(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104507959 A
(43)申请公布日 2015.04.08

(21)申请号 201380040582.X
(22)申请日 2013.05.30
(30)优先权数据
1209868.7 2012.06.01 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2013/051439 2013.05.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/179043 EN 2013.12.05
(71)申请人 切尔卡西亚有限公司
地址 英国牛津郡
(72)发明人 罗德里克·彼得·哈夫纳
保罗·莱德勒 帕斯卡·希基
马克·拉尔什
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王思琪 郑霞
(51)Int.Cl.
C07K 14/37(2006.01)
A61K 39/35(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
权利要求书3页 说明书35页
序列表27页

(54)发明名称

链格孢属肽类

(57)摘要

可用于预防或治疗对链格孢属和/或枝孢属的霉菌过敏的药物制剂，包括药学上可接受的载体或稀释剂和选自以下的至少三种的多肽或其药学上可接受的盐：(a)包含WSWKIGPAIATGNT(Alt28；SEQ ID NO:101)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(b)包含KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A；SEQ ID NO:107)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(c)包含KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(d)包含AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(e)包含SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A；SEQ ID NO:60)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(f)包含SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06；SEQ ID NO:72)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；(g)包含DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；以及(h)包含GWGVMVSHRSGET(Alt14；SEQ ID NO:84)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；其中，所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列是具有多达七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列，所述修饰的每一个独立地是缺失、取代或插入，且各多肽多达30个氨基酸长度。

CN 104507959 A

1. 一种药物制剂，所述药物制剂包括药学上可接受的载体或稀释剂和选自以下的至少三种的多肽或其药学上可接受的盐：

(a) 包含 WSWKIGPAIATGNT(Alt28；SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(b) 包含 KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A；SEQ ID NO:107) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(c) 包含 KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(d) 包含 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(e) 包含 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A；SEQ ID NO:60) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(f) 包含 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06；SEQ ID NO:72) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

(g) 包含 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；以及

(h) 包含 GWGVMVSHRSGET(Alt14；SEQ ID NO:84) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐；

其中，所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列是具有多达七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列，所述修饰的每一个独立地是缺失、取代或插入，且各多肽多达 30 个氨基酸长度。

2. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其中 (a) 至 (h) 的多肽分别由 (a) 至 (h) 中列举的氨基酸序列或变体序列组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物制剂，其中所述氨基酸序列的变体序列是具有一种或两种氨基酸修饰的所述氨基酸序列，所述修饰或所述修饰的每个独立地是缺失或取代。

4. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，其中所述取代或各取代是保守的取代。

5. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，其中所述氨基酸序列的变体序列是具有从 N 末端缺失多达两个氨基酸和 / 或从 C 末端缺失多达两个氨基酸的所述氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，其中各多肽多达 20 个氨基酸长度。

7. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，其中至少一种多肽具有如所述前述权利要求中限定的氨基酸序列或变体序列，所述氨基酸序列或变体序列具有分别相应于所述氨基酸序列源自的蛋白的天然序列中的所述氨基酸序列的 N 末端或 C 末端紧接的一个至六个氨基酸的从一个至六个氨基酸的 N 末端和 / 或 C 末端延伸。

8. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (a) 的多肽或盐。

9. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (b)、(c)、或 (d) 的至少一种多肽或盐。

10. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (a)、(b) 和 (c) 的多肽或盐。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的药物制剂，所述药物制剂包括具有氨基酸序列 YEKYRRVVRAGVKV(Alt34, SEQ ID NO:106) 的多肽。

12. 根据权利要求 9 至 11 的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括具有氨基酸序列 KKYAGVFVSTGTLGGGK(Alt18, SEQ ID NO:89) 的多肽。

13. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (a)、(b) 和 (d) 的多肽或盐。

14. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (a)、(b)、(c) 和 (d) 的多肽或盐。

15. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (e) 或 (f) 的至少一种多肽或盐。

16. 根据权利要求 15 所述的药物制剂，所述药物制剂包括具有氨基酸序列 SAKR-Nle-KVAFKLDIEK(Alt06A, SEQ ID NO:73) 的多肽，或其盐。

17. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (g) 或 (h) 的至少一种多肽或盐。

18. 根据权利要求 17 所述的药物制剂，所述药物制剂包括具有氨基酸序列 KDITYVATATLPNY(Alt02 ;SEQ ID NO:61)、或 DITYVATATLPNYSR(Alt02A ;SEQ ID NO:62) 的多肽，或其任一的盐。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的药物制剂，所述药物制剂包括具有氨基酸序列 GWGV-Nle-VSHRSGET(Alt14A, SEQ ID NO:85) 的多肽，或其盐。

20. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (a)、(b)、(c)、(d)、和 (e) 的多肽或盐。

21. 根据权利要求 20 所述的药物制剂，所述药物制剂包括 (f)、(g) 或 (h) 的至少一种多肽或盐。

22. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂被密封在容器中。

23. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂是药学上可接受的溶液或冻干物。

24. 根据权利要求 23 所述的药物制剂，其中所述溶液配制用于皮内施用、皮下施用、口服施用、鼻腔施用、局部施用、舌下施用、含服施用或表皮施用。

25. 根据权利要求 23 或 24 所述的药物制剂，其中所述溶液以安瓿、密封小瓶、注射器、弹药型制剂、柔性袋或玻璃瓶来提供。

26. 根据权利要求 23 所述的药物制剂，其中所述冻干物以密封小瓶来提供。

27. 根据前述权利要求的任一项所述的药物制剂，所述药物制剂用于在治疗或预防对链格孢属 (Alternaria) 和 / 或枝孢属 (Cladosporium) 过敏的方法中使用。

28. 一种确定 T 细胞是否识别根据权利要求 1 至 21 的任一项所述的药物制剂的多肽的体外方法，所述方法包括使所述 T 细胞与所述药物制剂接触并检测所述 T 细胞是否被所述多肽刺激。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，进行所述方法以确定个体是否具有对链格孢属和 / 或枝孢属过敏，或处于具有对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的风险中。

30. 一种治疗个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏、或预防个体对链格孢属和 / 或枝孢

属过敏的方法，所述方法包括向所述个体施用治疗上或预防上有效量的如权利要求 1 至 21 的任一项限定的药物制剂。

31. 如权利要求 1 至 21 中限定的至少三种多肽或盐用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。

32. 一种制备本发明的药物制剂的方法，所述方法包括将如权利要求 1 至 21 的任一项限定的至少三种多肽或盐与药学上可接受的载体或稀释剂组合。

33. 一种多肽、或其药学上可接受的盐，所述多肽、或其药学上可接受的盐多达 30 个氨基酸长度并包括 ：

(I) 氨基酸序列 ：

(a)WSWKIGPAIATGNT(Alt28 ;SEQ ID NO:101)，

(b)KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107)，或

(c)KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112) ;或

(II) 包含 T 细胞表位的变体序列，其是具有多达七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列 (I)，所述修饰的每个独立地是缺失、取代或插入。

34. 根据权利要求 33 所述的多肽或盐，其中所述多肽具有选自以下的氨基酸序列 ：KKYAGVFVSTGTLGGGK(Alt18,SEQ ID NO:89)、和 YEKYRRVVRAGVKV(Alt34,SEQ ID NO:106)。

35. 根据权利要求 33 或 34 所述的多肽或盐，所述多肽或盐用于在治疗或预防对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法中使用。

36. 根据权利要求 33 或 34 的多肽或盐用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。

37. 一种治疗对个体链格孢属和 / 或枝孢属过敏、或预防个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法，所述方法包括向所述个体施用治疗上或预防上有效量的根据权利要求 33 或 34 的多肽或盐。

链格孢属肽类

发明领域

[0001] 本发明涉及可用于预防或治疗对链格孢属(Alternaria)和/或枝孢属(Cladosporium)的霉菌过敏的多肽和药物制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 霉菌过敏原被认为作为人和动物中过敏性疾病,包括哮喘、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎和过敏性皮炎的主要原因。在较冷的气候中,可在晚冬开始的户外空气中发现霉菌,并且峰值在夏末秋初月份(七月至十月)。在较暖的气候中,可全年发现霉菌孢子,在夏末秋初月份发现最高水平。虽然室内霉菌可全年存在,并取决于住宅内的湿度水平,当户外霉菌水平越高时,室内霉菌水平越高。因此,尽管室内霉菌还可来自室内霉菌污染物,但室内霉菌的常见来源来自户外环境。

[0004] 存在数千类型的霉菌;然而,这些中仅少数通常与过敏相关。以下是基于在空气中收集的霉菌孢子的类型的过敏性疾病的最可能的原因:链格孢属、枝孢属、曲霉属(Aspergillus)、青霉属(Penicillium)、长蠕孢属(Helminthosporium)、附球菌属(Epicoccum)、镰孢属(Fusarium)、短梗霉属(Aureobasidium)、茎点霉属(Phoma)、根霉属(Rhizopus)、毛霉属(Mucor)、黑粉菌(Smuts)、和酵母。链格孢属中的霉菌,特别是互隔交链孢霉(Alternaria Alternata),和枝孢属被认为是最重要的过敏真菌。

[0005] 枝孢属是最常见的空气传播的室外霉菌。链格孢属是影响儿童的主要过敏原之一。在温带气候中,从全年的大部分时间(在北半球通常五月至十一月)可检测空气传播的链格孢属孢子,在夏末和秋季具有峰值。链格孢属孢子的散布发生在干旱时期期间。这些以更高的风速和更低的相对湿度为特征,其导致在午后时段阳光充足期间的峰值散布。

[0006] 尽管认为是户外霉菌,链格孢属将生长在提供足够湿度和适当生长物质的任何地方。因此,通常在室内,特别是在潮湿的区域诸如地下室、厨房或卫生间发现链格孢属。通常在冰箱滴水盘、空调、废物箱、床垫、泡沫橡胶枕头、或甚至在窗户上冷凝地发现链格孢属。它是在北美和欧洲两者的屋尘中发现的最常见的霉菌孢子之一。避免链格孢属过敏原实际上是不可能的。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了包含药学上可接受的载体或稀释剂和选自以下的至少三种的多肽或其药学上可接受的盐的药物制剂:

[0009] (a)包含WSWKIGPAIATGNT(Alt28;SEQ ID NO:101)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐;

[0010] (b)包含KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A;SEQ ID NO:107)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐;

[0011] (c)包含KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐;

[0012] (d)包含AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A;SEQ ID NO:83)的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含T细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐;

[0013] (e) 包含 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0014] (f) 包含 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0015] (g) 包含 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐 ;以及

[0016] (h) 包含 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0017] 其中,所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列是具有多达 (up to) 七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列,所述修饰的每一个独立地是缺失、取代或插入,且各多肽多达 30 个氨基酸长度。

[0018] 本发明还提供了用于在治疗或预防对枝孢属和 / 或链格孢属过敏的方法中使用的本发明的药物制剂。

[0019] 本发明还提供了治疗个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏、或预防个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法,该方法包括向所述个体施用治疗上或预防上有效量的本发明的药物制剂。

[0020] 本发明还提供了以上描述的至少三种多肽或盐用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。

[0021] 此外本发明提供了确定 T 细胞是否识别本发明的药物制剂的多肽的体外方法,该方法包括使所述 T 细胞与所述药物制剂接触并检测所述 T 细胞是否被所述多肽刺激。

[0022] 本发明还提供了制备本发明的药物制剂的方法,包括将以上描述的至少三种多肽或盐与药学上可接受的载体或稀释剂组合。

[0023] 本发明还包括多肽、或其药学上可接受的盐,其长度多达 30 个氨基酸并包括 :

[0024] (I) 氨基酸序列 :

[0025] (a)WSWKIGPAIATGNT(Alt28 ;SEQ ID NO:101),

[0026] (b)KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107),或

[0027] (c)KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112) ;或

[0028] (II) 包含 T 细胞表位的变体序列,其是具有多达七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列 (I),所述氨基酸修饰的每个独立地是缺失、取代或插入。

[0029] 本发明还提供了,用于在治疗或预防对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法中使用的本发明的多肽或盐,以及本发明的多肽或盐用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。此外本发明提供了治疗个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏、或预防个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法,该方法包括向所述个体施用治疗上或预防上有效量的本发明的多肽或盐。

[0030] 序列描述

[0031] SEQ ID NO:1 至 118 提供了如实施例 1 至 10 中列出的氨基酸序列。更详细地说 :

[0032] SEQ ID NO:1 至 6、59 至 65 和 111 相应于源自蛋白 Alt a1 的氨基酸序列。

[0033] SEQ ID NO:7 至 11、66 至 78 和 113 相应于源自蛋白 Alt a2 的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:12 至 22 和 79 至 87 相应于源自蛋白 Alt a6 的氨基酸序列。

[0035] SEQ ID NO:23 至 29、88、89、112 和 114 相应于源自蛋白 Alt a7 的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:30 至 35 和 90 至 98 相应于源自蛋白 Alt a8 的氨基酸序列。

[0037] SEQ ID NO:36 至 48 和 99 至 101 相应于源自蛋白 Alt a10 的氨基酸序列。

[0038] SEQ ID NO:49 至 58、102 至 107 和 115 相应于源自蛋白 Alt a13 的氨基酸序列。

[0039] SEQ ID NO:108 至 110 相应于源自以上链格孢属蛋白的同系物的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO:116 至 118 相应于实施例 9 中所用的对照多肽的氨基酸序列。

[0041] 以上提到的蛋白的 NCBI 登录号提供于实施例 1 至 10。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明涉及预防或治疗对枝孢属和 / 或链格孢属的过敏，并提供了适合于该应用的多肽及其药学上可接受的盐的组合。多肽或盐的组合可提供于药物制剂中。

[0044] 氨基酸序列及变体氨基酸序列

[0045] 本发明的多肽可优选地包括如以下的任何一个中显示的氨基酸序列、由如以下的任何一个中显示的氨基酸序列组成、或基本由如以下的任何一个中显示的氨基酸序列组成：

[0046] (a)WSWKIGPAIATGNT(Alt28 ;SEQ ID NO:101)，

[0047] (b)KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107)，

[0048] (c)KYAGVFVSTGTLGGG(Alt18 ;SEQ ID NO:112)，

[0049] (d)AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83)，

[0050] (e)SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)，

[0051] (f)SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72)，

[0052] (g)DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)，或

[0053] (h)GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84) ；

[0054] 本发明的其他多肽包括如以下中显示的氨基酸序列、由如以下中显示的氨基酸序列组成、或基本由如以下中显示的氨基酸序列组成：

[0055] (i)IEKLRSNITVQYDI(Alt33 ;SEQ ID NO:105)，

[0056] (j)SAFRSIEPELTVY(Alt10 ;SEQ ID NO:77)，

[0057] (k)GYTGKIKIAMDVASSE(Alt15 ;SEQ ID NO:86)，

[0058] 可替代地，包括在本发明的药物制剂中的多肽可包括以下、由以下组成、或基本由以下组成：包含 T 细胞表位的变体序列，其是具有多达七个氨基酸修饰的如 (a) 至 (k) 的任一个中显示的氨基酸序列，所述修饰的每个独立地是缺失、取代或插入。

