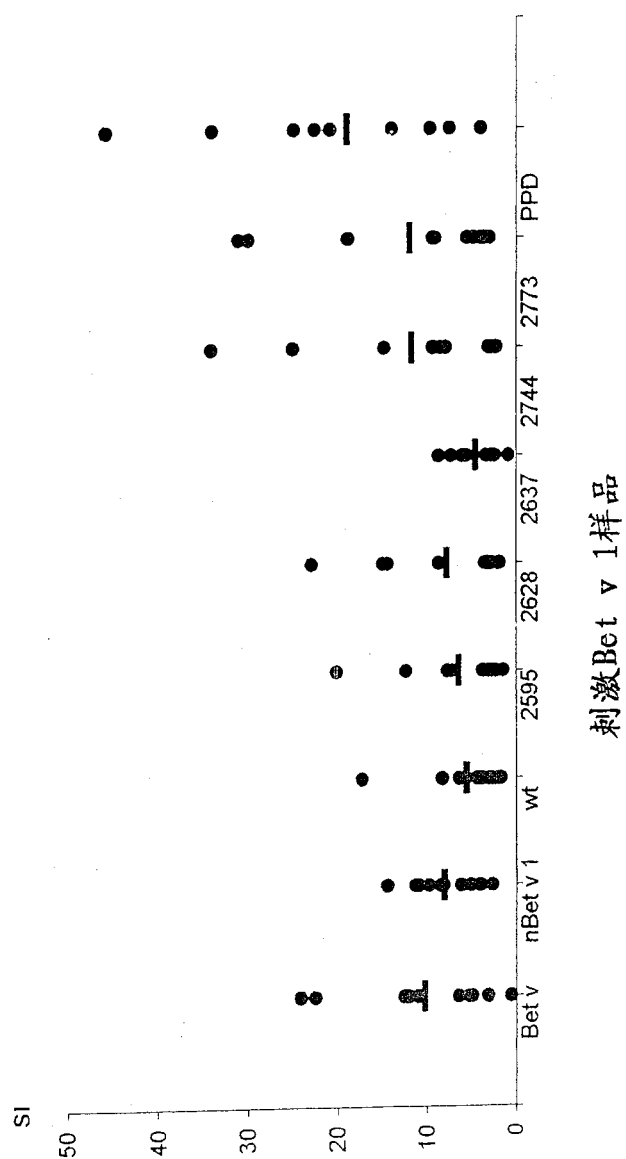


图 42

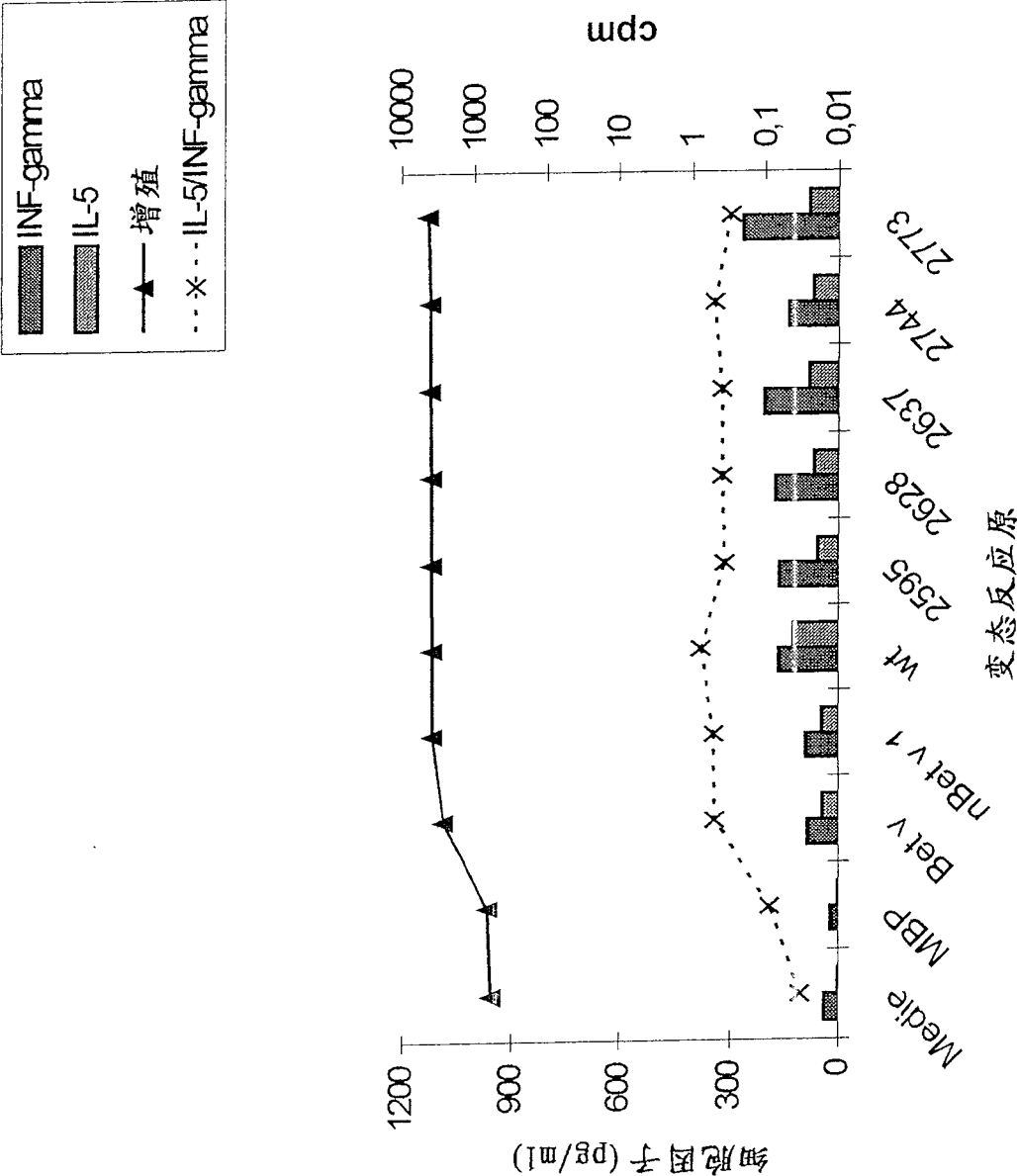


图43

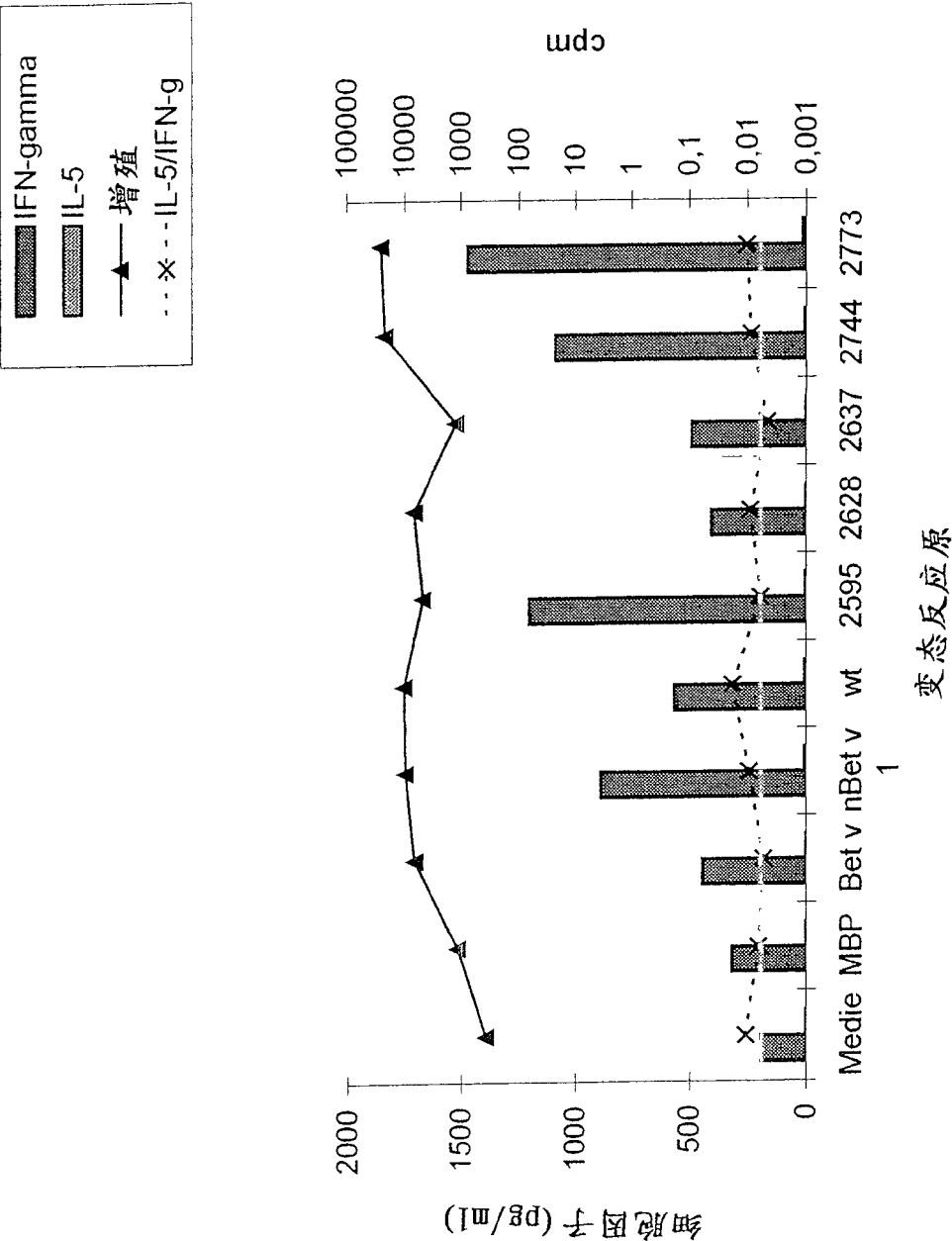
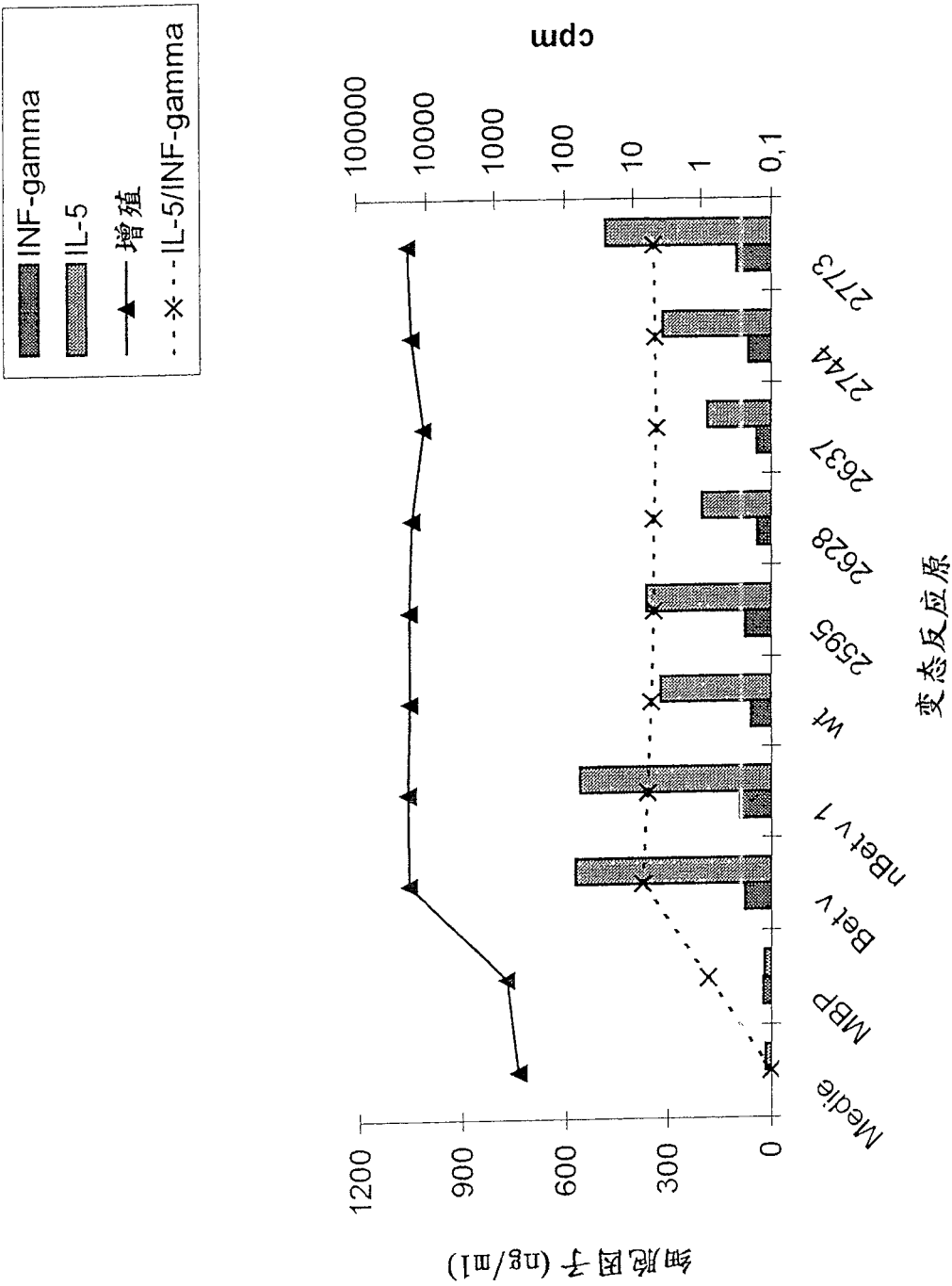


图 44



专利名称(译)	新型变态反应原突变体		
公开(公告)号	CN100577804C	公开(公告)日	2010-01-06
申请号	CN01820783.9	申请日	2001-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
