

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/29

C07K 14/415 A61K 39/36

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806656.6

[43] 公开日 2002 年 5 月 29 日

[11] 公开号 CN 1351664A

[22] 申请日 2000.4.12 [21] 申请号 00806656.6
[30] 优先权
[32] 1999.4.23 [33] DE [31] 19918682.0
[86] 国际申请 PCT/EP00/03259 2000.4.12
[87] 国际公布 WO00/65060 德 2000.11.2
[85] 进入国家阶段日期 2001.10.23
[71] 申请人 默克专利股份公司
地址 德国达姆施塔特
共同申请人 阿恩德·彼得森
[72] 发明人 阿恩德·彼得森 R·苏克 H·菲比格
O·克罗姆维尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗宏 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 一种禾本科植物过敏原的 DNA 序列和重组生产的方法

[57] 摘要

本发明描述鉴别和确定一种草类过敏原的特点,以及描述编码该过敏原的重组 DNA 分子和相应的 DNA 和肽序列。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种重组 DNA 分子, 该 DNA 分子含有一种编码用作过敏原的多肽的核苷酸序列, 优选地由禾本科(禾本科)和单子叶植物表达。
2. 一种根据权利要求 1 所述的 DNA 分子, 该 DNA 分子具有来源于梯牧草的核苷酸序列。
3. 一种根据权利要求 2 如图 1 所示的核苷酸序列。
4. 一种含有如下核苷酸序列的 DNA 分子, 所述的核苷酸序列能与权利要求 3 中描述的核苷酸序列杂交。
5. 出现在权利要求 3 或权利要求 4 中所述的核苷酸序列的部分序列和部分序列的组合。
6. 一种含有权利要求 1-4 所述的核苷酸序列的 DNA 分子, 该 DNA 分子可通过单个密码子的特异突变和消除或添加而修饰。
7. 一种根据权利要求 3 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段。
8. 一种根据权利要求 4 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段。
9. 一种根据权利要求 5 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段。
10. 一种根据权利要求 6 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段。
11. 一种重组 DNA 表达载体或克隆体系, 该载体或体系由在权利要求 1-4 中描述的重组 DNA 分子组成, 它与一种表达控制序列有功能地相连接。
12. 一种根据权利要求 3 所述的核酸编码的多肽。
13. 一种根据权利要求 4 所述的核酸编码的多肽。
14. 一种根据权利要求 5 所述的核酸编码的多肽。
15. 一种根据权利要求 6 所述的核酸编码的多肽。
16. 一种根据权利要求 7 所述的核酸编码的多肽。
17. 一种根据权利要求 8 所述的核酸编码的多肽。
18. 一种根据权利要求 9 所述的核酸编码的多肽。
19. 一种根据权利要求 10 所述的核酸编码的多肽。
20. 一种生产多肽、片段或其衍生物的方法, 该方法培养已被权

利要求 11 的表达载体转化的原核或真核细胞，然后从培养物中分离相应的蛋白或多肽。

21. 一种使用根据权利要求 12—14 所述的多肽，体内或体外诊断花粉变态反应的方法。

5 22. 一种药制备物，该制备物包括根据权利要求 12-19 所述的多肽、片段或衍生物，用于治疗患花粉变态反应的人类或动物。

23. 一种使用根据权利要求 22 中描述的药制备物，治疗患花粉变态反应的人类或动物的方法。

10 24. 一种通过使用根据权利要求 11 中描述的构建体 DNA 免疫接种治疗花粉变态反应的方法。

25. 一种通过使用根据权利要求 11 中描述的含有免疫刺激 DNA 片段的构建体 DNA 免疫接种治疗花粉变态反应的方法。

说明书

一种禾本科植物过敏原的 DNA 序列和重组生产的方法

5 本发明涉及鉴别和确定一种草类花粉过敏原的特点，以及编码该过敏原的重组 DNA 分子。梯牧草 (*Phleum pratense*) 的花粉被用作天然的原材料。本发明也包括片段、部分序列和突变体。该重组 DNA 分子和衍生的多肽、片段和变体可用于治疗花粉变态反应疾病。而且，通过重组方法产生的蛋白和片段可用于诊断花粉过敏原。