[0059] 优选地，变体序列中的修饰不改变在相应原始氨基酸序列中存在的 T 细胞表位的功能特性。以下进一步讨论 T 细胞表位的功能特性。

[0060] 在优选的变体序列中，保留相应原始氨基酸序列的足够连续的氨基酸以包含 T 细胞表位。通常，此类变体序列保留原始氨基酸序列的至少 8 个、优选地至少 9 个连续的氨基酸。该变体序列可保留原始氨基酸序列的从 8 至 12 个氨基酸或从 9 至 12 个氨基酸。

[0061] 变体序列可具有少于七个氨基酸修饰。例如，所述变体序列可具有多达六个或多达五个氨基酸修饰，优选地多达四个所述氨基酸修饰，更优选地多达三个氨基酸修饰，以及最优选地仅一个或两个氨基酸修饰。全部所述修饰独立地是缺失、取代或插入。

[0062] 在特别优选的实施方案中，变体序列具有一个或两个氨基酸修饰，该修饰或该修

饰的每一个独立地是缺失或取代。

[0063] 缺失

[0064] 当包含 T 细胞表位的变体序列具有是缺失的氨基酸修饰时，该缺失的氨基酸优选地从相应原始氨基酸序列的 N 末端或 C 末端除去。即，变体序列是通过从原始序列的 N 末端和 / 或 C 末端除去一个或更多个连续的氨基酸形成的原始氨基酸序列的截短。此类变体序列可任选地没有其他缺失或没有其他修饰。

[0065] 缺失的氨基酸可较不优选地从相应原始氨基酸序列中的内部位置除去。从内部位置除去，意指缺失的氨基酸本身不在原始氨基酸序列的 N 末端或 C 末端，以及也不是作为构成原始氨基酸序列的 N 末端或 C 末端的连续氨基酸的序列的部分除去。即，为了被认为是来自内部位置的缺失，所述缺失必须独立于来自原始氨基酸序列的 N 末端或 C 末端的缺失而发生。

[0066] 例如，给定原始序列 ABCDEFGH，具有两个氨基酸的内部缺失的实例变体序列可以是 ADEFGH，即 B 和 C 从内部位置除去，且保留原始末端残基 A 和 H。相比之下，来自同一原始序列的 N 末端的两个连续的氨基酸的缺失将导致变体序列 CDEFGH，其中除去 A 和 B，且 C 现在是 N 末端。B 在这种情况下的缺失不是从内部位置的除去，因为其作为构成原始序列的 N 末端的两个连续的氨基酸的一个被除去。

[0067] 当多于一个的缺失发生在变体序列中时，缺失的氨基酸可从 N 末端和 / 或 C 末端和 / 或内部位置的任何组合除去。优选的变体序列具有不超过一个的来自内部位置的缺失。在特别优选的变体序列中，不存在来自内部位置的缺失，且缺失的氨基酸从原始序列的 N 末端和 / 或 C 末端的任何组合中除去。即，缺失的氨基酸可全部从原始序列的 N 末端除去，或其可全部从原始序列的 C 末端除去，或一些氨基酸可从原始序列的各末端除去。

[0068] 因此，在一个实施方案中，变体序列是具有从 (a) 至 (k) 的所述序列的 N 末端除去一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0069] 在另一个实施方案中，变体序列是具有从 (a) 至 (k) 的所述序列的 C 末端除去一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0070] 在另一个实施方案中，变体氨基酸序列是具有从所述序列的 N 末端和 C 末端两者除去许多氨基酸的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列，条件是所述序列具有总计不超过六个的修饰。此类变体序列的优选的实施方案是具有从所述序列的 N 末端和 / 或 C 末端除去一个、两个或三个氨基酸，且任选地没有其他修饰的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0071] 具有至少一个缺失的变体氨基酸序列的具体实例包括 ：

[0072] - 变体序列 QKLKALAKKTYGQ(SEQ ID NO:18)，其是具有从 N 末端除去四个氨基酸的 AEVYQKLKALAKKTYGQ(SEQ ID NO:83) 的氨基酸序列 ；

[0073] - 变体序列 DITYVATATLPNY(SEQ ID NO:5)，其是具有从 C 末端除去两个氨基酸的 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111) 的氨基酸序列 ；

[0074] - 变体序列 RVVRAGVKVAQTA(SEQ ID NO:58)，其是具有从 N 末端除去三个氨基酸及从 C 末端除去一个氨基酸的 KYRRVVRAGVKVAQTAR(SEQ ID NO:107) 的氨基酸序列 ；以及

[0075] - 变体序列 YEKYRRVVRAGVKV(SEQ ID NO:106)，其是具有从 C 末端除去五个氨基酸残基和相应于 Alt a 13 的天然序列中的 KYRRVVRAGVKVAQTAR 的 N 末端紧接的两个连续氨

基酸的两个氨基酸的 N 末端延伸的 KYRRVVRAGVKVAQTAR(SEQ ID NO:107) 的氨基酸序列。

[0076] 取代

[0077] 当包含 T 细胞表位的变体序列具有是取代的氨基酸修饰时，该取代可在原始氨基酸序列的任何位置上发生。优选的，所述取代不引入脯氨酸或半胱氨酸。还优选的，所述取代是保守取代。

[0078] 保守取代，意指氨基酸可被具有相似特性的任何可替代的氨基酸取代。以下是实例的非穷尽列表：

[0079] 具有碱性侧链的氨基酸，诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸，可各自独立地彼此取代。

[0080] 具有酸性侧链的氨基酸，诸如天冬氨酸 (aspartate) 和谷氨酸 (glutamate) 可各自独立地彼此取代，或被其酰胺衍生物，天冬酰胺和谷氨酰胺取代。谷氨酸或谷氨酰胺还可优选地被焦谷氨酸代替。具有取代谷氨酸或谷氨酰胺的焦谷氨酸的变体序列是特别优选的，其中所述焦谷氨酸将相应于本发明的多肽的 N 末端，所述本发明的多肽包括变体序列、由变体序列组成或基本由变体序列组成。在 N 末端具有焦谷氨酸的多肽通常在制造期间具有改进的稳定性。

[0081] 具有脂肪族侧链的氨基酸，诸如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，可各自独立地彼此取代。在该分类中特别优选的取代限于具有更小脂肪族侧链的氨基酸，即甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸，其可优选地各自独立地彼此取代。

[0082] 其他优选的取代包括用正亮氨酸 (Nle) 取代甲硫氨酸。

[0083] 此外，更笼统地，中性氨基酸可被另一个中性氨基酸取代，带电荷的氨基酸可被另一个带电荷的氨基酸取代，亲水性氨基酸可被另一个亲水性氨基酸取代，疏水性氨基酸可被另一个疏水性氨基酸取代，极性氨基酸可被另一个极性氨基酸取代，芳香族氨基酸可被另一个芳香族氨基酸取代。可用于选择适当的取代基的 20 种主要的氨基酸的一些特性如下：

[0084]

Ala	脂肪族、疏水性、中性	Met	疏水性、中性
Cys	极性、疏水性、中性	Asn	极性、亲水性、中性
Asp	极性、亲水性、带电荷的 (-)	Pro	疏水性、中性
Glu	极性、亲水性、带电荷的 (-)	Gln	极性、亲水性、中性
Phe	芳香族、疏水性、中性	Arg	极性、亲水性、带电荷的 (+)
Gly	脂肪族、中性	Ser	极性、亲水性、中性
His	芳香族、极性、亲水性、带电荷的 (+)	Thr	极性、亲水性、中性
Ile	脂肪族、疏水性、中性	Val	脂肪族、疏水性、中性
Lys	极性、亲水性、带电荷的 (+)	Trp	芳香族、疏水性、中性

Leu	脂肪族、疏水性、中性	Tyr	芳香族、极性、疏水性

[0085] 具有至少一个取代的变体氨基酸序列的具体实例是：

[0086] -变体序列SAKR-Nle-KVAFKLDIEK(SEQ ID NO:73)是具有一个取代的SAKRMKVAFKLDIEK(SEQ ID NO:72)的氨基酸序列。在SEQ ID NO:72的位置5上的氨基酸M被正亮氨酸取代；以及

[0087] -变体序列DITYVATATLPNYSR(SEQ ID NO:62)是具有一个取代的DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)的氨基酸序列。在SEQ ID NO:111的位置14上的氨基酸C被丝氨酸取代。SEQ ID NO:111的其他优选的变体序列包括具有位置14上的选择性的、优选地类似的取代的序列。例如，代替以S取代，位置14上的C氨基酸可被T、G、A或V代替。

[0088] 在一些变体序列中，可存在取代和缺失。具体实例是：

[0089] -变体序列AEVYQKLKSLTK(SEQ ID NO:108)是具有C末端上五个缺失以及在位置9(Ser对Ala)和11(Thr对Ala)上做出两个取代的AEVYQKLKALAKKTYGQ(SEQ ID NO:83)的氨基酸序列。SEQ ID NO:83的其他优选的变体序列包括具有位置9和11上的选择性的、优选地类似的取代的序列。例如，代替以S和T取代，在位置9和11上的A氨基酸两者可独立地被G或V取代；以及

[0090] -变体序列SAKR-Nle-KVAFK(SEQ ID NO:113)是具有C末端上五个缺失以及在位置5(Nle对Met)上做出一个取代的SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06；SEQ ID NO:72)的氨基酸序列。

[0091] 插入

[0092] 当变体序列具有是插入的氨基酸修饰时，该添加的氨基酸可在原始氨基酸序列的任何位置上插入。优选的，插入不引入脯氨酸或半胱氨酸。

[0093] 优选地，氨基酸可在原始序列的N末端和/或C末端上插入。即，变体序列是通过将氨基酸添加至原始序列的N末端和/或C末端形成的原始氨基酸序列的延伸。此类变体序列可任选地没有其他插入或没有其他修饰。

[0094] 较不优选地，氨基酸可以在内部位置上插入。在内部位置上的插入，意指，氨基酸在是原始序列N末端上的氨基酸的C末端的任何位置上插入，或意指氨基酸在是原始序列C末端上的氨基酸的N末端的任何位置上插入。

[0095] 当多于一个的插入发生在变体序列中时，添加的氨基酸可在N末端和/或C末端和/或内部位置的任何组合上插入。优选的变体序列在内部位置上具有不超过一个的插入。在特别优选的变体序列中，在内部位置上不存在插入，且添加的氨基酸在原始序列的N末端和/或C末端的任何组合上插入。即，添加的氨基酸可全部在原始序列的N末端上插入，或其可全部在原始序列的C末端上插入，或一些氨基酸可在原始序列的各末端上插入。即，添加的氨基酸可被认为在N末端和/或C末端上延长了原始序列。

[0096] 因此，在一个实施方案中，变体序列是具有在(a)至(k)的所述序列的N末端上插入的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸的(a)至(k)的任何一个的氨基酸序列。

[0097] 在另一个实施方案中，变体序列是具有在(a)至(k)的所述序列的C末端上插入

的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0098] 在另一个实施方案中，变体序列是具有在 (a) 至 (k) 的所述序列的 N 末端和 C 末端两者上插入的许多氨基酸的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列，条件是所述序列具有总计不超过七个的修饰。此类变体序列的优选的实施方案是具有在 (a) 至 (k) 的所述序列的 N 末端和 / 或 C 末端上插入的一个、两个或三个氨基酸，且任选地没有其他修饰的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0099] 具有在 N 末端和 / 或 C 末端上插入的带电荷的氨基酸的变体序列是特别优选的，其中所述带电荷的氨基酸将相应于本发明的多肽的 N 末端和 / 或 C 末端，所述本发明的多肽包括变体序列、由变体序列组成或基本由变体序列组成。在多肽的 N 末端和 / 或 C 末端上的带电荷的残基可改进多肽的溶解度。优选的带电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。赖氨酸是特别优选的。因此，特别优选的变体序列是具有在 (a) 至 (k) 的所述序列的 N 末端和 C 末端上插入的一个或更多个带电荷的氨基酸、优选地一个或更多个赖氨酸残基的 (a) 至 (k) 的任何一个的氨基酸序列。

[0100] 具有至少一个插入的变体氨基酸序列的具体实例包括 ：

[0101] - 变体序列 KSAFRSIEPELTVYK(SEQ ID NO:78)，其是具有在 N 末端上和 C 末端上插入的赖氨酸的 SAFRSIEPELTVY(SEQ ID NO:77) 的氨基酸序列 ；以及

[0102] - 变体序列 KKYAGVFVSTGTLGGGK(SEQ ID NO:89)，其是具有在 N 末端上和 C 末端上插入的赖氨酸的 KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112) 的氨基酸序列。

[0103] 多肽

[0104] 在本发明的药物制剂中包括的多肽长度多达 30 个氨基酸，并包括如以上限定的氨基酸序列或变体序列、由如以上限定的氨基酸序列或变体序列组成、或基本由如以上限定的氨基酸序列或变体序列组成。

[0105] 所述多肽可优选地多达 25 个氨基酸长度，更优选地多达 20 个氨基酸长度或多达 17 个氨基酸长度，以及最优选地多达 15 个氨基酸长度。换言之，多肽可具有 30 个、25 个、20 个、17 个或 15 个氨基酸的最大长度。

[0106] 在本发明的药物制剂中包括的多肽优选地是至少 8 个氨基酸长度，更优选地至少 9 个氨基酸长度，最优选地至少 12 个氨基酸长度。换言之，多肽可具有 8 个、9 个、或 12 个氨基酸的最小长度。

[0107] 在本发明的药物制剂中包括的多肽可以是由所述最小长度和所述最大长度的任何组合限定的长度。例如，多肽可以是 8 个至 30 个、8 个至 25 个、8 个至 20 个、8 个至 17 个或 8 个至 15 个氨基酸长度。多肽可以是 9 个至 30 个、9 个至 25 个、9 个至 20 个、9 个至 17 个或 9 个至 15 个氨基酸长度。多肽可以是 12 个至 30 个、12 个至 25 个、12 个至 20 个、12 个至 17 个或 12 个至 15 个氨基酸长度。优选的多肽是 9 个至 30 个氨基酸长度，更优选地 9 个至 20 个氨基酸长度。特别优选的多肽是 12 个至 17 个氨基酸长度。

