

Allergeenien ja IgE-vasta- aineiden rakennetutkimuksesta **uuden sukupolven allergia- rokotteiden kehitykseen**

→ **Kristiina Takkinen***

FT, vanhempi johtava tutkija, VTT
kristiina.takkinen@vtt.fi

→ **Juha Rouvinen**

FT, professori,
Itä-Suomen yliopisto
juha.rouvinen@uef.fi

*Kirjeenvaihto

TIIVISTELMÄ

Allergeenien ja niitä tunnistavien IgE-luokan vasta-aineiden rakennetutkimus avaa mahdollisuuden ymmärtää tekijöitä, miksi vain tietyt proteiinit ovat allergeeneja. Omat tutkimustuloksemme ovat vahvistaneet käsitystä, että allergeeneilla on tiettyjä rakenteellisia ominaisuuksia, miksi ne eroavat muista proteiineista. Tuloksemme viittaavat siihen, että IgE-vasta-aineiden sitoutumistapa allergeeneihin eroaa IgG-vasta-aineista ja että allergeenit voivat muodostaa dimeerirakenteita, jotka ovat usein heikkoja liuoksessa, mutta vahvistuvat syöttösolun tai basofiilin pinnalla. Näihin tuloksiin perustuen olemme muuntaneet hyvin hienovaraisesti valittujen allergeenien rakenteita ja todenneet, että näiden allergeenin aktiivisuus on madaltunut alkupe räiseen luonnonallergeeniin verrattuna. Tavoitteena on, että nämä rakenteellisesti alkuperäistä allergeenia muistuttavat hypoallergeenit toimisivat tehokkaasti ja turvallisesti siedätyshoidoissa herättäen neutraloivien IgG-vasteiden synnyn. Tämä uusi allergian siedätyshoidon kehitystyö jatkuu nykyään VTT:n spin-off yrityksessä Desentumissa.

Avainsanat: Allergeenit, IgE-vasta-aineet, rakennetutkimus, hypoallergeenit, siedätyshoito

JOHDANTO

Allergialla tarkoitetaan immunologista herkistymistä tavallisesti harmittomille proteiineille, joita voi esiintyä esimerkiksi elinympäristössä, elintarvikkeissa, lääkkeissä ja kulutustavaroissa. Yli 25 prosenttia väestöstä kärsii IgE-välitteisistä yliherkkyyksireaktioista eli tyypin I allergioista, joissa herkistäjänä toimii ympäristöstä saatu allergeeni. Tämä allergeeniproteiini voi olla peräisin kasveista, eläimistä, mikrobeista. Herkistymisen seurauksena elimistössä muodostuu spesifisiä immunoglobuliini E (IgE)-luokan vastaaineita, jotka aiheuttavat saman allergeenin uudelleen kohdatessa allergisen reaktion, jolle tyypillisiä ovat hengitystie-, iho- ja suolisto-oireet. Pahimmillaan allergeeni voi aiheuttaa anafylaktisen reaktion ja jopa kuoleman. IgE-vasteen on esitetty syntyneen alun perin parasiittien torjumiseksi, mutta yleisen elin- ja hygieniatason nousun myötä se on alkanut toimia osalla ihmisistä ”väärin” allergeeneja vastaan (Fitzsimmons ym. 2014). Tätä tukee hyvin suomalaisen tutkijoiden havaintoa allergian esiintymistasossa maantieteellisesti ja ilmastollisesti samankaltaisten Itä-Suomen ja Venäjän Karjalan väestön välillä (Haahtela ym. 2015). Itä-Suomessa allergian yleisyys on 25 prosentin tasolla, kun Venäjän Karjalassa se on huomattavasti matalampi, vaikka siellä mitatut henkilöiden kokonais-IgE-tasot ovat samalla tasolla kuin allergisilla henkilöillä Suomessa.

Allergeenit

Allergeenit ovat yleensä pienehköjä proteiineja, joita tunnetaan nykyään yli 1 500 (Tschette ja Breiteneder 2017). Useiden allergeenien kolmiulotteinen rakenne on varsin stabiili, mutta esimerkiksi ruoka-allergeenit voivat kuumennettaessa denaturoitua (menettävät biologisesti aktiivisen kolmiulotteisen rakenteen) ja kyky aiheuttaa allergisia reaktioita voi muuttua tai hävitä. Allergeenille herkistyneen ihmisen elimistöön saapuva allergeeni sitoutuu basofiilin tai syöttösolun pinnalla olevaan IgE-vasta-aineen ja FcεRI-reseptorin muodostamaan kompleksiin aiheuttaen niiden linkittymisen (cross-linking). Tämä johtaa soluaktivaatioon ja biologisten välittäjämolekyylien, kuten histamiinin vapautukseen (**Kuva 1**).