10 1 型变态反应具有世界范围的重要性。在工业化国家，高达 20% 的人群遭受诸如过敏性鼻炎，结膜炎或支气管哮喘的困扰。这些变态反应通过空气中存在的过敏原（空气过敏原）引起，这些过敏原由例如植物花粉、螨、猫或狗等各种来源释放。在草类花粉的病例中，高达 40% 的 1 型变态反应表现为特异性 IgE 反应性 (Friedhoff et al., 1986, 临床变态反应免疫学杂志 78, 1190-201)。

激发 1 型变态反应的物质是蛋白、糖蛋白或多肽。经粘膜吸收后，这些过敏原与致敏人群的结合在肥大细胞表面的 IgE 分子反应。如果 2 个 IgE 分子经过 1 个过敏原彼此连接，就导致效应细胞的介导分子（例如组胺、前列腺素）和细胞因子的释放，然后引起相应的临床症状。

20 根据具有抗一些过敏原的 IgE 抗体的变态反应患者的相对发生率，可以看出主要过敏原和次要过敏原的差别。在梯牧草的病例中，迄今为止，Phl p 1 (Petersen et al., 1993, 临床变态反应免疫学杂志 92, 789-796), Phl p 5 (Matthiesen and Löwenstein, 1991, 临床实验变态反应 21, 297-307; Petersen et al., 1992), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54) 和 Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304) 被描述为主要过敏原，而 Phl p 4 (Löwenstein et al., 1978, 变态反应进展 25, 1-62) 以及来自黑麦草 (*Lolium perenne*) 的 10 和 11 组 (Ansari et al., 临床变态反应免疫学杂志, 80, 229-235) 为次要过敏原。

30 关于本发明，Phl p 4 过敏原尤为重要，这是因为它具有与新抗原相似的分子量，大约 55 kDa (Fischer et al., 1996, 临床变态反应免疫学杂志 98 (1), 189-98)，因而最可与按照本发明产生的抗原相

比较，但在免疫学和生物化学方面明显不同。与上述提到的其他过敏原相反，唯独 Phl p 4 的基因或转录 (cDNA) 序列至今未被鉴定。对 Phl p 1 (Laffer et al., 1994, 临床变态反应免疫学杂志 94, 1190-98; Petersen et al., 1995, 临床变态反应免疫学杂志 95 (5), 987-994),
5 Phl p 5 (Vrtala et al., 1993, 免疫学杂志 151 (9), 4773-4781), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108 (1), 55-59) 和 Phl p 2 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304) 来说，其序列资料已经得到。求助于 cDNA 序列，有可能产生用于诊断和治疗的重组过敏原 (Scheiner and Kraft, 1995, 变态
10 反应 50, 384-391)。

对变态反应有效治疗的经典方法是特异免疫治疗和脱敏治疗 (Fiebig, 1995, 变态反应杂志 4 (6), 336-339, Bousquet et al., 1998, 临床变态反应免疫学杂志 102 (4), 558-562)。在这些方法中，把天然过敏原提取物以逐步增加剂量的方式给病人皮下注射。不过，
15 该方法必须承受变态反应甚至过敏性休克的风险。为了把这些风险降低到最小程度，现在采用以类变应原形式的新颖制备物。与未处理过的提取物相比，这些化学修饰的过敏原提取物，明显地降低 IgE 反应性，而具有一致的 T 细胞反应性 (Fiebig, 1995, 变态反应杂志 4 (7), 377-382)。

20 通过重组方法产生的过敏原，有可能更大程度地优化治疗方法。通过重组方法产生高纯度的过敏原的特定合剂，如果需要与各个病人相匹配，可以代替来源于天然过敏原的提取物，因为除了各种过敏原外，后者还含有相对大量的免疫原性但不伴有过敏原性的蛋白。用表达产物获得安全脱敏疗法的真实前景，可通过特异突变重组过敏原实
25 现，在这些过敏原中，IgE 表位被特异缺失，而不损坏治疗所须的 T 细胞表位 (Schramm et al., 1999, 免疫学杂志 162, 2406-2414)。

通过治疗方法影响过敏患者中扰乱的 Th 细胞平衡的另一个可能是，用编码相关过敏原的可表达 DNA 治疗。给啮齿类注射编码过敏原的 DNA，已经得到了对过敏原特异的免疫应答的初步实验证据 (Hsu et
30 al., 1996, 自然医学 2 (5), 540-544)。