[0108] 在本发明的药物制剂中包括的多肽可包括如以上限定的氨基酸序列或变体序列。因此，所述多肽可包括另外的氨基酸，其不是由所述氨基酸序列或变体序列所限定的。另外的氨基酸可被描述为所述氨基酸序列或变体序列的侧翼。即，另外的氨基酸包括在所述氨基酸序列或变体序列的 N 末端和 / 或 C 末端处。

[0109] 换言之，在本发明的药物制剂中包括的多肽可具有由具有许多氨基酸的 N 末端和

/ 或 C 末端延伸的所述氨基酸序列或变体序列组成的序列。在 N 末端和 / 或 C 末端延伸的氨基酸的最大数目由多肽的最大长度来确定，如以上所定义。

[0110] 所述氨基酸序列或变体序列的 N 末端延伸中的氨基酸优选地相应于其源自的蛋白的天然序列中所述氨基酸序列的 N 末端紧接的氨基酸。

[0111] 所述氨基酸序列或变体序列的 C 末端延伸中的氨基酸优选地相应于其源自的蛋白的天然序列中所述氨基酸序列的 C 末端紧接的氨基酸。

[0112] N 末端和 / 或 C 末端延伸可以是分别相应于其源自的蛋白的序列中所述氨基酸序列的 N 末端或 C 末端紧接的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个连续氨基酸的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸。

[0113] 即，N 末端和 / 或 C 末端延伸是分别相应于其源自的蛋白的天然序列中所述氨基酸序列的 N 末端或 C 末端紧接的一个至十个连续的氨基酸的从一个至十个氨基酸。

[0114] 优选地，N 末端和 / 或 C 末端延伸是分别相应于所述氨基的 N 末端或 C 末端紧接的一个至六个连续的氨基酸的从一个至六个氨基酸。

[0115] 更优选地，N 末端和 / 或 C 末端延伸是分别相应于所述氨基的 N 末端或 C 末端紧接的一个至四个连续的氨基酸的从一个至四个氨基酸。

[0116] 最优选地，N 末端和 / 或 C 末端延伸是分别相应于所述氨基酸序列的 N 末端或 C 末端紧接的一个至两个连续的氨基酸的从一个至两个氨基酸。

[0117] 包括氨基酸序列或变体序列的 N 末端和 / 或 C 末端延伸的多肽的具体实例包括以下：

[0118] AEVYQKLKALAKKTYGQ(SEQ ID NO:83)，可具有分别相应于 Alt a 6 的天然序列中 AEVYQKLKALAKKTYGQ 的 N 末端或 C 末端紧接的一个、两个、三个、四个、五个或六个连续氨基酸的一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸的 N 末端和 / 或 C 末端延伸，其是在 N 末端上的氨基酸 E、A、M、R、Q 和 G 以及在 C 末端上的 S、A、G、N、V 和 G。例如，当一个氨基酸延伸存在 N 末端和 C 末端两者上时，本发明的多肽具有 GAEVYQKLKALAKKTYGQS的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12 ;N- 末端和 C- 末端延伸加下划线)。

[0119] SLGFNIKATNGGTLD(SEQ ID NO:60)，可具有相应于 Alt a 1 的天然序列中 SLGFNIKATNGGTLD 的 N 末端和 / 或 C 末端紧接的一个、两个、三个、四个、五个或六个连续氨基酸的一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸的 N 末端和 / 或 C 末端延伸。例如，当六个连续氨基酸存在于 N 末端延伸且两个连续氨基酸存在于 C 末端延伸时，本发明的多肽具有 EGTYYNSLGFNIKATNGGTLDFT的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 ;N 末端和 C 末端延伸加下划线)。

[0120] IEKLRSNITVQYDI(SEQ ID NO:105)，可具有相应于 Alt a 13 的天然序列中 IEKLRSNITVQYDI 的 N 末端紧接的一个、两个、或三个连续氨基酸的一个、两个或三个氨基酸的 N 末端延伸，其是氨基酸 P、K 和 T。其还可具有相应于 Alt a 13 的天然序列中 IEKLRSNITVQYDI 的 C 末端紧接的一个、两个或三个连续氨基酸的一个、两个或三个氨基酸的 C 末端延伸。其是氨基酸 L、E 和 R。例如，当全部三个连续氨基酸存在于 N 末端延伸且全部三个连续氨基酸存在于 C 末端延伸时，本发明的多肽具有 PKTIEKLRSNITVQYDILER的氨基酸序列 (SEQ ID NO:115 ;N 末端和 C 末端延伸加下划线)。

[0121] GWGVMVSHRSGET(Alt18 ;SEQ ID NO:84)，可具有相应于 Alt a 7 的天然序列中 GWGVMVSHRSGET 的 N 末端紧接的一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸的一个、两个、

三个、四个、五个或六个氨基酸的 N 末端延伸，其是氨基酸 K、D、A、F、G 和 A。其还可具有相应于 Alt a 7 的天然序列中 GWGVMVSHRSGET 的 C 末端紧接的一个、两个或三个连续氨基酸的一个、两个或三个氨基酸的 C 末端延伸。其是氨基酸 E、D 和 V。例如，当全部六个氨基酸存在于 N 末端延伸且全部三个连续氨基酸存在于 C 末端延伸时，本发明的多肽具有 KDAFGAGWGVMVSHRSGETEDV的氨基酸序列 (SEQ 15，N 末端和 C 末端延伸加下划线)。

[0122] N 末端和 / 或 C 末端延伸中的氨基酸可不完全相应于氨基酸序列或变体序列源自的蛋白的天然序列中的氨基酸。N 末端延伸和 / 或 C 末端延伸可包括从所述天然序列衍生的序列，其已被修饰，例如改进多肽的稳定性、溶解度或可制造性。例如，天然序列中的甲硫氨酸可被正亮氨酸取代，和 / 或可在 N 末端延伸的 N 末端上和 / 或 C 末端延伸的 C 末端上添加一个或更多个带电荷的残基。优选地添加带正电荷的残基诸如精氨酸和赖氨酸。可添加选自组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的氨基酸。

[0123] 可替代地，N 末端和 / 或 C 末端延伸的氨基酸可不相应于氨基酸序列或变体序列源自的蛋白的天然序列中的氨基酸。而是，它们可以是任何合适的氨基酸，优选地选择以提高多肽的稳定性、溶解度或可制造性。例如，可在本发明的任何氨基酸序列或变体序列的 N 末端和 / 或 C 末端上添加一个或更多个带电荷的残基。优选地添加带正电荷的残基诸如精氨酸和赖氨酸。可添加选自组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的氨基酸。

[0124] T 细胞表位

[0125] 在本发明的药物制剂中包括的多肽长度多达 30 个氨基酸，并包括如以上限定的氨基酸序列或变体序列、由如以上限定的氨基酸序列或变体序列组成、或基本由如以上限定的氨基酸序列或变体序列组成。每个所述氨基酸序列和所述变体序列包含 T 细胞表位。T 细胞表位优选地是 MHC II 类结合 T 细胞表位。优选地，变体序列中的修饰不改变在相应原始氨基酸序列中存在的 T 细胞表位的功能特性。

[0126] 在优选的变体序列中，保留相应原始氨基酸序列的足够的连续的氨基酸以包含 T 细胞表位。通常，此类变体序列保留原始氨基酸序列的至少 8 个、优选地至少 9 个连续的氨基酸。

[0127] T 细胞表位的存在可优选地通过计算机 (in silico) 进行的分析来证实，例如使用如实施例 1 至 5 中描述的生物信息学软件。可替代地，T 细胞表位的存在可通过其功能特性的直接评价来证实。T 细胞表位的特定功能特性包括包含表位的多肽结合 MHC 分子，优选地 MHC II 类分子的能力，和 / 或包含表位的多肽激活 T 细胞，优选地当结合 MHC II 类分子时激活 T 细胞的能力。

[0128] 多肽结合 MHC 分子的能力可使用任何适当的方法，诸如竞争测定来评价。实施例 6 中描述了优选的体外测定。

[0129] 多肽激活 T 细胞的能力还可使用任何适当的方法来评价。优选的方法包括与 T 细胞激活，诸如增殖或细胞因子释放相关的一个或更多个参数的测量。实施例 7 中描述了用于这些参数的优选的测定。相关细胞因子包括 IFN-γ、IL-13 和 IL-10。在本发明的上下文中，如果多肽诱导 IFN-γ、IL-13 和 IL-10 中的一个、两个、或全部的释放，则通常认为多肽已激活 T 细胞。多肽优选地诱导给定的细胞因子大于 50pg/ml 的释放。

[0130] 如以上所提及，优选地，变体序列中的修饰不改变在相应原始氨基酸序列中存在的 T 细胞表位的功能特性。因此，包括变体氨基酸序列、由变体氨基酸序列组成、或基本由

变体氨基酸序列组成的多肽应具有与包括相应原始氨基酸序列、由相应原始氨基酸序列组成、或基本由相应原始氨基酸序列组成的多肽基本上相同的MHC II类结合特性和基本上相同的T细胞激活特性。

[0131] 通常，如果两个多肽能够特异性结合属于相同MHC II类等位基因超型家族的一个或更多个MHC II类分子，则多肽具有与另一个多肽基本上相同的MHC II类结合特性。MHC II类等位基因超型家族的实例包括HLA-DR1、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR11、HLA-DR13、HLA-DR15和HLA-DR51。最优选地，两个多肽将特异性结合相同MHC II类分子，即由相同等位基因编码的MHC II类分子。

[0132] 通常，如果两个多肽特异性激活表达相同T细胞受体的T细胞，则多肽具有与另一个多肽基本上相同的T细胞激活特性。优选地，在由各多肽诱导的激活的水平中应不存在显著差异。激活的水平可通过监测增殖和/或细胞因子释放来评估，如以上所述。

[0133] 包括变体序列、由变体序列组成或基本由变体序列组成的合适的多肽可以经验推断或根据已知标准选择。在单一多肽内，存在有助于在MHC抗原结合槽内的结合的某些残基和与T细胞受体的高变区相互作用的其他残基(Allen等人(1987)Nature 327:713-5)。有利地，可将肽设计为有助于T细胞增殖并诱导脱敏作用。Metzler和Wraith已证实了多肽的改进的致耐受性能力，其中已做出增加多肽-MHC亲和力的取代(Metzler&Wraith(1993)Int Immunol:1159-65)。由Sloan-Lancaster等人(1993)Nature 363:156-9证实了该改变的多肽配体可导致克隆的T细胞中长期而深远的无反应性。

[0134] 序列同一性

[0135] 可选择地，在本发明的药物制剂中包括的多肽的包含T细胞表位的变体序列可根据其与相应原始氨基酸序列的序列同一性进行描述。例如，变体序列可具有与(a)至(k)的任何一个的氨基酸序列至少65%同一性。更优选地，变体序列可具有与(a)至(k)的任何一个的氨基酸序列至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%的氨基酸同一性。

[0136] 通常相比于原始氨基酸序列中多个连续氨基酸评价序列同一性。例如，取决于比较的肽的尺寸，序列同一性可相比于原始氨基酸序列中至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、或15个连续氨基酸来测量。优选的，序列同一性相比于原始氨基酸序列中至少9个连续氨基酸来测量。特别优选的，序列同一性相比于相应原始氨基酸序列的整个长度来测量。

[0137] 与氨基酸序列有关，“序列同一性”是指当使用ClustalW(Thompson等人，1994，上述)用以下参数评估时具有所述值的序列：

[0138] 双序列比对参数-方法：精确的，矩阵：PAM，缺口开放罚分(gap open penalty)：10.00，缺口延伸罚分(Gap extension penalty):0.10；多重比对参数-矩阵：PAM，缺口开放罚分：10.00，用于延迟的%同一性：30，罚分末端缺口：打开，缺口间隔距离：0，负矩阵：非，缺口延伸罚分：0.20，残基特异性缺口罚分：打开，亲水性缺口罚分：打开，亲水性残基：G、P、S、N、D、Q、E、K、和R。在特定残基上的序列同一性意在包括仅仅已被衍生化的相同残基。

[0139] 盐

[0140] 本发明包括本发明的多肽的任何药学上可接受的盐。本发明的多肽的药学上可接

受的盐包括，例如，无机酸盐诸如氯化物、盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐，以及类似的无机酸盐；和有机酸的盐，诸如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐，以及类似的有机酸盐。盐酸盐或乙酸盐是优选的。

[0141] 合成

[0142] 本发明的多肽可通过任何合适的技术来制备。固相肽合成 (SPPS) 是优选的技术。这包括在小固体珠上形成肽。

[0143] 使用 SPPS，肽在合成期间保持共价附着至珠。肽使用偶联 - 洗涤 - 脱保护 - 洗涤的重复循环来合成。特别是，固相附着的肽的自由 N 末端胺与单一 N 保护的氨基酸单元偶联。然后该单元进行脱保护，展现新的 N 末端胺，进一步保护的氨基酸向其附着。重复这些步骤直到肽完成。然后使用合适的试剂从珠切割肽。

[0144] 用于 SPPS 的适合的保护基团、试剂、溶剂和反应条件是本领域技术人员熟知的，并且如此条件可由本领域技术人员通过常规优化程序来确定。

[0145] 多肽的药学上可接受的盐可通过任何合适的技术来制备。通常，成盐作用包括多肽或其盐与合适的试剂，通常是酸反应以获得选择的药学上可接受的盐。

[0146] 例如，多肽的盐酸盐可通过最初使用三氟乙酸从固相切割多肽来制备。因此多肽最初将是三氟乙酸盐。然后三氟乙酸盐可通过任何已知的技术，诸如使用盐酸作为洗脱液在合适的柱子上的离子交换转化为盐酸盐。

[0147] 当需要时，可通过任何合适的技术纯化多肽或多肽盐产物。例如，可使用高压液相色谱 (HPLC)。

[0148] 术语“多肽”不仅包括其中氨基酸残基通过肽 (-CO-NH-) 键来连接的分子，而且还包括其中肽键是反向的分子。此类逆向反向模拟肽 (retro-inverso peptidomimetics) 可使用本领域已知的方法，例如诸如 Meziere 等人 (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237 描述的那些来做出。该方法包括制备包含涉及骨架而不涉及侧链方向的变化的伪多肽 (pseudopolypeptide)。Meziere 等人 (1997) 证明，至少对于 MHC II 类和 T 辅助细胞应答，这些伪多肽是有用的。包含 NH-CO 键代替 CO-NH 肽键的逆向反向多肽更加耐蛋白水解。