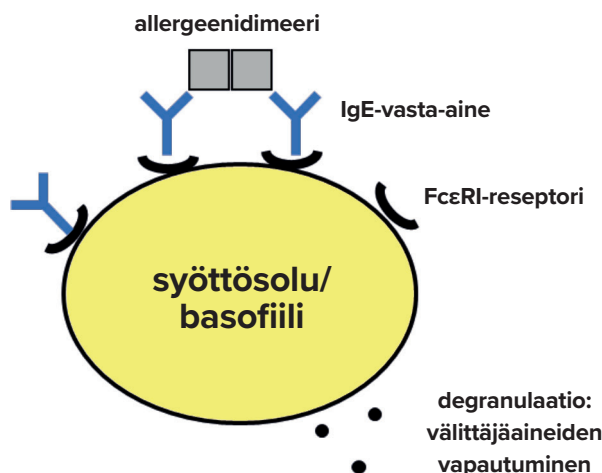
Allergisuutta aiheuttava lähde voi tuottaa useita allergeeneja, joista yleensä yksi tai muutama on niin sanottu pääallergeeni. Allergeeneille on kehitetty oma nimistö lähteen mukaan WHO/IUIS (Pomés ym. 2018). Esimerkiksi lehmän (*Bos domesticus*) maidon allergeenin beta-laktoglobuliinin systemaattinen nimi on Bos d 5, jossa numero viittaa allergeenin nu-

meroon. Allergeenien eristäminen ja puhdistaminen luonnollisista lähteistä, esimerkiksi siitepölystä, on usein vaikeaa allergeeniproteiinien pienen määrän ja erilaisten rakennemuotojen vuoksi. Allergeenitutkimus lähti nopeaan kehitykseen 1980-luvun lopulla, jolloin geeniteknologian avulla ryhdyttiin kloonamaan allergeenien geenejä eri lähteistä ja tuottamaan rekombinanttiallergeeneja (Tschette ja Breiteneder 2017). Kolmiulotteinen rakenne on määritetty nyt yli sadasta allergeenista, joista suurin osa on tuotettu ja puhdistettu rekombinanttiproteiineina. Allergeenit kuuluvat pieneen määrään tunnettuja proteiini-perheitä (<2 %). Allergeenien rakenteet muistuttavat perheen sisällä toisiaan, mutta perheiden välillä ei ole selvää samankaltaisuutta, joten selkeää yleistä rakenteellista selitystä proteiinien allergeenisyydelle ei ole tähän mennessä löytynyt (Radauer ym. 2008). Herkistyminen yhdelle allergeenille voi johtaa herkistymiselle muille allergeeneille. Esimerkiksi koivun pääallergeenille (Bet v 1) herkistyneet henkilöt ristireagoivat usein myös omenan pääallergeenille (Mal d 1), jonka aminohapposekvenssi on noin 65 prosenttia homologinen koivun pääallergeenin kanssa (Vanek-Krebitz ym. 1995).

Tasalaatuksena ja toistettavasti tuotetut rekombinanttiallergeenit ovat avanneet täysin uusia mahdollisuuksia allergioiden diagnostiikkaan ja hoitoon (Tschette ja Breiteneder 2017). Nykyään pystytään määrittämään hyvin pienestä seeruminäytteestä herkistyneiden henkilöiden IgE-vasta-aineet 112 allergeenille, jotka ovat peräisin 51 allergeenilähteestä (Hamilton 2017). Näistä allergeeneista on tällä hetkellä 68 tuotettu rekombinanttiproteiineina. Useita rekombinanttiallergeeneja ja niiden muunneltuja muotoja on tällä hetkellä myös kliinisissä kokeissa tehokkaampien ja turvallisempien hoitomuotojen kehittämiseksi (Valenta ym. 2016, Pfaar ym. 2018).