本发明优先地用于体内和体外诊断变态反应疾病，特别是花粉病。为实现本目的，克隆的核酸被连接到一种表达载体中，然后该构建体

在一种合适的细胞类型中表达。经过生化纯化后，制备了该重组过敏原，用于已经建立的方法检测 IgE 抗体。另一方面，本发明也用作特异免疫治疗中，含重组过敏原或含核酸的制备物的基本组分。在此方面的应用中，存在多种可能性。首先，拥有未修饰一级结构的蛋白可以是该制备物的一种成分。其次，通过特异缺失整个分子的 IgE 表位或者产生编码 T 细胞表位的各个片段，可按照本发明把低变应原性（类变应原）形式用于治疗，以避免非所需的副作用。最后，通过核酸本身，如果它与真核表达载体连接，可以产生一种制备物，当直接使用时，从治疗意义上说该制备物能修饰过敏原性免疫状态。

10 本发明描述一种重组的 DNA 分子，该 DNA 分子由（图 1）的核酸序列组成，编码一种过敏原。禾本科的花粉粒，例如特别是梯牧草、黑麦草、鸭茅（*Dactylis glomerata*）、草地早熟禾（*Poa pratensis*）、狗牙草（*Cynodon dactylon*）、绒毛草（*Holcus lanatus*）的花粉粒用作天然的原材料。

15 分离和纯化所述的天然过敏原后，进行 N 末端的蛋白测序。依据从蛋白推导的核酸序列，产生引物。用该引物，通过 PCR、克隆并确定特性，从花粉的 cDNA 库中获得相应的 cDNA。根据本发明，从编码过敏原的该 DNA 分子中产生片段和部分序列。

20 通过合适的表达载体，在细胞体系中表达该重组 DNA 分子或其片段和部分序列后，纯化该过敏原或其低变应原性的变体或片段。

用二步方法，从梯牧草花粉中纯化天然过敏原。将花粉经水相提取后，通过疏水相互作用层析法，把得到的提取物分为 2 个级分，过层析柱的级分和洗脱液。过层析柱的级分含有 3 个过敏原，Ph1 p1（30-35 kDa），Ph1 p2/3（11-14 kDa）和一种未知的过敏原（55-60 kDa）。这些蛋白可从另一种用 Superdex 75 的凝胶过滤法中分离出来。

25 至此，该未知过敏原（工作名为 p55）通过 SDS-PAGE 法分离出来，接着印迹到 PVDF 膜上，分离得到精制的级分。经 Edman 降解法测定该 p55 分子的 N 末端的氨基酸序列。

30 为了产生和克隆 p55 相对应的 cDNA，按照本发明构建了一条基于该 N 末端序列（图 3）的特异 DNA 引物（21 mer）。第 2 条所用的引物是一种锚定序列，该序列定位在用于反转录寡-dT 引物中。用来自梯牧草花粉的代表性 mRNA 群体产生的 cDNA 和按照本发明的引物以及所述

的锚定引物，在严格条件下进行 PCR 反应。在 PCR 反应物的分析性凝胶电泳中，鉴别出了一条大小为 1.65 kb 的扩增 DNA。把该扩增的 DNA 连接到 pCR2.1 载体中，并成功地转化。对 2 个不同克隆插入片段的测序得到一致的序列。

5 在这种初始扩增的 DNA 中，鉴别出了 1 个 1492 bp 的可读框 (ORF) (见图 1)。

为了从所述的核酸中产生相应的重组蛋白 (图 4)，首先用限制性内切酶把 pCR2.1 载体重新克隆到表达载体 pProEx Htb 中。该表达产物表达并经生化纯化后，对该产生的具有过敏原性质的蛋白进行了多种分析。在所有的分析中，例如蛋白印迹法和点印迹法，重组蛋白与来自被诊断为草类花粉变态反应临床症状的病人的 IgE 特异地反应。所用的对照蛋白是天然的 p55。因此，该重组蛋白显然是一种过敏原。这样，本表达产物被用于对草类花粉变态反应患者的高度特异改进的诊断方法中。

15 为了产生低变应原性变体以改进治疗用途，按照本发明从克隆到表达载体中的核酸开发了确定片段和部分序列的组合。此外，导入了特异定点突变，优选地在编码半胱氨酸的三联体中导入。因此，本发明的这部分内容与开发用于诊断目的的本发明内容不同点，在于降低或缺乏 IgE 反应性。这样，由于减低 (lacuna) 而明显低或没有副作用的制备物，可用于脱敏治疗。如果编码低变应原性蛋白变体的核酸或编码 p55 的未修饰核酸与一种人表达载体相连接，这些构建体同样能用作特异免疫治疗的制备物。