[标]发明人	J·霍尔姆 H·伊普森 J·尼得加德拉尔森 M·D·斯潘格福特		
发明人	J·霍尔姆 H·伊普森 J·尼得加德拉尔森 M·D·斯潘格福特		
IPC分类号	C12N15/29 C12N15/12 C07K14/415 C07K14/435 A61K39/35 A61K39/36 C12N5/10 A61P37/08 G01N33/53 A61K38/095 A61K39/00 C07K14/00 C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/09 C12P21/02		
CPC分类号	A61K2039/57 C07K2299/00 C07K14/415 C07K14/43563 C07K14/43568 A61K38/00 C07K16/16 A61K39/00 C07K14/43572 A61P37/06 A61P37/08		
代理人(译)	唐伟杰		
审查员(译)	罗霄		
优先权	60/249361 2000-11-16 US 200001718 2000-11-16 DK 60/298170 2001-06-14 US		
其他公开文献	CN1484699A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	NO	AA	Solv_exp	Cons %
本发明公开了具有多重突变及减小的IgE结合亲和力的新型重组变态反应原。该变态反应原是天然变态反应原的非天然存在的突变体。总的 α -碳主链的三级结构基本保守。本文也公开了制备这种重组变态反应原的方法及其用途。	129K		1,000	90
	60E		0,986	97
	47N		0,979	100
	65K		0,978	100
	108P		0,929	100
	159N		0,869	100
	93D		0,866	100
	123K		0,855	100
	32K		0,855	100
	125D		0,821	74
	145R		0,801	90
	109D		0,778	82
	77T		0,775	56