IgE-vasta-aineet

Allergeeneille spesifisten IgE-vasteiden tutkiminen on ollut haasteellista, koska IgE-vasta-aineiden pitoisuus veren seerumissa on erittäin matala, alle yksi µg/ml, eli noin tuhat kertaa matalampi kuin IgG:n pitoisuus. Yksittäisiä IgE-vasta-aineita koodaavia geenejä on viime vuosikymmenten aikana eristetty allergisten henkilöiden valkosoluista kloonatuista IgE-vasta-ainegeenikirjastoista faaginäyttökniikan avulla (Hoogenboom 2005). Näihin kirjastoihin kloonataan IgE spesifiset raskaan ketjun vasta-ainegeenit, jotka yhdistetään kaikkiin mahdollisiin kevytketjugeeneihin. Mielenkiintoista on, että vaikka IgE-geenikirjas-



Kuva 1. Allergeenin sitoutuminen IgE-vasta-aineen ja FcεRI-reseptorin muodostamaan kompleksiin basofiiliin tai syöttösolun pinnalla johtaa näiden yhteenliittymiseen ja soluaktivaatioon, jonka seurauksena solusta vapautuvat välittäjäaineet johtavat allergiaoireisiin.

tot ovat olleet kooltaan laajoja (> 106 geeniyhdistelmää), niin niistä on yleensä eristetty vain muutamia allergeenia sitovia IgE-vasta-aineita, joiden sitoutumisvoimakkuudet ovat olleet korkeita, eli ne pystyvät toimimaan tehokkaasti hyvin alhaisissa allergeenipitoisuuksissa (Steinberger ym. 1996, Flicker ym. 2002, Laukkanen ym. 2003, Jakobsen ym. 2004, Persson ym. 2007, Jylhä ym. 2009, Christensen ym. 2010). Tämä havainto tukee sitä, että hyvinkin pienet allergeenimäärät voivat aiheuttaa erittäin voimakkaita reaktioita herkistyneissä ihmisissä. IgE-vasta-ainekirjastojen ongelmana on kuitenkin se, että vasta-ainegeenien kloonausvaiheessa IgE spesifiset geenit yhdistetään kyseisen henkilön kevyetketjugeenikirjon kanssa, joten on mahdollista, että kirjastoista eristetyt vasta-aineen raskaan ja kevyen ketjun yhdistelmät eivät välttämättä ole samoja kuin seerumissa esiintyvien IgE-vasta-aineiden. Viime aikoina on IgE-vasteiden laajuutta tutkittu erilaisissa allergiaa tai sen hoitoon liittyvissä yhteyksissä hyödyntämällä uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä (Gould ym. 2018, Kiyotani ym. 2018). Nykyään tarkoilla solueristysmenetelmillä pystytään allergisten henkilöiden verinäytteistä eristämään myös harvinaisia, tietyille allergeenille spesifisiä yksittäisiä IgE-positiivisia B-soluja mahdollistaen alkuperäisten IgE-vasta-aineiden raskaiden ja kevyet ketjujen geeniyhdistelmien kloonaukseen (Hoh ym. 2016). Viime vuoden lopus-

sa julkaistiin merkittävä artikkeli, jossa oli eristetty maapähkinälle allergisten henkilöiden verinäytteistä kyseessä olevaa allergeenia tunnistavia yksittäisiä valkosoluja, joista määritettiin RNA-sekvensoinnilla IgE spesifiset raskaan ja kevyen ketjun geenisekvenssit (Croote ym. 2018). Hyvin mielenkiintoista on, että muutaman potilaan IgE-vasta-ainegeenisekvenssit olivat homologisia keskenään viitaten siihen, että erilaisia allergeenispesifisiä IgE-vasta-aineita on rajoitettu määrä, ja ne voivat olla myös samankaltaisia eri henkilöiden välillä. Croote ym. (2018) tuottivat määritettyjen IgE-geenisekvenssien vastaavat vasta-aineet rekombinanttiproteiineina ja havaitsivat, että näiden IgE-vasta-aineiden sitoutumisaffiniteetti oli hyvin korkea maapähkinän allergeenia (Ara h 2) vastaan. Tämän julkaisun menetelmien hyödyntäminen tuottaa varmasti jatkossa lisätietoa allergeenispesifisten IgE-vasta-aineiden poly- tai monoklonalisuudesta sekä henkilötasolla että henkilöiden välillä.

Allergeenien IgE-epitoppirakenteet

IgE-luokan vasta-aineiden ja allergeenien rakennetietoja voidaan käyttää hyväksi kehitettäessä uuden sukupolven allergialääkkeitä, -rokotteita ja tehostettaessa siedätyshoitoja sekä myös selvitettyä allergian syntymekanismia. IgE-vasta-aineiden sitoutumisalueita allergeeneihin, eli epitoppirakenteita, ei ole voitu mallittaa luotettavasti allergeenien raken-