因此，本发明的内容是：

- 25 a) 一种重组 DNA 分子，该 DNA 分子含有一种编码作为过敏原的多肽的核苷酸序列，优选地由禾本科 (Gramineae) (禾本科 (Poaceae)) 和单子叶植物表达；
- b) 一种所示的具有来源于梯牧草核苷酸序列的 DNA 分子；
- c) 一种如图 1 所示的 DNA 分子的核苷酸序列；
- 30 d) 一种含有如下核苷酸序列的 DNA 分子，所述的核苷酸序列能与上面提到的图 1 中描述的核苷酸序列杂交；
- e) 按照 c) 或 d) 项所述的核苷酸序列的部分序列和部分序列的组

合;

f) 一种含有如 a) -d) 所述的核苷酸序列的 DNA 分子, 该 DNA 分子可通过单个密码子的特异突变和消除或添加而修饰;

g) 一种按照 c) 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段;

h) 一种按照 d) 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段;

i) 一种按照 e) 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段;

j) 一种按照 f) 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列编码一种免疫调节 T 细胞反应片段;

k) 一种重组 DNA 表达载体或克隆体系, 该载体或体系包括在 a) -d) 中描述重组 DNA 分子, 它与一种表达控制序列有功能地相连接;

l) 一种由按照 c) 所述的核酸编码的多肽;

m) 一种由按照 d) 所述的核酸编码的多肽;

n) 一种由按照 e) 所述的核酸编码的多肽;

o) 一种由按照 f) 所述的核酸编码的多肽;

p) 一种由按照 g) 所述的核酸编码的多肽;

q) 一种由按照 h) 所述的核酸编码的多肽;

r) 一种由按照 i) 所述的核酸编码的多肽;

s) 一种由按照 j) 所述的核酸编码的多肽;

t) 一种生产多肽、片段或其衍生物的方法, 该方法培养已被权利要求 11 的表达载体转化的单核或真核细胞, 然后从培养物中分离相应的蛋白或多肽;

u) 一种应用按照 l) -n) 所述的多肽, 体内或体外诊断花粉变态反应的方法;

v) 一种药理学制备物, 该制备物包括按照 l) -n) 所述的多肽、片段或衍生物, 用于治疗患花粉变态反应的人类或动物;

w) 一种使用 v) 中描述的药理学制备物, 治疗患花粉变态反应的人类或动物的方法;

x) 一种通过使用 k) 中描述的构建体 DNA 免疫接种, 治疗花粉变态反应的方法;

y) 一种通过使用 k) 中描述的含有免疫刺激 DNA 片段的构建体 DNA 免疫接种，治疗花粉变态反应的方法。

5 因此，本发明作为病人特异的分辨过敏原组分敏感谱的鉴别部分，用于改进体外诊断方法。同样地，本发明也用于生产免疫治疗草类花粉过敏原患者而明显改进的的制备物。

序列表

<110> Merck Patent GmbH

<120> DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung eines Graminaen-Allergens