[0149] 类似地，可完全免除肽键，条件是使用在氨基酸残基的碳原子之间保留间隔的适当的连接体部分；如果连接体部分具有与肽键基本相同的电荷分布和基本相同的平面性是特别优选的。还将理解，肽可便利地在其 N 末端或 C 末端封端以辅助减少对外切蛋白水解消化的易感性。例如，多肽的 N 末端氨基基团可通过与羧酸反应来保护，且多肽的 C 末端羧基基团可通过与胺反应来保护。修饰的其他实例包括糖基化和磷酸化。另一个潜在的修饰是，在 R 或 K 的侧链胺上的氢可被亚甲基基团代替 ($-NH_2 \rightarrow -NH(Me)$ 或 $-N(Me)_2$)。

[0150] 根据本发明的多肽的类似物还可包括增加或减少多肽的体内半衰期的肽变体。能够增加根据本发明使用的多肽的半衰期的类似物的实例包括肽的类肽类似物、肽的 D- 氨基酸衍生物、和肽 - 类肽杂合体。根据本发明使用的变体多肽的另外的实施方案包括多肽的 D- 氨基酸形式。使用 D- 氨基酸而不是 L- 氨基酸制备多肽大大减少此类试剂通过正常代谢过程的任何不想要的分解，减少需要施用的试剂的量连同其施用的频率。

[0151] 由本发明提供的多肽可源自由通过编码亲本蛋白链的原始转录物的可变剪接产生的 mRNA 编码的亲本蛋白的剪接变体。多肽还可源自亲本过敏原蛋白的氨基酸突变体、糖基化变体和其他共价的衍生物。示例性衍生物包括其中本发明的多肽通过取代、化学、酶

促、或其他合适的方法用除了天然存在的氨基酸以外的部分共价地修饰的分子。还包括的是亲本蛋白的天然存在的变体氨基酸序列。此类变体氨基酸序列可由等位基因变体编码或代表可变剪接变体。

[0152] 如以上描述的修饰可在肽的合成期间或通过生产后修饰，或当多肽使用核酸的定点诱变、随机诱变、或酶促切割和 / 或连接的已知技术呈重组体形式时来制备。

[0153] 还可修饰本文描述的多肽以改进物理化学特性。因此，例如，可改变原始氨基酸序列以改进其溶解度，并因此在等价条件下具有变体序列的本发明的多肽将优选地比具有相应原始氨基酸序列的多肽更可溶。用于评价多肽的溶解度的方法是本领域熟知的。

[0154] 由于向受试者施用难溶试剂导致不期望的、非耐受炎症反应，改进的溶解度有利于受试者对本发明的多肽源自的过敏原的免疫耐受作用。多肽的溶解度可通过改变位于包含 T 细胞表位的区域的侧翼的残基来改进。例如，位于 T 细胞表位侧翼的多肽的残基的 N 末端和 C 末端，可添加选自以下的至少一个氨基酸 ：精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸。在其他实例中 ：

[0155] i) 不包括在 T 细胞表位中的多肽的天然序列的 N 末端或 C 末端上多达三个氨基酸的任何疏水残基被缺失 ；和 / 或

[0156] ii) 不包括在 T 细胞表位中的多肽的天然序列的 N 末端或 C 末端上多达四个氨基酸的包含序列 Asp-Gly 的任何两个连续的氨基酸被缺失 ；和 / 或

[0157] iii) 在多肽的天然序列的 N 末端和 / 或 C 末端添加一个或更多个带正电荷的残基。

[0158] 任选地，包含半胱氨酸残基的任何多肽可被工程化以防止二聚体形成，使得任何半胱氨酸残基被丝氨酸或 2- 氨基丁酸代替。

[0159] 多肽组合

[0160] 本发明提供了包括至少三种多肽或其盐的多肽的组合。各多肽多达 30 个氨酸长度，并优选地独立地选自如以上列出的 (a) 至 (h) 的多肽。多肽的组合还可独立地选自如以上列出的 (a) 至 (k) 的多肽。肽的此类组合优选地提供在如以下描述的药物制剂中。

[0161] 选自 (a) 至 (k) 的多肽的三种、四种、五种、六种、七种、八种或更多种多肽，或其所述盐，可以以组合一起提供。优选的，仅一种多肽或其盐选自 (a) 至 (k) 的每一个。

[0162] 更优选地，选自 (a) 至 (h) 的多肽的三种、四种、五种、六种、七种、或八种多肽，或其所述盐，以组合一起提供。优选的，仅一种多肽或其盐选自 (a) 至 (h) 的每一个。

[0163] 特别优选的，至少三种多肽的以上组合包括 (a) 的多肽或其所述盐。其是包括 (Alt28 ;SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列或相应变体序列，基本由 (Alt28 ;SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列或相应变体序列组成，或由 (Alt28 ;SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列或相应变体序列组成的多肽、或其盐。

[0164] 至少三种多肽的以上组合还可优选地包括 (b)、(c) 或 (d) 的至少一种多肽，或其所述盐。其是包括以下的任何一个的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列，基本由以下的任何一个的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列组成，或由以下的任何一个的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列组成的多肽、或其盐 ：KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107)、KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)、或 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83)。

[0165] SEQ ID NO:107 的优选的变体序列是 YEKYRRVVRAGVKV(Alt34，SEQ ID NO:106)。Alt34 可用于在本文描述的任何多肽组合和药物制剂中代替 SEQ ID:107。SEQ ID NO:112 的优选的变体序列是 KKYAGVFVSTGTLGGGK(Alt18 ;SEQ ID NO:89)。Alt18 可用于在本文描述的任何多肽组合和药物制剂中代替 SEQ ID:112。

[0166] 特别优选的，至少三种多肽的以上组合包括 (a)、(b) 和 (c) 的多肽或盐。还特别优选的，至少三种多肽的以上组合包括 (d) 的多肽或其所述盐。其是包括 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83) 的氨基酸序列或相应变体序列，基本由 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83) 的氨基酸序列或相应变体序列组成，或由 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83) 的氨基酸序列或相应变体序列组成的多肽、或其盐。至少三种多肽的另一个优选的组合包括 (a)、(b) 和 (d) 的多肽或盐。

[0167] 至少三种多肽的以上组合还可优选地包括 (e) 或 (f) 的至少一种多肽，或其所述盐。其是包括 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)、或 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72 的氨基酸序列或其任一个的相应变体序列，基本由 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)、或 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72 的氨基酸序列或其任一个的相应变体序列组成，或由 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)、或 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72 的氨基酸序列、或其任一个的相应变体序列组成的多肽、或其盐。Alt06 的优选的变体序列是 SAKR-Nle-KVAFKLDIEK(Alt06A,SEQ ID NO:73)。Alt06A 可用于在本文描述的任何多肽组合和药物制剂中代替 Alt06。

[0168] 至少三种多肽的以上组合还可优选地包括 (e) 或 (f) 的至少一种多肽，或其所述盐。其是包括 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)、或 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84) 的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列，基本由 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)、或 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84) 的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列组成，或由 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)、或 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84) 的氨基酸序列或其任一种的相应变体序列组成的多肽、或其盐。SEQ ID NO:111 的优选的变体序列是 KDITYVATATLPNY(Alt02 ;SEQ ID NO:61) 和 DITYVATATLPNYSR(Alt02A ;SEQ ID NO:62)。Alt02 或 Alt02A 可用于在本文描述的任何多肽组合和药物制剂中代替 SEQ ID:111。Alt14 的优选的变体序列是 GWGV-Nle-VSHRSGET(Alt14A,SEQ ID NO:85)。Alt14A 可用于在本文描述的任何多肽组合和药物制剂中代替 Alt14。

[0169] 本发明还提供了包含 (d) 的多肽的至少三种多肽、或其所述盐，以及选自 (a) 至 (c) 和 (e) 至 (h) 的多肽的至少两种另外的多肽或其所述盐的组合。例如，可提供 (b)、(c) 和 (d) 的多肽或其盐的组合。本发明还提供了包含 (b) 的多肽的至少三种多肽、或其所述盐，以及选自 (a)、(c) 和 (d) 至 (h) 的多肽的至少两种另外的多肽或其所述盐的组合。本发明此外提供了包含 (c) 的多肽的至少三种多肽、或其所述盐，以及选自 (a)、(b) 和 (d) 至 (h) 的多肽的至少两种另外的多肽或其所述盐的组合。

[0170] 至少三种多肽的以上组合还可包括选自以下的至少一种另外的多肽 ：

[0171] (l) 包含 KKVSMAIAKAAAAEK(Alt11:SEQ ID NO:79) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽 ；

[0172] (m) 包含 SYNVAKAGCIHLAK(Alt22 ;SEQ ID NO:92) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽 ；

[0173] (n) 包含 KLWHSMIPMGRDAK(Alt24 ;SEQ ID NO:95) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽 ;

[0174] (o) 包含 KRSLLVFAVRSSMELRK(Alt27 ;SEQ ID NO:99) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽 ;

[0175] (p) 包含 NWLTLHTAALGPTAK(Alt31 ;SEQ ID NO:103) 的氨基酸序列或源自所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列的多肽 ;

[0176] 其中所述氨基酸序列的包含 T 细胞表位的变体序列如以上所定义，且各多肽多达 30 个氨基酸长度。

[0177] Alt11 的优选的变体序列是 Alt11A(SEQ ID NO:81)。Alt22 的优选的变体序列是 Alt22A(SEQ ID NO:93)。Alt24 的优选的变体序列是 Alt24A(SEQ ID NO:96)。Alt27 的优选的变体序列是 Alt27A(SEQ ID NO:100)。

[0178] 至少三种多肽的以上组合还可进一步包括这样的多肽或其盐，所述多肽或其盐包括以下的任何一个的氨基酸序列或其相应变体，基本由以下的任何一个的氨基酸序列或其相应变体组成，或由以下的任何一个的氨基酸序列或其相应变体组成 : IEKLRSNITVQYDI(Alt33 ;SEQ ID NO:105)、GYTGKIKIAMDVASSE(Alt15 ;SEQ ID NO:86)、或 SAFRSIEPELTVY(Alt10 ;SEQ ID NO:77)。Alt15(SEQ ID NO:86) 的优选的变体序列是 GYTGKIKIA-Nle-DVASSE(Alt15A, SEQ ID NO:87)。

[0179] 全部以上选择从属于组合，所述组合优选地包括总计十二种多肽或更少，更通常地，十种多肽或更少，优选地少于九种，更优选地少于八种多肽，诸如七种或六种多肽或更少。所述组合可包括四种、五种、六种、或七种多肽。本发明的组合最优选地包括六种或七种多肽。

[0180] 优选的核心多肽组合是 (1) :

[0181] - 具有氨基酸序列 WSWKIGPAIATGNT(Alt28 ;SEQ ID NO:101)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0182] - 具有氨基酸序列 KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)、或相应变体序列 (特别优选地 Alt18) 的多肽、或其所述盐 ;

[0183] - 具有氨基酸序列 KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ; 以及

[0184] - 具有氨基酸序列 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐。

[0185] 优选地，以下另外的多肽的一个或两个可添加至 (1) 的核心多肽组合以创建五种或六种多肽的组合 :

[0186] - 具有氨基酸序列 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ; 以及

[0187] - 具有氨基酸序列 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72)、或相应变体序列 (诸如 Alt06A) 的多肽、或其所述盐。

[0188] 任选地，以下进一步另外的多肽的一种或两种可添加至 (1) 的组合或五种或六种多肽的以上组合以创建六种、七种或八种多肽的组合 :

[0189] - 具有氨基酸序列 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)、或相应变体序列 (诸如

Alt02 或 Alt02A) 的多肽、或其所述盐 ;以及

[0190] - 具有氨基酸序列 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84)、或相应变体序列 (诸如 Alt14A) 的多肽、或其所述盐。

[0191] 另一种优选的核心多肽组合是 (2) :

[0192] - 具有氨基酸序列 WSWKIGPAIATGNT(Alt28 ;SEQ ID NO:101)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0193] - 具有氨基酸序列 KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)(特别优选地 Alt18)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0194] - 具有氨基酸序列 KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A ;SEQ ID NO:107)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ;

[0195] - 具有氨基酸序列 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A ;SEQ ID NO:83)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐 ;以及

[0196] - 具有氨基酸序列 SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A ;SEQ ID NO:60)、或相应变体序列的多肽、或其所述盐。

[0197] 任选地,以下进一步另外的多肽的一个或两个可添加至 (2) 的核心组合以创建六种或七种多肽的组合 :

[0198] - 具有氨基酸序列 SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06 ;SEQ ID NO:72)、或相应变体序列 (诸如 Alt06A) 的多肽、或其所述盐 ;

[0199] - 具有氨基酸序列 DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)、或相应变体序列 (诸如 Alt02 或 Alt02A) 的多肽、或其所述盐 ;以及

[0200] - 具有氨基酸序列 GWGVMVSHRSGET(Alt14 ;SEQ ID NO:84)、或相应变体序列 (诸如 Alt14A) 的多肽、或其所述盐。

[0201] 特别优选的多肽组合包括 Alt28(SEQ ID NO:101),或其所述盐 ;Alt18,或其所述盐 ;Alt34A(SEQ ID NO:107) 或相应变体序列 (诸如 Alt34),或其所述盐 ;Alt13A(SEQ ID NO:83),或其所述盐 ;以及 Alt01A(SEQ ID NO:60),或其所述盐。各选自肽的以下组之一的一种、两种或三种肽还可优选地添加至特别优选的多肽组合 :(I)Alt06 或 Alt06A 或其任一个的所述盐,(II)Alt02 或 Alt02A,或其任一个的所述盐,以及 (III)Alt14 或 Alt14A,或其任一个的所述盐。特别优选的多肽组合可包括来自组 (I) 的多肽和来自组 (II) 的多肽,来自 (I) 的多肽和来自组 (III) 的多肽,来自组 (I) 的多肽和来自组 (II) 的多肽。

[0202] 以上多肽组合可适合于用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属的过敏。本发明凭借代表在这些霉菌之间是同源的表位区域提供了适合于针对链格孢属和枝孢属过敏原两者的免疫耐受作用的多肽组合。在这方面,可优选地使用以下多肽,或其盐。

[0203] SEQ ID NO 83 至 87 代表源自 Alt a 6、包含与 Cla h 6 同源的表位区域的序列。SEQ ID NO:108 是源自 Cla h 6、包含与 Alt a 6 同源的表位区域的序列。SEQ ID NO:108 可代替本文描述的组合中的任何 Alt a 6 肽,或除了本文描述的组合中的任何 Alt a 6 肽使用。

[0204] SEQ ID NO 90、91、和 94 至 98 代表源自 Alt a 8、包含与 Cla h 8 同源的表位区域的序列。SEQ ID NO:109 和 110 是源自 Cla h 8、包含与 Alt a 8 同源的表位区域的序列。SEQ ID NO :109 和 110 的一个或更多个可代替本文描述的组合中的任何 Alt a 8 肽,或除