netiedosta eikä siitä jalostetusta bioinformatiikka-aineistosta. Allergeenien epitooppirakenteita on määritetty epäsuorasti analysoimalla potilas-IgE-seerumin sitoutumista allergeenin aminohapposekvenssistä johdettuihin lineaarisiin peptideihin. Peptidien vasta-aineisiin sitoutumisen voimakkuus on kuitenkin huomattavasti alhaisempi kuin kokonaisten proteiinien, joten spesifisen ja ei-spesifisen sitoutumisen erottaminen toisistaan on vaikeaa. Lisäksi allergeenien IgE-epitoopit ovat konformatiivisia eli niiden rakenne määräytyy proteiinin kolmiulotteisen laskestuneen rakenteen perusteella. Tähän perustuu allergisista henkilöistä eristettyjen IgE-vasta-aineiden korkea sitoutumiskyky (Pomés 2010; Aalberse ja Cramer 2011). Luotettavan IgE-epitooppirakenteen selvittäminen onnistuu vain IgE-luokan vasta-aineen ja allergeenin muodostaman immunokompleksin rakennetutkimuksella.

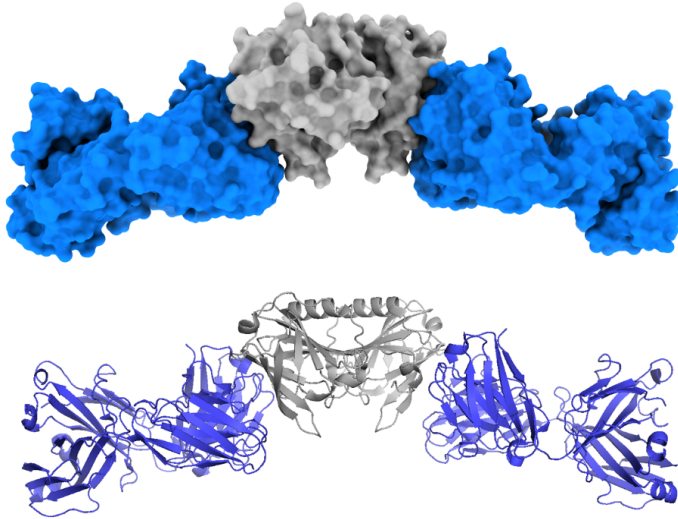
VTT:n, Itä-Suomen yliopiston ja HUS Iho- ja allergiasairaalan yhteistyönä eristimme vasta-ainekirjastotekniikalla lehmän maidon pääallergeenia, beta-laktoglobuliinia (BLG), tunnistavan IgE-luokan rekombinanttivasta-aineen (Jylhä ym. 2009). Onnistuimme myös kiteyttämään tämän IgE-vasta-aineen ja BLG:n muodostaman immunokompleksin ja määrittämään sen kolmiulotteisen rakenteen (Niemi ym. 2007, 2008). Tämä oli maailmanlaajuisesti ensimmäinen kolmiulotteinen IgE-luokan vasta-aineen ja allergeenin muodostama immunokompleksirakenne. Rakenteen perusteella tämä IgE-vasta-aine sitoutuu kohteeseensa hyvin epätyypillisellä tavalla. Maidon pääallergeenin IgE-epitooppi on konformatiivinen ja koostuu kuudesta lyhyestä peptidiosasta, jotka muodostavat yhdessä tasaisen pinnan. Tämä havaintomme viittasi siihen, että IgE-epitooppien rakenteet olisivat erilaisia kuin IgG-epitooppien rakenteet, koska aikaisemmin määritettyjen allergeenien immunokompleksien IgG-epitoopit olivat allergeenien ulkonevissa osissa. Toistaiseksi vain toisen IgE-vasta-aineen ja allergeenin (timotein siitepölyn Phl p 2) muodostaman immunokompleksin rakenne on määritetty (Padavattan ym. 2009). Myös tässä immunokompleksissa IgE-vasta-aineen epitooppirakenne on konformatiivinen, neljästä beta-säikeestä koostuva tasainen pinta. Näiden kahden IgE-vasta-aineen sitoutumistapa on samankaltainen, vaikka kyseessä ovat rakenteellisesti erilaiset allergeeniproteiinit. Havainnot vahvistavat olettamusta, että IgE- ja IgG-epitooppirakenteet eroaisivat toisistaan ja että IgE-vasta-aineiden sitoutumistapa voi olla samankaltainen, vaikka kohdeallergeenien perusrakenteet olisi-

vat erilaiset. Tarvitaan kuitenkin lisätietoa useampien IgE-vasta-aineiden tarkoista epitooppirakenteista tämän olettamuksen vahvistamiseksi.