<130> DNA-Sequenz

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1187

<212> DNA

<213> 禾本科

<214>

<400> 1

```
gggaagaagg aggagaagaa ggaggagaag aaggagagtg gagatgctgc gtccggggcc 60
gacggaacct acgacatcac caagctcggc gccaaacccg acggcaagac ggactgcacc 120
aaggaggt:gg aggaggcatg ggcttcggct tgcggtggtta ccgggaagaa tacgatcgtc 180
atccccaagg gtgatttctt gaccggcct ctgaatttca ccgggccatg caagggcgac 240
agcgtcacca tcaagctgga cggcaacctg ctgagctcca acgacctggc caagtacaag 300
gctaaactgga tcgagatcat gcggatcaag aaactcacta tcaccggcaa aggcacgctc 360
gacggccaag gcaaggccgt gtggggcaag aacagctgcg ccaagaacta caactgcaag 420
atcttgccaa acacattggt gctggacttc tgtgacgacg ctctcatcga aggcatacacc 480
ctcctaaacg ccaagttctt ccatatgaac atctacgagt gcaagggcgt gaccgtcaag 540
gacgtgacca tcaccgcgcc cggggacagc cccaacaccg acggcatcca catcggcgac 600
tcgtccaagg tcaccatcac cgacaccacc ateggcaccg gcgacgactg catctccatc 660
ggccccggaa gcaccggcct caacatcacc ggcgtgacct gcggtccagg ccacggcate 720
agcgttgga gcctgggacg gtacaaggac gagaaggacg tgaccgacat caccgtaaag 780
aactgcgtgc tcaagaagtc caccaacggc ctccggatca agtcgtacga ggacgccaag 840
tcgccgctga cggcgtcgaa gctgacctac gagaacgtga agatggagga cgtgggctac 900
cccatacatc tcgaccagaa gtactgcccc aacaagatct gcacctcaa gggagactcc 960
gccagggtca ccgtcaagga cgtcaccttc cgcaacatca ccggcacctc ctccaccccc 1020
gaggccgtca gcctgctctg ctccgacaag cagccctgca atggtgtcac catgaacgac 1080
gtcaagatcg agtacagcg caccaacaac aagaccatgg ctgtctgcac caacgccaag 1140
gtcaccgcca aggggtgtcag cgaggctaac acctgcgccg cctgatg 1187
```

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<214> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: p55特异性引物

<400> 2

```
Gly Lys Lys Glu Glu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Glu Ser Gly Asp Ala
  1           5           10           15
```

```
Ala Ser Xaa Ala
          20
```

<210> 3

<211> 26

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<214> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述: p55特异性引物

<220>
<221> 变体
<222> (3)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (6)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (9)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (12)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (15)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (18)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (21)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<220>
<221> 变体
<222> (24)
<223> n = 次黄嘌呤核苷

<400> 3
ggnaanaang anganaanaa nganga

26

<210> 4
<211> 394
<212> PRT
<213> 禾本科

<400> 4
Gly Lys Lys Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ser Gly Asp Ala
1 5 10 15
Ala Ser Gly Ala Asp Gly Thr Tyr Asp Ile Thr Lys Leu Gly Ala Lys
20 25 30

Pro Asp Gly Lys Thr Asp Cys Thr Lys Glu Val Glu Glu Ala Trp Ala
 35 40 45

Ser Ala Cys Gly Gly Thr Gly Lys Asn Thr Ile Val Ile Pro Lys Gly
 50 55 60

Asp Phe Leu Thr Gly Pro Leu Asn Phe Thr Gly Pro Cys Lys Gly Asp
 65 70 75 80

Ser Val Thr Ile Lys Leu Asp Gly Asn Leu Leu Ser Ser Asn Asp Leu
 85 90 95

Ala Lys Tyr Lys Ala Asn Trp Ile Glu Ile Met Arg Ile Lys Lys Leu
 100 105 110

Thr Ile Thr Gly Lys Gly Thr Leu Asp Gly Gln Gly Lys Ala Val Trp
 115 120 125

Gly Lys Asn Ser Cys Ala Lys Asn Tyr Asn Cys Lys Ile Leu Pro Asn
 130 135 140

Thr Leu Val Leu Asp Phe Cys Asp Asp Ala Leu Ile Glu Gly Ile Thr
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Ala Lys Phe Phe His Met Asn Ile Tyr Glu Cys Lys Gly
 165 170 175

Val Thr Val Lys Asp Val Thr Ile Thr Ala Pro Gly Asp Ser Pro Asn
 180 185 190

Thr Asp Gly Ile His Ile Gly Asp Ser Ser Lys Val Thr Ile Thr Asp
 195 200 205

Thr Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Ile Ser Ile Gly Pro Gly Ser
 210 215 220

Thr Gly Leu Asn Ile Thr Gly Gly Ala Cys Gly Pro Gly His Gly Ile
 225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Leu Gly Arg Tyr Lys Asp Glu Lys Asp Val Thr Asp
 245 250 255

Ile Thr Val Lys Asn Cys Val Leu Lys Lys Ser Thr Asn Gly Leu Arg
 260 265 270

Ile Lys Ser Tyr Glu Asp Ala Lys Ser Pro Leu Thr Ala Ser Lys Leu
 275 280 285

Thr Tyr Glu Asn Val Lys Met Glu Asp Val Gly Tyr Pro Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Gln Lys Tyr Cys Pro Asn Lys Ile Cys Thr Ser Lys Gly Asp Ser
 305 310 315 320