了本文描述的组合中的任何 Alt a 8 肽使用。

[0205] SEQ ID NO 101 代表源自 Alt a 10、包含与 Cla h 10 同源的表位区域的序列。SEQ ID NO:101 可代替本文描述的组合中的任何 Alt a 10 肽，或除了本文描述的组合中的任何 Alt a 6 肽使用。

[0206] 在更广泛的方面，本发明提供了包括至少三种多肽的多肽的组合，该多肽的每个多达 30 个氨基酸长度，并包括 SEQ ID NO 1 至 110 的任何的氨基酸序列或相应变体序列。此类组合通常包括 i) 包括 SEQ ID NO:1 至 6 及 59 至 65（其源自 Alt a1）的任何的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽；ii) 包括 SEQ ID NO:7 至 11 及 66 至 78（其源自 Alt a2）的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽；以及 iii) 包括 SEQ ID NO:12 至 22 及 79 至 87（其源自 Alt a6）的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽，优选地其中所述多肽包括 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83) 或相应变体序列。

[0207] 组合源自不同 Alt 过敏原的多肽、或其盐可允许广泛覆盖通过提供来自多于一个霉菌过敏原的耐受表位在一般群体中观察到的霉菌过敏症。包括来自 Alt a1、Alt a2、和 Alt a6 的多肽、或其盐的以上组合还可包括：

[0208] (iv) 包括 SEQ ID NO:23 至 29 及 88 至 89（其源自 Alt a7）的任何的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽、或其所述盐；和 / 或

[0209] (v) 包括 SEQ ID NO:30 至 35 及 90 至 98（其源自 Alt a8）的任何的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽、或其所述盐；和 / 或

[0210] (vi) 包括 SEQ ID NO:36 至 48 及 99 至 101（其源自 Alt a10）的任何的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽、或其所述盐；和 / 或

[0211] (vii) 包括 SEQ ID NO:49 至 58 及 102 至 107（其源自 Alt a 13）的任何的氨基酸序列、或相应变体序列的至少一种多肽、或其所述盐。

[0212] 此类组合的非限制性实例包括：

[0213] (1) 包含 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83) 或相应变体序列的多肽或盐、选自组 (ii) 的至少两种多肽或盐、选自组 (iii) 的至少两种多肽或盐；

[0214] (2) 包含 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83) 或相应变体序列的多肽或盐，选自组 (ii) 的至少一种、优选地两种多肽或盐，选自组 (iii) 的至少两种、优选地两种多肽或盐，以及选自组 (vi) 的至少一种多肽或盐；以及

[0215] (3) 包含 AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83) 或相应变体序列的多肽或盐，选自组 (ii) 的至少一种、优选地两种多肽或盐，选自组 (iii) 的至少两种、优选地两种多肽或盐，以及选自组 (vii) 的至少一种、优选地两种多肽或盐。

[0216] 以上描述的任何多肽组合可任选地不包括源自链格孢属和 / 或枝孢属过敏原的另外的多肽或另外的肽。以上描述的任何多肽组合可掺入如以下更详细描述的本发明的药物制剂中。

[0217] 在更广泛的方面，本发明提供了多肽、或其药学上可接受的盐，所述多肽多达 30 个氨基酸长度并包括 SEQ ID NO 1 至 110 的任何一个的氨基酸序列或相应变体序列，基本由 SEQ ID NO 1 至 110 的任何一个的氨基酸序列或相应变体序列组成，或由 SEQ ID NO 1 至 110 的任何一个的氨基酸序列或相应变体序列组成。

[0218] 多肽、或其药学上可接受的盐，优选地包括：

[0219] (I) 氨基酸序列：

[0220] (a)WSWKIGPAIATGNT(Alt28；SEQ ID NO:101)，

[0221] (b)KYRRVVRAGVKVAQTAR(Alt34A；SEQ ID NO:107)，或

[0222] (c)KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)；或

[0223] (II) 包含 T 细胞表位的变体序列，其是具有多达七个氨基酸修饰的所述氨基酸序列 (I)，所述氨基酸修饰的每个独立地是缺失、取代或插入。

[0224] 本发明的其他多肽或其药学上可接受的盐包括氨基酸序列 (d) AEVYQKLKALAKKTYGQ(Alt13A；SEQ ID NO:83)、(e)

[0225] SLGFNIKATNGGTLD(Alt01A；SEQ ID NO:60)、(f)SAKRMKVAFKLDIEK(Alt06；SEQ ID NO:72)；(g)DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)；和 (h)GWGVMVSHRSGET(Alt14；SEQ ID NO:84)，或如以上描述的相应变体序列。

[0226] 优选地，本发明的多肽包括 SEQ ID NO 83、60、61、62、72、73、106、107、101、84、85、或 89 的任何一个的氨基酸序列，由 SEQ ID NO 83、60、61、62、72、73、106、107、101、84、85、或 89 的任何一个的氨基酸序列组成，或基本由 SEQ ID NO 83、60、61、62、72、73、106、107、101、84、85、或 89 的任何一个的氨基酸序列组成。

[0227] 本发明还提供了包含本发明的多肽、和药学上可接受的载体或稀释剂的药物制剂。本发明还提供了用于在治疗或预防对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法中使用的本发明的多肽。本发明此外提供了本发明的多肽用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。

[0228] 医学用途和方法

[0229] 本发明优选的方面是过敏的预防或治疗。在这方面，本发明提供了用于在治疗或预防对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法中使用的本发明的药物制剂 (其包括至少三种多肽或盐)。本发明的药物制剂可通过免疫耐受预防或治疗过敏。免疫耐受作用可针对链格孢属和 / 或枝孢属的一种或更多种蛋白过敏原。

[0230] 本发明还提供了以上描述的至少三种多肽或盐用于制造用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的药剂的用途。

[0231] 本发明还提供了治疗个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏、或预防个体对链格孢属和 / 或枝孢属过敏的方法，该方法包括向所述个体施用治疗上或预防上有效量的本发明的多肽或盐或本发明的药物制剂。因此该方法可减少或改善患有过敏的个体中的过敏的症状。该方法可改进患有过敏的个体的状况。该方法可预防或延缓个体中过敏的症状的出现。以下讨论对霉菌过敏的症状。

[0232] 在本节中提到的方法和用途的每一个中，多肽或盐可被如上一节中定义的多肽或盐的组合代替。因此，本发明包括其中在治疗或预防对枝孢属和 / 或链格孢属过敏的方法中使用多肽或盐的组合的方案。在所述方案中，组合中的多肽不必一起施用，和 / 或不必不是同一药物制剂的部分。该方法的多种肽可各自同时地、连续地或并存地施用。

[0233] 本发明的药物制剂可通过对枝孢属和 / 或链格孢属过敏原脱敏或耐受来治疗或预防过敏。药物制剂中包括的多肽可用于使个体对其源自的过敏原耐受或脱敏。使个体对过敏原脱敏意指抑制 (inhibition) 或减弱 (dampening) 在适当地致敏个体中由过敏原诱发的过敏组织反应。术语“免疫耐受作用”是指抑制或消除对抗原应答的能力，诸如对蛋白

过敏原的过敏性应答。免疫耐受作用还是减少或消除不想要的免疫应答，或使受试者对蛋白过敏原脱敏的能力。免疫耐受作用可通过体外分析 T 细胞应答，或通过观察个体中症状的减少来确定。

[0234] 更详细地，T 细胞可被选择性地激活，并然后使得无应答 (rendered unresponsive)。此外这些 T 细胞的使无应答或消除导致患者对特定过敏原的脱敏作用。脱敏作用本身表现为对过敏原或过敏原衍生的肽的应答的减少，或优选地消除对第二或进一步施用过敏原或过敏原衍生的肽的此类应答。该第二施用可在合适的时间段已过去后进行以允许脱敏作用发生；这优选地是在一天和数周之间的任何期间。约四周的间隔是优选的。

[0235] 向其施用药物制剂的个体可以是无症状的。向此类个体施用预防有效量的药物制剂。预防有效量是预防过敏的一种或更多种症状发作的量。

[0236] 可替代地，施用药物制剂的个体可以是需要其的。即，个体可表现过敏的一种或更多种症状。向此类个体施用治疗有效量的药物制剂。治疗有效量是有效改善过敏的一种或更多种症状的量。

[0237] 向其施用药物制剂的个体优选地是人。可已知个体对霉菌过敏原敏感，处于是敏感的风险中或怀疑是敏感。可使用本领域熟知及如本文描述的技术测试个体的敏化作用。可选择地，个体可具有对霉菌过敏的家族史。

[0238] 因为当暴露于霉菌时个体可表现过敏的症状，测试个体对霉菌的敏化作用可不是必要的。暴露意指接近，例如，霉菌或源自霉菌的物质或产物。接近意指距离以上描述的物品 10 米或更少、5 米或更少、2 米或更少、1 米或更少、或 0 米。过敏的症状可包括鼻子发痒、打喷嚏、眼流泪、喉咙发痒、腭痒、眼睛痒、流鼻涕、呼吸困难、支气管痉挛、哮喘、皮肤发红瘙痒或皮疹。

[0239] 个体可以是任何年龄。然而，优选地，个体可以是在 1 岁至 90 岁、5 岁至 60 岁、10 岁至 40 岁、或更优选地 18 岁至 35 岁的年龄组。

[0240] 优选地，个体来自具有在代表高加索人群体中的频率范围内的 MHC 等位基因频率的群体。对于 11 个共同 DRB1 等位基因家族的参考群体等位基因频率在表 1 中列出（来自 HLA Facts Book，Parham 和 Barber 的数据）。

[0241] 表 1

[0242]

DRB1	1	3	4	7	8	11	12	13	14	15	16
%	6.4	14.7	15.7	8.8	3.4	8.3	3.9	14.7	2.9	17.6	2.5
参考群体%	9.4	11.1	12.8	13.2	3.7	13.4	2.3	10.2	3.2	10.7	3.6

[0243] 参考频率通过分析多个研究报道的频率来获得，且数字显示的是平均值。因此优选地，待处理的个体来自这样的群体，所述群体具有与表 1 提及的等位基因的参考群体等效的 MHC 等位基因频率（诸如对于至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或全部等位基因），例如在那些数字加或减 1％、2％、3％、5％、10％、15％或 20％的范围内。

[0244] 优选地，个体来自这样的群体，其中以下 DRB1 等位基因的等位基因频率是：

[0245] 4 - 至少 9％

[0246] 7 - 至少 10％

[0247] 11 - 至少 8％。

[0248] 个体可已具有对霉菌过敏至少 2 周、1 个月、6 个月、1 年、5 年或多于 5 年。个体可患有过敏引起的皮疹、鼻充血、流鼻涕和 / 或咳嗽。个体可已施用或可未施用治疗霉菌过敏的其他组合物 / 化合物。个体可生活在具有温带、亚热带、热带、或北极气候的地理区域。个体通常在特定季节中患有对霉菌的过敏，但该过敏可以是常年的。对霉菌的季节性过敏可通常发生在北半球的秋季。

[0249] 过敏的个体通常是对链格孢属，特别是互隔交链孢霉的霉菌的过敏。过敏的个体可对枝孢属，特别是植物标本枝孢菌 (Cladosporium herbarium) 和 / 或枝状枝孢菌 (Cladosporium cladosporioides) 的霉菌过敏。过敏的个体可对链格孢属和枝孢属的霉菌两者过敏。

[0250] 本文描述的多肽或盐及本发明的药物制剂可在霉菌过敏的个体的组中筛选以证实其供使用的适合性。霉菌过敏个体的组可包括已知或未知对链格孢属和枝孢属的霉菌过敏的个体。特别是，当多个多肽以组合在药物制剂中提供时，可筛选其在至少 20％的 T 细胞样品中引起 T 细胞增殖的能力，其中各样品从群体中不同的霉菌过敏的个体来获得。优选地，药物制剂将在从霉菌过敏的个体的组获得的 T 细胞样品的至少 30％中诱导 T 细胞增殖。更优选地，药物制剂将在组中样品的 35％或更多、40％或更多、50％或更多、60％或更多、70％或更多、80％或更多、或 90％或更多中诱导 T 细胞增殖。霉菌过敏个体的组中的个体数目可以是大于一个的任何数目，例如至少 2 个、3 个、5 个、10 个、15 个、20 个、30 个、50 个、80 个、或至少 100 个个体。

[0251] 还优选的，本文描述的多肽或盐及本发明的药物制剂导致 T 细胞增殖，但不导致组胺从来自致敏个体的白细胞样品的释放。因此可证实多肽、盐或药物制剂的组胺释放谱。合适的白细胞样品包括富集的嗜碱性粒细胞或肥大细胞制品。可存在一些组胺释放，但优选地释放的量不显著。当来自个体的白细胞的样品用药物制剂体外刺激时，显著组胺释放可被认为是释放 20％或更多的总计可用的白细胞组胺。当来自个体的白细胞的样品用组合物体外刺激时，本文描述的多肽或盐或本发明的药物制剂优选地导致总的可用白细胞组胺的小于 5％、小于 4％、小于 3％、小于 2％或小于 1％的释放。通常正常个体具有约 150ng/10^7 个细胞的白细胞组胺含量。

[0252] 药物制剂

[0253] 可以以分离的、基本分离的、纯化的或基本纯化的形式向个体提供本文描述的各多肽或盐。例如，当本文描述的组合的多肽或盐不一起施用时，可向个体提供基本不含其他多肽或其盐的本文描述的多肽或盐。然而可以以原料形式呈现多肽或盐是可能的，优选的呈现其作为药物制剂。

[0254] 本发明的药物制剂优选地包括如以上描述的至少三种多肽或盐以及药学上可接受的载体或稀释剂。药物制剂可包括以上描述的多肽或盐的任何组合。

[0255] 药物制剂中存在的载体或稀释剂从与制剂的其他成分相容性的意义上说一定是‘可接受的’且对其接受者是无毒。通常，用于注射的载体和最终制剂，是无菌的和无热原的。优选地，载体或稀释剂是水。载体或稀释剂可包括硫代甘油、甲硫氨酸或苯甲硫醚。

[0256] 包含如以上描述的至少三种多肽或盐的组合物可与一种或更多种药学上可接受

的赋形剂或媒介物组合以生成药物制剂。辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等可存在于赋形剂或媒介物中。这些赋形剂、媒介物和辅助物质通常是不在接受组合物的个体中诱导免疫应答的药物试剂，且其可被施用而没有异常毒性。药学上可接受的赋形剂包括，但不限于，液体诸如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油、硫代甘油和乙醇。药学上可接受的盐也可包括在其中，例如，无机酸盐诸如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐，以及类似的无机酸盐；和有机酸的盐，诸如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐，以及类似的有机酸盐。药学上可接受的赋形剂、媒介物和辅助物质的详尽讨论可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co.,N.J.1991) 中。