Allergeenien heikot dimeerimuodot

Maidon BLG-allergeeni on kvaternääriseltä rakenteeltaan heikko homodimeeri, joka esiintyy liuoksessa monomeerin ja dimeerin seoksena. Monomeeri- ja dimeerimuotojen tasapainolle on pystytty mittaamaan tasapainovakio. Korkeassa proteiinipitoisuudessa dimeerin osuus kasvaa ja alhaisemmassa pitoisuudessa monomeerimuoto on vallitseva (Sakurai ja Goto 2002, Nooren ja Thornton 2003). Määrittämässämme immunokompleksirakenteessa BLG on dimeerinä, johon kaksi IgE-vasta-ainetta sitoutuu samanaikaisesti allergeenidimeerin vastakaisille puolille (**Kuva 2**). Havainto on merkittävä, koska se vihjaa, että allergisen reaktion käynnistämiseen riittäisi allergeenidimeereille vain yksi allergeenispesifinen IgE- vasta-aine eikä vähintään kahta erilaista niin kuin kirjallisuudessa on yleensä esitetty. Tähän on saatu myöhemmin lisävahvistusta, kun osoitettiin, että kumipuun lateksin allergeenin (Hev b 8) dimeerimuoto sitoutuessaan sitä tunnistavaan yhteen monoklonaaliseen IgE-vasta-aineeseen aiheuttaa voimakkaan basofiilien degranulaation (Mares-Mejja ym. 2016).

Immunokompleksirakenteemme perusteella lähdimme tutkimaan, miten yleistä allergeenien dimeerisyys on. Lisäksi kirjallisuudessa oli muutamia viitteitä allergeenien dimeerisydestä (Schöll ym. 2005, Bellinghausen ym. 2008, Li ym. 2008). Analysoimme proteiinitietokannassa olleiden 46 allergeenin kyvyn muodostaa heikkoja homodimeereitä. Havaitimme, että näistä 35 allergeeniä olivat pääasiassa homodimeerejä, joista vain muutama oli kuvattu dimeeriksi. Heikkojen homodimeerien analysoiminen on haastavaa biofysikaalisilla menetelmillä, mutta osoitimme myös, että natiivissa olosuhteissa massaspektrometrialla (MS) voidaan havaita allergeenien pitoisuudesta riippuva dimeerinmuodostus (Rouvinen ym. 2010, Niemi ym. 2015). Valmistimme BLG:stä monomeerimutanteja, joiden kasvanut monomeerisyys todennettiin MS-analysillä, ja havaitimme, että ne vapauttavat heikommin histamiinia solupohjaisessa aktivaatiokokeessa kuin vastaava villityyppi BLG (Rouvinen ym. 2010). Jos heikkojen dimeerien muodostus on näin yleistä allergeeneissa, sen täytyy olla yksi allergeenien tärkeä ominaisuus. Olemme esittäneet, että allergeeni sitoutuu ensimmäisessä vaiheessa yleensä monomeerina syöttösolun tai baso-



Kuva 2. Beta-laktoglobuliinidimeerin (harmaa) ja kahden siihen sitoutuvan IgE-vasta-aineen Fab-fragmentin (sininen) muodostama immunokompleksirakenne. Yläkuvassa immunokompleksirakenne on esitetty pintamallina ja alakuvassa nauhamallina, joka kuvaa polypeptidiketjun laskostumista.

filin pinnalla olevaan allergeenispesifiseen IgE-vasta-aineeseen. Tämä johtaa allergeenin paikallisen pitoisuuden voimakkaaseen kasvuun (lokalisaatio) ja dimerisoitumiseen solukalvolla. Liuostilassa esiintyvä heikko dimerisaatioilmiö vahvistuisi täten voimakkaasti syöttösolun pinnalla (Kuriyan ja Eisenberg 2007, Rouvinen ym. 2010, Niemi ym. 2015;).

Desentumin uuden sukupolven allergiarokotteiden kehitys

Allergian aiheuttavien oireiden lieventäminen on perustunut suurelta osin joko allergeenilähteiden välttämiseen tai oireiden vähentämiseen lääkkeillä, esimerkiksi antihistamiineilla, jotka helpottavat allergian oireita, mutta eivät paranna sitä. Allergeenin välttäminen on mahdollista esimerkiksi eläin- tai ruoka-aineallergikoille, mutta on vaikeampaa siitepölyallergikoille, koska siitepöly kulkeutuu tuulen mukana moniin paikkoihin, jopa asuntoihin.