Ala Arg Val Thr Val Lys Asp Val Thr Phe Arg Asn Ile Thr Gly Thr
 325 330 335

Ser Ser Thr Pro Glu Ala Val Ser Leu Leu Cys Ser Asp Lys Gln Pro
 340 345 350

Cys Asn Gly Val Thr Met Asn Asp Val Lys Ile Glu Tyr Ser Gly Thr
 355 360 365

Asn Asn Lys Thr Met Ala Val Cys Thr Asn Ala Lys Val Thr Ala Lys
370 375 380

Gly Val Ser Glu Ala Asn Thr Cys Ala Ala
385 390

说明书附图

图 1: p55 核酸序列

GGGAAGAAGG AGGAGAAGAA GGAGGAGAAG AAGGAGAGTG
GAGATGCTGC GTCCGGGGCC
GACGGAACCT ACGACATCAC CAAGCTCGGC GCCAAACCCG
ACGGCAAGAC GGA CTGCACC
AAGGAGGTGG AGGAGGCATG GGCTTCGGCT TCGGGTGGTA
CCGGGAAGAA TACGATCGTC
ATCCCCAAGG GTGATTTCCT GACCGGGCCT CTGAATTTCA
CCGGGGCCATG CAAGGGCGAC
AGCGTCACCA TCAAGCTGGA CGGCAACCTG CTGAGCTCCA
ACGACCTGGC CAAGTACAAG
GCTAACTGGA TCGAGATCAT GCGGATCAAG AACTCACTA
TCACCGGCAA AGGCACGCTC
GACGGCCAAG GCAAGGCCGT GTGGGGCAAG AACAGCTGCG
CCAAGA ACTA CAACTGCAAG
ATCTTGCCAA ACACATTGGT GCTGGACTTC TGTGACGACG
CTCTCATCGA AGGCATCACC
CTCCTAAACG CCAAGTTCTT CCATATGAAC ATCTACGAGT
GCAAGGGCGT GACCGTCAAG
GACGTGACCA TCACCGCGCC CGGGGACAGC CCCAACACCG
ACGGCATCCA CATCGGCGAC
TCGTCCAAGG TCACCATCAC CGACACCACC ATCGGCACCG
GCGACGACTG CATCTCCATC
GGCCCCGGAA GCACCGGCCT CAACATCACC GCGGTGACCT
GCGGTCCAGG CCACGGCATC
AGCGTTGGCA GCCTGGGACG GTACAAGGAC GAGAAGGACG
TGACCGACAT CACCGTAAAG
AACTGCGTGC TCAAGAAGTC CACCAACGGC CTCCGGATCA
AGTCGTACGA GGACGCCAAG
TCGCCGCTGA CGGCGTCGAA GCTGACCTAC GAGAACGTGA
AGATGGAGGA CGTGGGCTAC
CCCATCATCA TCGACCAGAA GTACTGCCCC AACAGATCT
GCACCTCCAA GGGAGACTCC
GCCAGGGTCA CCGTCAAGGA CGTCACCTTC CGCAACATCA
CCGGCACCTC CTCCACCCCC
GAGGCCGTCA GCCTGCTCTG CTCCGACAG CAGCCCTGCA
ATGGTGTAC CATGAACGAC
GTC AAGATCG AGTACAGCGG CACCAACAAC AAGACCATGG
CTGTCTGCAC CAACGCCAAG
GTCACCGCCA AGGGTGTGTCAG CGAGGCTAAC ACCTGCGCCG
CCTGATG

//

图 2: N端氨基酸序列 p55

GKKEEKKDEK KESGDAASXA

图 3: p55 - 特异性引物

GGI AAI AAI GAI GAI AAI AAI GAI GA

5

图 4: 推断的氨基酸序列

SEQUENCE 395 AA; 41619 MW; 829349 CN;

GKKEEKKEEK KESGDAASGA DGTVDITRLG AKPDGKTDCT KEVEEAWASA
CGGTGKNTIV
IPKGDFLTGP LNFTGPCKGD SVTIKLDGNL LSSNDLAKYK ANWIEIMRIK
KLIITGKGTL
DGQKAVWGK NSCAKNYNCK ILPNTLVLDF CDDALIEGIT LLNAKFFHMN
IYECKGVTVK
DVTITAPGDS PNTDGIHIGD SSKVTITDIT IGTGDDCISI GPGSTGLNIT
GGACGFGHGI
SVGSLGRYKD EKDVTDITVK NCVLKKSTNG LRIKSYEDAK SPLTASKLTY
ENVKMEDVGY
PIIIDQKYCP NKICTSKGDS ARVTVKDVTF RNITGTSSTP EAVSLLCSDK
QPCNGVTMND
VKIEYSGTNN KTMVAVCTNAK VTAKGVSEAN TCAA*