[0257] 多肽或盐通常在药物制剂中按重量的 0.1％至 50％，更优选地按重量的 0.1％至 5％存在。多肽或盐可在药物制剂中按重量小于 0.1％存在。

[0258] 药学上可接受的载体或稀释剂通常在药物制剂中按重量的 50％至 99.9％，更优选地按重量的 95％至 99.9％存在。药学上可接受的载体或稀释剂可在药物制剂中以按重量的多于 99.9％存在。

[0259] 药物制剂包括，但不限于在油性或水性媒介物、糊剂、和可植入持续释放或生物可降解的制剂中的药学上可接受的溶液、冻干物 (lyophilisate)、悬浮剂、乳剂。此类药物制剂还可包括一种或更多种另外的成分，包括，但不限于，悬浮剂、稳定剂、或分散剂。冻干物可包括一种或更多种海藻糖、硫代甘油，甲硫氨酸和苯甲硫醚。在用于非肠道施用的药物制剂的一个实施方案中，活性成分以干燥的形式（例如，冻干物、干粉或颗粒）来提供，用于在非肠道施用重构的药物制剂之前与合适的媒介物（例如，无菌无热原的水）重构。

[0260] 本发明还提供了制备本发明的药物制剂的方法，包括将如以上描述的至少三种多肽或盐与药学上可接受的载体或稀释剂组合。优选地，所述方法制备用于非肠道施用的药物制剂，并包括以干燥的形式提供所述多肽、或盐及将所述多肽、或盐与所述药学上可接受的载体或稀释剂重构。

[0261] 可以以无菌可注射的水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、包装或出售该药物制剂。该悬浮液或溶液可根据已知技术来配制，并除活性成分之外，还可包括本文描述的另外的成分诸如分散剂、润湿剂、或悬浮剂。此类无菌可注射制剂可使用例如无毒的非肠道可接受的稀释液或溶剂，诸如水或 1,3- 丁烷二醇来制备。其他可接受的稀释剂和溶剂包括，但不限于，林格氏溶液 (Ringer's solution)、等渗氯化钠溶液、和不挥发油，诸如合成的单甘油酯或二甘油酯。

[0262] 有用的其他非肠道可施用的药物制剂包括那些，其包括呈微晶形式、呈脂质体制品、或作为生物可降解的聚合物系统的组分的活性成分。用于持续释放或植入的药物制剂可包括药学上可接受的聚合材料或疏水材料诸如乳剂、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0263] 可替代地，本文描述的多肽可包封、吸附至、或缔合颗粒载体。合适的颗粒载体包括源自聚甲基丙烯酸甲酯的那些，以及源自聚（丙交酯）和聚（丙交酯 - 共 - 乙交酯）的 PLG 微粒。参见，例如，Jeffery 等人 (1993)Pharm.Res.10:362-368。还可使用其他颗粒系统和聚合物，例如，聚合物诸如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺、以及这些分子的缀合物。

[0264] 本文提及的任何多肽的制剂将取决于因素诸如多肽的性质和递送的方法。药物

制剂可以以多种剂型来施用。其可以下施用：口服（例如作为片剂、糖锭剂（troche）、锭剂（lozenge）、水性或油性悬浮液、可分散粉末或颗粒剂）、局部、非肠道、皮下、通过吸入、静脉内、肌肉内、淋巴内（intralymphatically）（诸如腹股沟内淋巴结）、胸骨内、经皮、皮内、表皮内（epidermally）、舌下、鼻内、含服或通过输注技术。施用可以是扁桃体内的。施用可以是作为栓剂。施用可通过离子电渗疗法进行。优选地，施用是真皮内、表皮或经皮。施用可通过贴片，诸如微齿贴片（microtine patch）进行。

[0265] 医师将能够确定用于每个特定个体施用的所需途径和方法。

[0266] 本发明的药物制剂优选地在容器中密封来提供。当药物制剂是药学上可接受的溶液时，该溶液可以以安瓿、密封小瓶、注射器、弹药型制剂（cartridge）、柔性袋或玻璃瓶来提供。当药物制剂是冻干物时，优选地以密封小瓶来提供。

[0267] 本发明的药物制剂将包括有效而不导致不良反应的各多肽的合适的浓度。当药物制剂是例如冻干物时，相关浓度将是各多肽重构后的浓度。通常，各多肽在药物制剂中的浓度当在溶液中时将在 0.03 至 200nmol/ml 的范围内。各多肽的浓度更优选地可在 0.3 至 200nmol/ml、3 至 180nmol/ml、10 至 150nmol/ml、50 至 200nmol/ml 或 30 至 120nmol/ml 的范围内。药物制剂应具有大于 95％或 98％的纯度或至少 99％的纯度。

[0268] 佐剂或另外的治疗剂可与本文描述的多肽组合使用。优选地以足够增强多肽效应的量施用佐剂，或反之亦然。佐剂或另外的治疗剂可以是增强本文描述的多肽的效应的试剂。例如，另外的治疗剂可以是增强对本发明的多肽的应答的免疫调节分子。佐剂的非限制性实例包括维生素 D、雷帕霉素和糖皮质类固醇诸如地塞米松、氟替卡松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、氢化可的松、醋酸可的松、泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼龙、倍他米松和曲安西龙。优选的糖皮质激素是地塞米松。

[0269] 在其中本文描述的多肽与一种或更多种其他治疗剂或佐剂组合用于治疗的实施方案中，其他治疗剂或佐剂可单独地、同时地或依次地施用。其可以以相同或不同的药物制剂来施用。因此，可制备包含本文描述的多肽及还包含一种或更多种其他治疗剂或佐剂的药物制剂。本发明的药物制剂可替代地与作为组合治疗的部分的一种或更多种其他治疗组合物同时地、依次地或单独地使用。因此，如以下描述在根据本发明的预防或治疗过敏的方法中，受试者还可用另外的治疗剂来治疗。

[0270] 施用途径

[0271] 当本文描述的多肽或盐以药物制剂向个体施用时，优选的施用制剂至个体的身体的位点，在此处多肽或盐将具有接触合适的抗原呈递细胞的能力，或在此处其将具有接触个体的 T 细胞的机会。

[0272] 配制后，本发明的药物制剂可使用各种已知的途径和技术向受试者体内递送。例如，药物制剂可作为可注射的溶液、悬浮液或乳剂来提供，且使用常规针头和注射器、微针和注射器或使用液体射流喷射系统经由以下来施用：非肠道、皮下、表皮、皮内、肌肉内、淋巴内、动脉内、腹膜内、或静脉内注射。施用可使用贴片，诸如微齿贴片进行。药物制剂还可局部施用至皮肤或粘膜组织，诸如经鼻、经扁桃体内、经气管内、肠、直肠或阴道，或作为适合于呼吸或肺施用的细碎（finely divided）喷雾提供。施用的其他模式包括口服施用、塞药、舌下施用、以及主动或被动经皮递送技术。

[0273] 剂量

[0274] 本文描述的多肽或盐或本发明的药物制剂的施用可以是通过如以上描述的任何合适的方法。待施用的多肽或盐的合适的量可经验地确定，但通常在以下给定的范围内。各多肽或盐的单一施用对于具有对患者的有益效应可以是足够的，但将理解，如果多于一次施用多肽或盐可以是有益的，在这种情况下通常施用方案可以是，例如，每 6 个月一周一次或两次进行 2-4 周，或每四至六个月一周每天一次。如将理解，多肽或盐的组合中的各多肽或盐可单一或组合地向患者施用。

[0275] 用于施用的剂量将取决于许多因素，包括药物制剂的性质、施用的途径和施用方案的时间表及定时。本文描述的多肽或盐的合适的剂量可以在多达 10μg、多达 15μg、多达 20μg、多达 25μg、多达 30μg、多达 50μg、多达 100μg、多达 500μg 或更多 / 施用的数量级。合适的剂量可小于 15μg，但至少 1ng、或至少 2ng、或至少 5ng、或至少 50ng、或至少 100ng、或至少 500ng、或至少 1μg、或至少 10μg。对于本文描述的一些多肽，使用的剂量可以是更高，例如，多达 1mg、多达 2mg、多达 3mg、多达 4mg、多达 5mg 或更高。此类剂量可以以液体制剂、以适合于允许用于通过选择的途径施用的适当的体积的浓度来提供。应理解，以上剂量是指在肽或盐的组合的情况下的总剂量。例如，“多达 35μg”是指在包含组合或多于一种肽或盐的组合物中多达 35μg 的总肽或盐浓度。

[0276] 核酸和载体

[0277] 本文描述的多肽可直接施用，或可通过从编码序列表达间接施用。例如，可提供编码本文描述的多肽的多核苷酸。因此本文描述的多肽可从多核苷酸生成，或以多核苷酸的形式递送，所述多核苷酸编码并能够表达该多肽。本文任何提到的本文描述的肽的使用、递送或施用，意在包括经由从编码该肽的多核苷酸的表达的此类多肽的间接使用、递送或施用。

[0278] 术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文可互换使用，且是指任何长度的核苷酸的聚合形式、为脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、信使 RNA(mRNA)、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、及引物。可以以分离的或纯化的形式提供多核苷酸。

[0279] 多核苷酸可根据本领域已知的方法来合成，如例如 Sambrook 等人 (1989, Molecular Cloning-a laboratory manual ;Cold Spring Harbor Press) 描述的。

[0280] 以上多核苷酸可用于在体外、离体或在体内生成本文所描述的多肽。此类多核苷酸可施用或用于预防或治疗对链格孢属和 / 或枝孢属的过敏。

[0281] 用于基因递送的方法是本领域中熟知的。参见，例如，美国专利号 5,399,346、5,580,859 和 5,589,466。核酸分子可直接引入接受者受试者，诸如通过标准肌肉或皮内注射 ;经皮颗粒递送 ;吸入 ;局部、或通过口服、鼻内或粘膜模式施用。分子可替代地可被离体引入已从受试者除去的细胞。例如，可将多核苷酸、表达盒或载体离体引入个体的 APC 中。将包含感兴趣的核酸分子的细胞重新引入受试者，使得可针对由该核酸分子编码的肽产生免疫应答。在此类免疫接种中使用的核酸分子通常在本文中称为“核酸疫苗”。

[0282] 抗原呈递细胞 (APC)

[0283] 本发明包括生成 APC 的群体的方法的体外用途，所述 APC 在其表面上呈现本文描述的多肽，诸如本文描述的至少三种多肽的组合。随后可在治疗中使用 APC 的所述群体。可对已从患者获得的细胞的样品离体进行生成的所述方法。因此以这种方式生成的 APC 形成

可用于治疗或预防对枝孢属和/或链格孢属过敏的药物试剂。因为细胞源自该个体，所以细胞应被个体的免疫系统接受。因此以这种方式已生成的细胞至该细胞从其最初获得的个体的递送，形成本发明的治疗实施方案。

[0284] 当待施用 APC 时，优选的将 APC 施用至身体的位点，在此处其具有接触、并激活个体的合适的 T 细胞的能力。

[0285] 体外方法

[0286] 本发明还提供了确定 T 细胞是否识别本发明的药物制剂的一种或更多种多肽或盐的体外方法，该方法包括使所述 T 细胞与所述药物制剂接触并检测所述 T 细胞是否被所述多肽刺激。

[0287] 可进行以上方法以确定个体是否具有对枝孢属和/或链格孢属的过敏，或处于具有对枝孢属和/或链格孢属的过敏的风险中。

[0288] 通过以下实施例示出本发明：

[0289] 实施例 1

[0290] MHC II 类结合研究

[0291] 该研究的目的是鉴定对七个最常见的人 MHC II 类 HLA-DRB1* 同种异型（覆盖在平均高加索人群体中发现的同种异型的总计约 63%）具有强亲和力的多肽的独特组。为了鉴定来自互隔交链孢霉 (Alternaria Alternata) 的主要链格孢属过敏原 Alt a 1、Alt a 2、Alt a 6、Alt a 7、Alt a 8 和 Alt a 10 中的所述多肽，称为“肽线性 (peptide threading)”的计算机方法使用商购可得的 EpiMatrix 算法 (EpiVax Inc.) 来进行。这是分析具有用于被容纳在 MHC II 类 HLA-DR 分子的结合槽内的可能性的给定序列的多肽的生物信息学分析。

[0292] EpiMatrix 是基于矩阵的算法，其通过从结合选择的 MHC 分子的每个的估计的可能性的任何多肽序列排序有 9 个氨基酸重叠的 10 个氨基酸长的区段。(De Groot 等人，AIDS Research and Human Retroviruses 13:539-41(1997))。用于开发矩阵基序的方法由 Schafer 等人，16Vaccine 1998(1998) 公布。在该实例中，评估对 HLA DR1、DR2、DR3、DR4、DR7、DR8、DR11、DR13 和 DR15 的结合潜力。通过评分蛋白序列中的各 10-mer 框选择推定的 MHC 配体。该评分通过将 10-mer 的序列与已知结合各 MHC 等位基因的 10 个氨基酸序列的矩阵进行比较来推断。回顾性研究已经表明，EpiMatrix 准确地预测公布的 MHC 配体 (Jesdale 等人，in Vaccines'97(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1997))。还已证实了结合多个 MHC 分子的多肽的成功预测。

[0293] 结合选择的 MHC 分子的估计概率如下通过 EpiMatrix 来计算。与已知的 MHC 结合物 (binder) 对给定的 MHC 等位基因相比，具有给定序列的多肽通过估计对各氨基酸的结合的相对促进或抑制来评分。该信息跨越多肽来概括，且概要评分 (EMX 评分）归属于整个多肽。在将 EMX 评分与已知 MHC 配体评分比较后，EpiMatrix 达到“估计的结合概率”（简称为 EBP，但非严格意义上的概率）。EBP 描述了具有 EpiMatrix 评分为高的或更高的多肽的比例，其将结合给定的 MHC 分子。EBP 范围从 100%（非常可能结合）至小于 1%（非常不可能结合）。

[0294] 对 Alt a 1 的已知亚型的全长序列 (NCBI 登录号：P79085.1、Q6Q128、PQ8NJ79) 进行 EpiMatrix 分析。这些分析鉴定了源自被预测具有良好 MHCII 类结合的以上序列的核心

多肽（及其侧翼序列）。这些序列在以下表 2 中列出。

[0295] 表 2 中：“序列中的残基”给出在分析的多肽的序列内的序列的位置。核心序列（黑体的中间氨基酸）限定在分析期间鉴定的实际结合序列。包括稳定侧翼（N 末端和 C 末端，非黑体）用于与核心序列一起使用并通常是辅助制造多肽所需要的。“采样数（hits）的数目”是指对在序列内测试的全部 MHC 类型的高预测结合亲和力的数目。“EpiMatrix 聚类评分”源自对聚类的长度标准化的采样数的数目。因此，相对于随机多肽标准，聚类评分在预测的聚合的 MHC 结合特性中是过剩的或短缺的。认为 10 以上的评分指示广泛的 MHC 结合特性。