Allergioiden hoidossa käytetään pitkäaikaista siedätyshoitoa, joka perustuu luonnosta eristettyjen uutteen käyttöön. Nämä uutteen sisältävät vaihtelevia määriä eri allergeeneja, mutta paljon myös muita erilaisia luonnonaineita, joiden yksityiskohtaisesta koostumuksesta ei ole tarkkaa tietoa. Uutteita annetaan yleensä kymmeninä pistoksina vähitellen suurenevinä annoksina. Mittauksissa on havaittu, että

siedätyshoidon seurauksena henkilön immuunivaste alkaa tuottaa IgG- ja erityisesti IgG4-luokan vasta-aineita, jotka sitoutuessa luonnonallergeeneihin vähentävät allergisia reaktioita. Siedätyshoidon solu- ja molekyylytason mekanisme ei tunneta yksityiskohtaisesti, mutta ilmeisesti altistuksessa käytettävä suurempi allergeenimäärä aiheuttaa immuunijärjestelmän T- ja B-soluvasteeseen muutoksia, joissa IgE-vastetta suosivien TH2-solujen määrä vähenee ja IgG-vastetta suosivien TH1-, Treg ja Breg solujen määrä kasvaa. Onnistuessaan siedätyshoito johtaa allergian paranemiseen (Shamji ja Durham 2017). Pistokseen perustuvan siedätyshoidon haittana on hoidon pitkä kesto ja vakavan allergisen reaktion riski, jonka takia pistokset pitää antaa lääkärin tai sairaanhoitajan valvonnassa. Viime vuosina markkinoille on tullut uutetabletteihin perustuva siedätyshoito muun muassa heinä- ja pölypunkki-allergiaan mahdollistaen kotona tapahtuvan annostelun. Tällainen siedätyshoito on kuitenkin pitkäkestoinen, yksi tabletti päivässä kolmen vuoden ajan, minkä takia se voidaan kokea hankalaksi, ja se voi myös aiheuttaa joillekin henkilöille suun limakalvon ärsytystä ja vatsa-oireita.

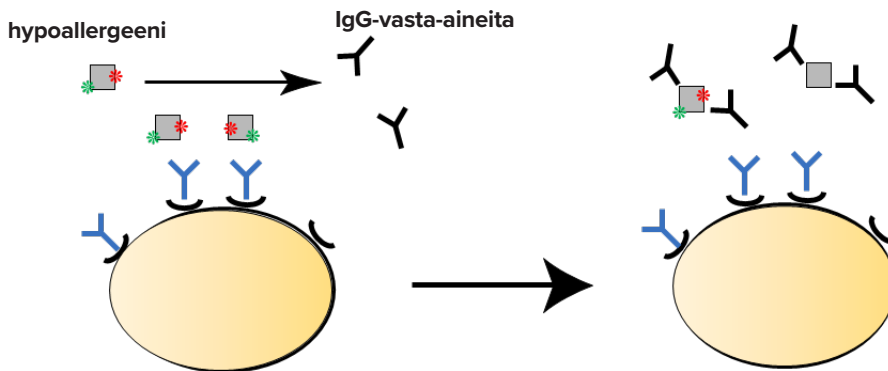
Uutteen rinnalle ja niiden korvaamiseksi on viime aikoina alettu kehittää koostumukseltaan hallittuja ja puhtaita rekombinanttiproteiinivalmisteita, jotka perustuvat muun muassa luonnolliseen

laskostuneeseen allergeeniin, laskostumattomaan muunnokseen tai allergeenin epitooppipeptideihin (Tschepe ja Breiteneder 2017).

Vuonna 2011 perustettu Desentum Oy (<https://www.desentum.fi>) kehittää allergian immunoterapiaan niin kutsuttuja hypoallergeeneja. Hypoallergeenien kehitystyö perustuu proteiinirakenteen tarkasti suunniteltuun hienovaraiseen muuntamiseen niin, että niiden allergiareaktiota aiheuttava ominaisuus olisi huomattavasti matalampi kuin alkuperäisen luonnonallergeenin ja että ne herättäisivät tehokkaan suojaavan IgG-vasteen (**Kuva 3**). Allergeenirakenteen täsmällinen muuntelu perustuu tässä katsauksessa kuvattuihin suojattuihin tutkimustuloksiin IgE-epitooppi-rakenteista ja allergeenien dimeerimuodoista. Allergeenin kolmiulotteisen rakenteen perusteella suunnitellaan muutamia aminohappomuutoksia ennustetulle IgE-epitooppialueelle ja dimeerinmuodostuspinnalle, joiden oletetaan alentavan proteiiniin dimeerisoitumista ja sitoutumista IgE-vasta-aineeseen. Tavoitteena on, että (I) hypoallergeenin aiheuttaman allergisen reaktion voimakkuus on huomattavasti laskenut, joten sitä voitaisiin

käyttää turvallisesti suuremmissa annosmäärissä ja että (II) se on muuten rakenteellisesti hyvin samankaltainen alkuperäisen allergeenin kanssa, jotta sen indusoimat IgG-vasta-aineet sitoutuisivat tehokkaasti luonnonallergeeniin.