专利名称(译)	一种禾本科植物过敏原的DNA序列和重组生产的方法		
公开(公告)号	CN1351664A	公开(公告)日	2002-05-29
申请号	CN00806656.6	申请日	2000-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	阿恩德·彼得森		
申请(专利权)人(译)	默克专利股份公司 阿恩德·彼得森		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利股份公司 阿恩德·彼得森		
[标]发明人	阿恩德·彼得森 R·苏克 H·菲比格 O·克罗姆维尔		
发明人	阿恩德·彼得森 R·苏克 H·菲比格 O·克罗姆维尔		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/095 A61K39/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P37/08 C07K2/00 C07K14/415 C12N9/24 C12N15/09 C12N15/29 C12N15/63 C12P21/00 C12P21/02 A61K39/36		
CPC分类号	C12N9/24 C12N9/2402 A61K2039/53 C07K14/415 A61K38/00		
代理人(译)	罗宏 姜建成		
优先权	19918682 1999-04-23 DE		
其他公开文献	CN1203179C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述鉴别和确定一种草类过敏原的特点,以及描述编码该过敏原的重组DNA分子和相应的DNA和肽序列。

图 1 : p55 核酸序列

```

GGGAAGAAGG AGGAGAAGAA GGAGGAGAAG AAGGAGAGTG
GAGATGCTGC GTCCGGGGCC
GACGGAACCT ACGACATCAC CAAGCTCGGC GCCAAACCCG
ACGGCAAGAC GGAATGCAAC
TAGGAGGTGG ACGAGGCATG GGCTTCGGCT TCGGGTGGTA
CCGGGAAGAA TACGATCGTC
ATCCCAAGG GTGATTTCTT GACCGGGCCT CTGAATTCA
CCGGGGCATG CAGGGCCGAC
AGCCTCACCA TCAAGCTGGA CGGCAACCTG CTGAGCTCCA
ACGACCTGGC CAAGTACAAG
GCTRACTGGA TCGAGATCAT GCGGATCAAG AACTCACTA
TCACCCCGCA AGGACGCTC
GACGGCCAAG GCAAGGCCGT GTGGGGCAAG AACAGCTGCG
CCAAGAACIA CAACTGCAAG
ATCTEGCCAA ACGATTTGGT GCTGGACTTC TGTGACGACG
CTCTGATCGA AGGCATCAC
CTCCTAAACG CCAAGTTCTT CCATATGAAC ATCTACGAGT
GCAAGGGCCGT GACCGTCAAG
GACGTGACCA TCACCGCGCC CGGGGACAGC CCCAACACCG
ACGGCATCCA CATCGSCGAC
TCGTCCAAGG TCACCATCAC CGACACCACC ATCGGCACCG
GCGAGGACTG CATCTCCATC
GGCCCGGAA GCACCGGCCT CAACATCACC GGCGTGACCT
GCGGTCCAGG CCACGGCATC
AGCGTTGGCA CCCTGGGACG GTACRAGGAC GAGAAGGACG
TGACCCGAT CACCGTAAAG
AACTGGCTGC TCAAGAAGTC CACCAACGGC CTCCGGATCA
AGTCGTACGA GGACGCCAAG
TCGCGGCTGA CGGCCTCGAA GCTGACCTAC GAGAACCTGA
AGATGGAGGA GGTGCTGCTC
CCCATCATCA TCGACCAGAA GTACTGCCCC AACAGAGTCT
GCACCTCCAA GGGGACTCC
GCCAGGCTCA CCTCAAGGA CGTCACTTC CGCAACATCA
CCGGGACCTC CTCGCGCC
GAGGCCGTCA GCCTGCTCTG CTCCGACAAG CAGCCCTGCA
ATGGTGTAC CATGAACGAC
GTCAGATCG AGTACAGCGG CACCRACAAC AAGACCATGG
CTGTCTGC CAAAGCCAAG
GTCACCGCCA AGGGTGTACG CGAGGCTAAC ACCTGCGCCG
CCTGATG
//

```