[0296] 表 2-Alt a 1

[0297]

输入序列	序列中的残基（包括侧翼）	序列	疏水性	EpiMatrix 采样数（不包括侧翼）	EpiMatrix 聚类评分（不包括侧翼）	肽 ID NO:	SEQ ID NO:
AAM90320	1 – 21	MQ**FTTIASLFAAAGLAA**AAPL	1.43	11	14.96	P1	1
AAM90320	51 – 73	EGT**YYYNSLGFNIKATNG**GTLDFT	-0.42	11	17.74	P2	2
AAM90320	113 – 135	SDD**ITYVATATLPNYCRA**GGNGP	-0.35	14	20.83	P3	3
AAM90320	144 – 157	ADA**YITLVTLPKSS**	0.47	7	12.34	P4	4
Q6Q128	1 - 21	MQ**FTTIASLFAAAGLAA**AAPL	1.43	11	14.96	P5	-
Q6Q128	51 - 73	EGT**YYYNSLGFNIKATNG**GTLDFT	-0.42	11	17.74	P6	-
Q6Q128	113 - 135	SDD**ITYVATATLPNYCRA**GGNGP	-0.35	14	20.83	P7	-
Q6Q128	144 - 157	ADA**YITLVTLPKSS**	0.47	7	12.34	P8	-
Q8NJ79	1 - 21	MQ**FTTIASLFAAAGLAA**AAPL	1.43	11	14.96	P9	-
Q8NJ79	51 - 73	EGT**YYYNSLGFNIKATNG**GTLDFT	-0.42	11	17.74	P10	-

[0298] 基于 Epimatrix 数据的进一步分析，来自 Alt a 1 的以下另外的序列还被确定为具有合适的 MHC 结合特性：DITYVATATLPNY(SEQ ID NO:5)、DAYITLVTLPKSS(SEQ ID NO:6)、DITYVATATLPNYCR(SEQ ID NO:111)。

[0299] 实施例 2

[0300] 对 Alt a 2 的已知亚型的全长序列（NCBI 登录号：AAD00097）进行如以上的 EpiMatrix 分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好 MHC II 类结合特性的所述 Alt a 2 亚型的核心序列（及其侧翼序列）。这些序列在以下表 3 中列出。用于表 3 的标题和注释正如以上表 2。

[0301] 表 3-Alt a 2

[0302]

输入序列	序列中的残基(包括侧翼)	序列	疏水性	EpiMatrix采样数(不包括侧翼)	EpiMatrix聚类评分(不包括侧翼)	肽ID NO:	SEQ ID NO:
AAD00097	38 - 60	WAQ**LLMLSAKRMKVAFKLDI**EKD	0.00	17	28.06	P11	7
AAD00097	75 - 98	RNG**FKRCLQFTLYRPRDLLSL**LNE	-0.55	14	20.04	P12	8
AAD00097	129 - 147	EDL**WKEYQKIFPSIQV**ITS	-0.37	10	16.7	P13	9

[0303] 基于Epimatrix数据的进一步分析,来自Alt a 2的以下另外的序列也被确定为具有合适的MHC结合特性:QLLMLSAKRMKVA(SEQ ID NO:10),TLYRPRDLLSLLN(SEQ ID NO:11);

[0304] 实施例3

[0305] 对Alt a 6的已知亚型的全长序列(NCBI登录号:Q9HDT3)进行如以上的EpiMatrix分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好MHC II类结合的所述Alt a 6亚型的核心序列(及侧翼序列)。这些序列在以下表4中列出。用于表4的标题和注释正如以上表2。

[0306] 表4-Alt a 6

[0307]

输入序列	序列中的残基(包括侧翼)	序列	疏水性	EpiMatrix采样数(不包括侧翼)	EpiMatrix聚类评分(不包括侧翼)	肽ID NO:	SEQ ID NO:
Q9HDT3	186 - 204	GAE**VYQKLKALAKKTY**GQS	-0.73	14	25.24	P14	12
Q9HDT3	234 - 254	EAG**YTGKIKIAMDVASSE**FYK	-0.22	8	11.35	P15	13
Q9HDT3	335 - 357	AIE**LKSCNALLLKVNQIGTI**TEA	0.56	11	13.18	P16	14
Q9HDT3	362 - 383	KDA**FGAGWGVMVSHRSGET**EDV	-0.43	9	13.36	P17	15
Q9HDT3	385 - 400	IAD**IVVGLRSGQI**KTG	0.59	6	10.53	P18	16

[0308] 基于Epimatrix数据的进一步分析,来自Alt a 6的以下另外的序列也被确定为具有合适的MHC结合特性:VSMAIAKAAAAEK(SEQ ID NO:17)、QKLKALAKKTYGQ(SEQ ID NO:18)、EFIKKAIELKSCN(SEQ ID NO:19)、IELKSCNALLLK(SEQ ID NO:20)、GYTGKIKIAMDVASSEF(SEQ ID NO:21)、GYTGKIKIAMDVASSEFY(SEQ ID NO:22)。基于与Alt a 6的同源性和进一步设计及筛选,源自Cla h 6的以下序列也被确定为具有合适的MHC结合特性:SEQ ID NO:108(Cla16;AEVYQKLKSLTK)。

[0309] 实施例4

[0310] 对Alt a 7的已知亚型的全长序列(NCBI登录号:P42058)进行如以上的EpiMatrix分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好MHC II类结合的所述Alt a 7亚型的

核心序列（及侧翼序列）。这些序列在以下表 5 中列出。用于表 5 的标题和注释正如以上表 2。

[0311] 表 5-Alt a 7

[0312]

输入序列	序列中的残基(包括侧翼)	序列	疏水性	EpiMatrix 采样数(不包括侧翼)	EpiMatrix 聚类评分(不包括侧翼)	肽 ID NO:	SEQ ID NO:
P42058	6 - 27	AIVYYSMYGHIKKMADAELKGI	0.15	9	12.42	P19	23

[0313]

P42058	32 - 48	GDAKLFQVAETLPQEVL	0.12	8	16.31	P20	24
P42058	104 - 125	GAFWGKYAGVFVSTGTLGGGQE	0.15	12	19.42	P21	25
P42058	139 - 162	GFIYVPLGYKTAFSMLANLDEVHG	0.45	12	17.33	P22	26
P42058	180 - 199	PSELELNIAQAQGKAFYEAV	-0.14	8	11.28	P23	27

[0314] 基于 Epimatrix 数据的进一步分析，来自 Alt a 7 的以下另外的序列也被确定为具有合适的 MHC 结合特性：DAKLFQVAETLPQEVLDK(SEQ ID NO:28)、GVFVSTGTLGGGQ(SEQ ID NO:114)、SELELNIAQAQGKAFYE(SEQ ID NO:29)、KYAGVFVSTGTLGGG(SEQ ID NO:112)。

[0315] 实施例 5

[0316] 对 Alt a 8 的已知亚型的全长序列（NCBI 登录号：P0C0Y4）进行如以上的 EpiMatrix 分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好 MHC II 类结合的所述 Alt a 8 亚型的核心序列（及侧翼序列）。这些序列在以下表 6 中列出。用于表 6 的标题和注释正如以上表 2。

[0317] 表 6-Alt a 8

[0318]

输入序列	序列中的残基(包括侧翼)	序列	疏水性	EpiMatrix 采样数(不包括侧翼)	EpiMatrix 聚类评分(不包括侧翼)	肽 ID NO:	SEQ ID NO:
P0C0Y4	41 - 63	CAEYGADLAITYNSRAEGAEKNA	-0.55	10	15.58	P24	30
P0C0Y4	141 - 167	AVGLHFRERKTGSLVITSSMSGHIANF	0.15	13	18.69	P25	31
P0C0Y4	189 - 203	ANEWRDFARVNSISP	-0.80	5	10.04	P26	32
P0C0Y4	219 - 239	QKLWHSMIPMGRDAKATELKG	-0.72	8	11.04	P27	33
P0C0Y4	234 - 254	ATELKGAYVYFASDASSYCTG	0.05	10	13.22	P28	34

[0319] 基于 Epimatrix 数据的进一步分析，来自 Alt a 8 的以下另外的序列也被确定

为具有合适的 MHC 结合特性 :FVPQDIQKL(SEQ ID NO:35)。基于与 Alt a 8 的同源性和进一步设计及筛选,源自 Cla h 8 的以下序列也被确定为具有合适的 MHC 结合特性 :SEQ ID NO:109(Alt25,VAITYASRAQGAEK) 和 SEQ ID NO:110(Alt26,GHHFKERGTGSLVIT)。

[0320] 实施例 6

[0321] 对 Alt a 10 的已知亚型的全长序列 (NCBI 登录号 :P42041) 进行如以上的 EpiMatrix 分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好 MHC II 类结合的所述 Alt a 10 亚型的核心序列 (及侧翼序列)。这些序列在以下表 7 中列出。用于表 7 的标题和注释正如以上表 2。

[0322] 表 7-Alt a 10

[0323]

输入序列	序列中的残基 (包括侧翼)	序列	疏水性	Epi Matrix 采样数 (不包括侧翼)	Epi Matrix 聚类评分 (不包括侧翼)	肽 ID NO:	SEQ ID NO:
P42041	144 - 170	PDSFNYIRKSLLVFAVRSSME LPILMW	0.44	20	29.57	P29	36
P42041	169 - 189	MWSWKIGPAIATGNTVVLKT A	0.48	8	10.62	P30	37
P42041	209 - 231	PPGVINVITGFGKIAGAAMSA HM	0.82	9	10.82	P31	38
P42041	281 - 300	AIHWVNFGIYFNHGQACCAG	0.45	8	10.6	P32	39
P42041	310 - 330	YDKFIQRFKERAAQNAVGDP F	-0.89	10	15.94	P33	40
P42041	408 - 430	ADVIKIGNNTTYGLSAAVHT SNL	0.15	10	14.49	P34	41
P42041	431 - 447	TTAIEVANALRAGTVWV	0.78	8	12.5	P35	42
P42041	476 - 495	LDNYIQTKTVSIRLGDVLFG	0.25	9	12.8	P36	43
P42041.2	170 - 190	MWSWKIGPAIATGNTVVLKT A	0.48	8	10.62	P37	-
P42041.2	210 - 232	PPGVINVITGFGKIAGAAMSA HM	0.82	9	10.82	P38	-
P42041.2	282 - 301	AIHWVNFGIYFNHGQACCAG	0.45	8	10.6	P39	-
P42041.2	311 - 331	YDKFIQRFKERAAQNAVGDP F	-0.89	10	15.94	P40	-
P42041.2	410 - 432	ADVIKIGNNTTYGLAAAVHT SNL	0.27	11	16.79	P41	44
P42041.2	433 - 449	TTAIEVANALRAGTVWV	0.78	8	12.5	P42	-

[0324] 基于 Epimatrix 数据的进一步分析,来自 Alt a 10 的以下另外的序列也被确定为具有合适的 MHC 结合特性 :SLLVFAVRSSMEL(SEQ ID NO:45)、SLLVFAVRSSMELPIL(SEQ ID NO:46)、WSWKIGPAIATGN(SEQ ID NO:47)、DNYIQTKTVSIRL(SEQ ID NO:48)。

[0325] 实施例 7

[0326] 对 Alt a 13 的已知亚型的全长序列 (NCBI 登录号 :Q6R4B4) 进行如以上的

EpiMatrix 分析。该分析鉴定了源自被预测具有良好 MHC II 类结合的所述 Alt a 13 亚型的核心序列（及侧翼序列）。这些序列在以下表 8 中列出。用于表 8 的标题和注释正如以上表 2。

[0327] 表 8

[0328]

输入序列	序列中的残基(包括侧翼)	序列	疏水性	Epi Matrix 采样数(不包括侧翼)	Epi Matrix 聚类评分(不包括侧翼)	肽 ID NO:	SEQ ID NO:
Q6R4B4	4 - 27	KPSELAVQKLVLFAVKGTATSTHN	0.05	14	19.42	P43	49
Q6R4B4	41 - 56	PHEIYVVDRVSAPWFT	0.01	6	11.83	P44	50
Q6R4B4	108 - 126	SSDINNWLTLHTAALGPTA	0.05	10	17.67	P45	51
Q6R4B4	126 - 143	AKYWLYFYKLHPEKLPKT	-0.83	10	18.28	P46	52
Q6R4B4	141 - 158	PKTIEKLRSNITVQYDIL	-0.34	9	15.34	P47	53
Q6R4B4	150 - 171	NITVQYDILERRLNEPGQQYLA	-0.72	8	10.9	P48	54

[0329] 基于 Epimatrix 数据的进一步分析，来自 Alt a 13 的以下另外的序列也被确定为具有合适的 MHC 结合特性：NWLTLHTAALGP(SEQ ID NO:55)、EKLRSNITVQYDI(SEQ ID NO:56)、EKYRRVVRAGVKV(SEQ ID NO:57)、RVVRAGVKVAQTA(SEQ ID NO:58)。

[0330] 实施例 8

[0331] 基于实施例 1 至 7 中进行的分析及溶解度和其他物理化学特性的考虑，在表 9 中列出的序列由本发明人选择作为具有期望的特性。例如，SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:89 的序列是分别源自 SEQ ID NO 111 和 112 的优选的变体序列。相对于原始氨基酸序列，选择这些变体序列用于改进的溶解度和 / 或可制造性。生成由表 9 的序列组成的多肽并特别优选的在随后的测定中用于筛选。

[0332] 表 9

[0333]