Hypoallergeenikandidaatit ja alkuperäinen allergeeni tuotetaan rekombinanttiproteiineina ja puhdistetaan homogeenisiksi kromatografiomenetelmin. Rekombinanttiallergeenien tarkka koostumus, oikea laskostuminen ja dimeerinmuodostuskyky määritetään tarkkoilla MS-analyysillä. Seeruminäytteiden IgE-vasta-aineiden sitoutumisero hypoallergeeniin ja alkuperäisen allergeenin välillä määritetään kilpailevalla immunomäärityksellä. Solupohjaisella kokeella mitataan eroa histamiinivapautuksessa, jossa jatkotutkimukseen valittavien hypoallergeenien pitäisi osoittaa matalampaa tasoa verrattuna alkuperäiseen allergeeniin. Desentumin tutkimus- ja kehitystyön tuloksena pisimmälle on edennyt koivun pääallergeenin hypoallergeenikandidaatti, joka on tällä hetkellä etenemässä kliinisiin kokeisiin. Prekliinisessä ja tutkimusvaiheessa ovat timotein, hevosen ja koiran pääallergeenit sekä maapähkinän tärkeimmät allergeenit.



Kuva 3. Desentumin tuottamat hypoallergeenit on muunneltu IgE-epitooppialueelta (vihreä tähti) sekä monomeeri-monomeeri rajapinnalta (punainen tähti), mikä heikentää allergeenin sitoutumista IgE-FcεRI-reseptorikompleksiin sekä dimeerisaatiota vähentäen allergista reaktiota. Siedätyshoidossa annosteltu hypoallergeeni lisää allergeenispesifisten IgG-vasta-aineiden muodostumista. Nämä IgG-vasta-aineet voivat sitoutua eri osiin allergeenin pinnalle. Suuri rakenteellinen samankaltaisuus hypoallergeenin ja luonnonallergeenin välillä johtaa siihen, että syntyneet IgG-vasta-aineet sitoutuvat tehokkaammin voimakkaita allergiaoireita aiheuttavaan luonnonallergeeniin estäen allergisen reaktion käynnistymisen.

SUMMARY

From structural studies of allergens and IgE antibodies to the development of new generation allergy vaccines

→ **Kristiina Takkinen***

PhD, Senior Principal Scientist,
VTT
kristiina.takkinen@vtt.fi

→ **Juha Rouvinen**

PhD, Professor,
University of Eastern Finland
juha.rouvinen@uef.fi

*Correspondence

Structure determination of allergens and IgE-antibodies binding them provides identification of features, why only certain proteins are allergens. Our research results have strengthened the hypothesis that allergens have specific structural properties making them different from other proteins. Our results indicate that the binding mode of an IgE antibody to an allergen is different compared to an IgG antibody and that allergens can form dimers that are usually transient in solution but stronger on the surface of a mast cell or a basophil. Based on these discoveries, we have designed minor modifications to the structures of selected allergens and observed that their allergenic activity is lower when compared to the original allergen. These hypoallergens, resembling structurally the original allergen, should be highly capable to evoke the production of protecting IgG antibodies leading to efficient and safe desensitization treatments. Development of these novel allergy vaccine products is continuing in VTT's spin-off company Desentum.

Key words: Allergens, IgE antibodies, structure determination, hypoallergens, allergen-specific immunotherapy

KIRJALLISUUS

Aalberse RC, Cramer R: IgE-binding epitopes: a reappraisal. *Allergy* 66: 1261–1274, 2011

Bellinghausen I, Häringer B, Lafargue B, Strand D, König B, Decker H, Saloga J: Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. *Clin Exp Allergy* 38: 539–48, 2008

Christensen LH, Riise E, Bang I, Zhang C, Lund K: Isoallergen variations contribute to the overall complexity of effector cell degranulation: Effect mediated through differentiated IgE affinity. *J Immunol* 184: 4966–4972, 2010

Croote D, Darmanis S, Nadeau KC, Quake SR: High-affinity allergen-specific human antibodies cloned from single IgE B cell transcriptomes. *Science* 362:1306–1309, 2018

Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW: Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Front Immunol* 5: 1–12, 2014

Flicker S, Steinberger P, Norderhaug L, ym.: Conversion of grass pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG(1) antibody. *Eur J Immunol* 32: 2156–2162, 2002

Gould HJ, Wu YCW: IgE repertoire and immunological memory: compartmental regulation and antibody function. *International Immunology* 30: 403–412, 2018

Haahtela T, Laatikainen T, Alenius H, ym.: Hunt for the origin of allergy – comparing the Finnish and Russian Karelia. *Clinical & Experimental Allergy* 45: 891–901, 2015

Hamilton RG: Microarray technology applied to human allergic disease. *Microarrays* 6: 1–6, 2017

Hoh RA, Joshi SA, Liu Y, ym.: Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 137: 157–167, 2016

Hoogenboom HR: Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnol* 23: 1105–1116, 2005

Jakobsen CG, Bodtger U, Kristensen P, Poulsen LK, Roggen EL: Isolation of high-affinity human IgE and IgG antibodies recognising Bet v 1 and Humicola lanuginosa lipase from combinatorial phage libraries. *Mol Immunol* 41: 941–953, 2004

Jylhä S, Mäkinen-Kiljunen S, Haahtela T, Söderlund H, Takkinen K, Laukkanen ML: Selection of recombinant IgE antibodies binding the β -lactoglobulin allergen in a conformation-dependent manner. *J Immunol Methods* 350: 63–70, 2009

Kiyotani K, Mai TH, Yamaguchi R, ym.: Characterization of the B-cell receptor repertoires in peanut allergic subjects undergoing oral immunotherapy. *J Human Genetics* 63: 239–248, 2018

Kuriyan J, Eisenberg D: The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature* 450: 983–990, 2007

Laukkanen ML, Mäkinen-Kiljunen S, Isoherranen K, Haahtela T, Söderlund H, Takkinen K: Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *J Immunol Methods* 278: 271–281, 2003

Li M, Gustchina A, Alexandratos J, ym.: Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 283: 22806–22814, 2008

Mares-Mejía I, Martínez-Caballero S, Garay-Canales C, ym.: Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms. *Sci Rep* 6: 32552, 2016

Niemi M, Jylhä S, Laukkanen ML, ym.: Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure* 15: 1413–21, 2007

Niemi M, Jänis J, Jylhä S.: Characterization and crystallization of a recombinant IgE Fab fragment in complex with the bovine beta-lactoglobulin allergen. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64: 25–28, 2008

Niemi MH, Rytkönen-Nissinen M, Miettinen I, Jänis J, Virtanen T, Rouvinen J: Dimerization of lipocalin allergens. *Sci Rep* 5: 13841, 2015

Nooren IMA, Thornton JM: Structural characterisation and functional significance of transient protein–protein interactions. *J Mol Biol* 325: 991–1018, 2003

Padavattan S, Flicker S, Schirmer T, ym.: High-Affinity IgE Recognition of a Conformational Epitope of the Major Respiratory Allergen Phl p 2 As Revealed by X-Ray Crystallography. *J Immunol* 182: 2141–2151, 2009

Pfaar O, Lou H, Zhang Y, Klimek, Zhang L: Recent developments and highlights in allergen immunotherapy. *Allergy* 73: 2274–2289, 2018

Persson H, Sadegh MK, Greiff L, Ohlin M: Delineating the specificity of an IgE-encoding transcriptome. *J Allergy Clin Immunol* 120:1186-1192, 2007

Pomés A: Relevant B cell epitopes in allergic disease. *Int Arch Allergy Immunol* 152: 1–11, 2010

Pomés A, Davies JM, Gadermaier G, ym. WHO/ IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol* 100: 3-13, 2018

Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H: Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121: 847-52, 2008

Rouvinen J, Jänis J, Laukkanen ML, ym.: Transient dimers of allergens. *PLoS One* 5: e9037, 2010

Sakurai K, Goto Y: Manipulating monomer-dimer Equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem* 277: 25735–25740, 2002

Schöll I, Kalkura N, Shedziankova Y, ym.: Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *J Immunol* 175: 6645-6650, 2005

Shamji MH, Durham SR: Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 140: 1485-1498, 2017

Steinberger P, Kraft D, Valenta R: Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. *J Biol Chem* 271: 10967–10972, 1996

Tscheppe A, Breiteneder H: Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 172:187–202, 2017

Valenta R, Campana R, Focke-Tejkl M, Niederberger V: Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *J Allergy Clin Immunol* 137: 351-356, 2016

Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, ym. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 538-51, 1995