肽	序列	亲本中残基	SEQ ID NO.
Alt01	TYYNSLGFNIKATNGGTL	53-70 (Alt a 1)	59
Alt01A	SLGFNIKATNGGTLD	57-71	60
Alt02	KDITYVATATLPNY	K115-127 (Alt a 1)	61
Alt02A	DITYVATATLPNYSR	115-129	62
Alt02B	KTYVATATLPNY	K117-127	63
Alt03	KDAYITLVTLPKSS	K145-157 (Alt a 1)	64
Alt03A	KKDAYITLVTLPKSS	KK145-157	65
Alt04	IFRSLSKEDPDY	12-23 (Alt a 2)	66
Alt04A	IFRSLSKEEPDY	12-23	67
Alt05	KQLLMLSAKRMKVAFK	K40-54 (Alt a 2)	68
Alt05A	KQLL-Nle-LSAKR-Nle-KVAFK		69
Alt05B	KQLL-Nle-LSAKRMKVAFK		70
Alt05C	KQLLMLSAKR-Nle-KVAFK		71
Alt06	SAKRMKVAFKLDIEK	45-59 (Alt a 2)	72
Alt06A	SAKR-Nle-KVAFKLDIEK		73
Alt07	LQFTLYRPRDLLS	82-94 (Alt a 2)	74
Alt08	TLYRPRDLLSLLNE	85-98 (Alt a 2)	75
Alt09	KEYQKIFPSIQVI	133-145 (Alt a 2)	76
Alt10	SAFRSIEPELTVY	147-159 (Alt a 2)	77
Alt10A	KSAFRSIEPELTVYK	K147-159K	78
Alt11	KKVSMAIAKAAAAEK	KK113-126 (Alt a 6)	79
Alt11A	KKVS-Nle-AIAKAAAAEK		80
Alt12	AEVYQKLKALAKK	187-199 (Alt a 6)	81
Alt13	PyrKLKALAKKTYGQ	191-203 (Alt a 6)	82
Alt13A	AEVYQKLKALAKKTYGQ*	187-203 (Alt a 6)	83
Alt14	GWGVMVSHRSGET*	368-380 (Alt a 6)	84
Alt14A	GWGV-Nle-VSHRSGET*	368-380 (Alt a 6)	85
Alt15	GYTGKIKIAMDVASSE*	236-251 (Alt a 6)	86
Alt15A	GYTGKIKIA-Nle-DVASSE*	236-251 (Alt a 6)	87
Alt17	KLFQVAETLPQEVLDK	35-50 (Alt a 7)	88
Alt18	KKYAGVFVSTGTLGGGK	109-125 (Alt a 7)	89
Alt20	LAITYNSRAEGAEK*	48-61 (Alt a 8)	90
Alt21	GLHFRERKTGSLVIT*	143-157 (Alt a 8)	91
Alt22	SYNVAKAGCIHLAK	173-186 (Alt a 8)	92
Alt22A	SYNVAKAGSIHLAK		93
Alt23	NEWRDFARVNSISP*	190-203 (Alt a 8)	94
Alt24	KLWHSMIPMGRDAK*	220-233 (Alt a 8)	95
Alt24A	KLWHS-Nle-IP-Nle-GRDAK*		96
Alt24B	KLWHS-Nle-IPMGRDAK*		97

[0334]

Alt24C	KLWHSMIP-Nle-GRDAK*		98
Alt27	KRSLLVFAVRSSMELRK	KR153-166RK(Alt a 10)	99
Alt27A	KRSLLVFAVRSS-Nle-ELRK		100
Alt28	WSWKIGPAIATGNT*	170-183 (Alt a 10)	101
Alt30	HEIYVVDRVSAP	42-53 (Alt a 13)	102
Alt31	NWLTLHTAALGPTAK	112-127 (Alt a 13)	103
Alt32	KYWLYFYKLHPEK	127-139 (Alt a 13)	104
Alt33	IEKLRSNITVQYDI	144-157 (Alt a 13)	105
Alt34	YEKYRRVVRAGVKV	193-206 (Alt a 13)	106
Alt34A	KYRRVVRAGVKVAQTAR	195-211	107

[0335] Nle：正亮氨酸；Pyr：焦谷氨酸。星号（*）表示在给定的链格孢属过敏原及其枝孢

属同系物之间的潜在的交叉反应性表位。此类表位的其他实例提供于实施例 1-7 中。

[0336] 实施例 9

[0337] 体外结合分析

[0338] 预筛选具有实施例 1 至 8 中鉴定的序列的多肽在含水酸性环境中的溶解度，且在体外 MHC II 结合测定中测试多肽。

[0339] 方法

[0340] 采用的测定是竞争性MHC II类结合测定，其中对各多肽分析其从研究的人MHC II类同种异型的每一个替换已知的对照结合物的能力。在本研究中使用的同种异型和对照多肽通常是以下显示的那些：

[0341]

同种异型	对照多肽	序列
DRB1*0301	结核分支杆菌（Myco. tuberculosis）/麻风杆菌（leprae）hsp 65 2-16	AKTIAYDEEARRGLE (SEQ ID NO:116)
DRB1*1101	流感血凝素 307-319	PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:117)
DRB1*1501	人类髓鞘碱性蛋白 85-99	ENPVVHFFKNIVTPR (SEQ ID NO:118)

[0342] 与对照多肽相比，在竞争性测定中分析各多肽并筛选相对结合。由于竞争性测定的性质，各多肽的数据被确定为其自己的 IC50 与对照多肽的 IC50 的比。因此，具有与对照多肽相等的 IC50 值的多肽具有相同的结合亲和力，而具有小于 1 的比的多肽具有更高的亲和力，且具有大于 1 的比的那些具有更低的亲和力。

[0343] 在水溶液中的溶解度是多肽为有效治疗剂的基本标准。因此，由于溶解度筛选，将排除在多个结合寄存器中具有高频率的大的疏水性氨基酸残基的非常疏水性的多肽。这是混杂 HLA-DRB1* 结合物的特性。鉴定了结合 MHC II 类同种异型的一种或更多种的多肽。将期望，此类多肽将具有结合未通过 MHC 结构的同源性测试的类似同种异型的能力。

[0344] 实施例 10

[0345] 以下方法用于评估具有实施例 1 至 8 中鉴定的序列的多肽的 T 细胞激活特性。

[0346] 细胞增殖试验

[0347] 对 PBMC（待测试的全部参数需要 $140x10^6$个细胞）进行细胞增殖测定。增殖通过放射性同位素标记的化合物 3H- 胸苷的掺入来测量。更详细地，将 100μl 的适当的抗原或多肽浓度分配进 96 孔板的适当的孔中。然后将板放置进设置在 37℃的潮湿的 5% CO_2保温箱中最多 4 小时。在室温下制备如以上描述的分离的 PBMC 至完全培养基中的 $2x10^6$个细胞 /ml 的浓度。然后将 100μl 的细胞溶液分配进包含抗原 / 多肽的 96 孔板的每个孔中。然后将板温育 6 至 8 天。培养物通过添加 10μl 的氚化胸腺嘧啶贮备溶液（在无血清 RPMI 培养基中的 1.85MBq/ml）用氚标记的胸腺嘧啶溶液来脉冲。然后将该板放回培养箱进行 8 至 16 小时。然后使用 Canberra Packard FilterMate 196 细胞收获器收获培养物。干燥过滤片 (Dried filter mat) 使用合适的 β 闪烁计数器来计数。

[0348] 来自包含多肽的孔的计数与包含单独培养基的孔 (12 个孔 / 组）进行统计学比较。使用非参数 Mann-Whitney 检验。相同的统计检验用于全部受试者。在仅培养基的孔

和多肽刺激的孔之间的统计上的显著差异认为是由多肽对 PBMC 的阳性刺激。

[0349] 细胞因子释放测定

[0350] 用于本测定的多肽以小规模（约 10mg 批量大小，非 GMP）来制备。各多肽的纯度由 HPLC 为至少 95％。预先制备包含多肽和对照（阴性对照是培养基，且阳性对照是葡萄球菌肠毒素 B(SEB)25ng/ml 和全链格孢属过敏原提取物 100μg/ml）的 96 孔培养板并储存在 -20℃直到测定的当天。将多肽添加至包含 200μg/ml 的浓度下的多肽的 100μl 体积的孔中，使得随后添加 100μl 细胞将创建 100μg/ml 的最终测定浓度。

[0351] 通过 Ficoll 密度梯度离心法从肝素化血液中分离外周血单核细胞 (PBMC)。然后将 $5x10^6$个细胞 /ml PBMC 悬浮液的 100μl 等分部分添加至各孔，并在 37℃下将板放置在潮湿的 5％ CO_2保温箱中 5 天。刺激后，收获培养物上清液 (100μl) 用于通过多重珠测定的测试。

[0352] 对解冻的培养物上清液根据制造商的说明进行多重细胞因子珠测定 (IL-10、IL-13、干扰素 γ (IFN-g))。对各培养物上清液样品进行单次测量。完成多重测定后，通过来自测定中生成的标准曲线的插值确定单独细胞因子水平。取在 IL-13、IL-10 和 IFN-g 测定的一个或更多个中大于 50pg/ml 的细胞因子释放作为阳性结果。对三种细胞因子、各多肽计算测试的 50 名霉菌过敏的受试者中的应答者的数目。

[0353] 对于具有表 9 的序列的多肽的结果总结于表 10 中。

[0354] 表 10

[0355]

肽	%应答者	肽	%应答者
Alt01	20	Alt13A	86
Alt01A	26	Alt14	44
Alt02	36	Alt14A	56
Alt02A	30	Alt15	56
Alt02B	22	Alt15A	42
Alt03	22	Alt17	30
Alt03A	16	Alt18	50
Alt04	6	Alt20	38
Alt04A	4	Alt21	38
Alt05	2	Alt22	46
Alt05A	10	Alt22A	44
Alt05B	12	Alt23	40
Alt05C	16	Alt24	34
Alt06	16	Alt24A	40
Alt06A	10	Alt24B	30
Alt07	10	Alt24C	36
Alt08	10	Alt27	40
Alt09	6	Alt27A	42
Alt10	42	Alt28	52
Alt10A	34	Alt30	36
Alt11	36	Alt31	58
Alt11A	44	Alt32	36
Alt12	38	Alt33	44
Alt13	40	Alt34	38
		Alt34A	38

[0356] 如所示，表现最出色的肽是 Alt13A。包括具有 Alt13A 的序列的多肽的多肽组合优选的用于治疗或预防链格孢属过敏。在高比例受试者中单独诱导应答的其他表现出色的多肽包括 Alt10、Alt11A、Alt13、Alt14、Alt14A、Alt15、Alt15A、Alt18、Alt22、Alt22A、

Alt24A、Alt27、Alt27A、Alt28、Alt31 和 Alt33。这些多肽的一种或更多种也可优选地包括在本发明的任何多肽组合中。

[0357] 进行群体覆盖范围的分析以确定当包括在与其他肽组合中时哪些多肽可有利地从群体捕获另外的应答。分析了群体中展示对包括在给定组合中的至少一种、两种或三种多肽的 IL-13 或 IFN-g 应答的受试者的数目。结果在以下表 11 中列出。

[0358] 表 11

[0359]

肽	展示对至少 1 种肽应答的受试者	展示对至少 2 种肽应答的受试者	展示对至少 3 种肽应答的受试者
来自表 9 的全部多肽	46	40	36
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A	43	18	6
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A、Alt33	43	32	12
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A、Alt33、Alt34A	44	32	24
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A、Alt15、Alt18	44	30	23
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt10、Alt13A、Alt33、Alt34A	45	34	27
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A、Alt28、Alt33、Alt34A	44	36	26
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt 10、Alt13A、Alt 15、Alt 18	45	33	25
Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt13A、Alt 15、Alt 18、Alt28	44	35	23

[0360] 可通过比较对不同组合应答的另外的受试者的数目观察添加不同多肽的效应。

[0361] 源自 Alt a1 的两种多肽 (Alt01A 和 Alt02A) 和来自 Alt a2 的一种多肽 (Alt06) 能够提供展示对至少一种多肽应答的受试者的数目，特别是不展示对表现出色的多肽 Alt13A 应答的那些数目的增加 (86％应答，即 34/50 个体)。因此包括 Alt01A、Alt02A 或 Alt06 的任何的组合优选的增加群体覆盖范围，特别是与多肽 Alt13A 的组合。

[0362] 源自 Alt a 13 的两种多肽 (Alt33 和 Alt34A) 也特别有效增加群体覆盖范围。当包括在以上组合中时，其增加对至少两种多肽应答的受试者的数目从 18 至 32 和对至少三种多肽应答的受试者的数目从 6 至 24。因此，Alt33 和 Alt34A 还优选的增加群体覆盖范围，特别是在与多肽 Alt13A 和 / 或来自 Alt01A、Alt02A 或 Alt06 的一种或更多种多肽的组合中。

[0363] 可替代地，多肽 Alt 15 和 Alt 18 可被多肽 Alt 33 和 Alt 34 取代。当包括在以上组合中时，其达到对至少 2 种多肽应答的 30 名受试者和对至少 3 种多肽应答的 23 名受试者。因此，Alt15 和 Alt18 还优选的增加群体覆盖范围，特别是在与多肽 Alt13A 和 / 或来自 Alt01A、Alt02A 或 Alt06 的一种或更多种多肽的组合中。

[0364] 当加入至包含 Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt 13A、Alt 33 和 Alt34A 的混合物中时，多肽 Alt10（来自 Alt a2）和 Alt28（来自 Alt10）提供群体覆盖范围的进一步增加，提供分别对至少 2 种多肽应答的 34 或 36 名受试者及对至少 3 种多肽应答的 27 或 26 名受试者。因此，Alt10 和 Alt28 还优选的在疫苗中增加群体覆盖范围，特别是在与多肽 Alt13A 和 / 或来自 Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt33 或 Alt34A 的一种或更多种多肽的组合中。

[0365] 多肽 Alt10 或 Alt28 还可用作多肽 Alt 33 或 Alt 34A 的替代物。如以上所示，包括 Alt10 和 Alt28 代替多肽 Alt33 和 Alt34A 的组合提供分别对至少 2 种多肽应答的 33 或 35 名患者和对至少 3 种多肽应答的 25 或 23 名患者。因此，Alt10 和 Alt28 可优选地与多肽 Alt13A 和 / 或来自 Alt01A、Alt02A、Alt06、Alt15 或 Alt18 的一种或更多种多肽组合提供。

[0366] 实施例 11

[0367] 实施例 10 中鉴定为提供用于能够覆盖多态群体中应答的多肽的组合的基础的多肽，分析其药物开发特性。然后对鉴定为具有优选的药物开发特性的多肽的另外的组合进行群体覆盖范围的分析。分析了群体中展示对包括在给定组合中的至少一种、两种或三种多肽的 IL-13 或 IFN-g 应答的受试者的数目。结果在以下表 12 中列出。

[0368] 表 12

[0369]

肽	展示对至少 1 种肽应答的受试者	展示对至少 2 种肽应答的受试者	展示对于至少 3 种肽应答的受试者
来自表 9 的全部多肽	46	40	36
Alt01A、Alt28、Alt34A	32	20	3
Alt18、Alt28、Alt34A	28	22	17
Alt01A、Alt13A、Alt28、Alt34A	42	27	19
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34A	39	26	21
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34	39	26	19
Alt01A、Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34A	42	28	22
Alt01A、Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34	42	28	22
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34A、Alt01A、Alt06	43	29	22
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34、Alt01A、Alt06	43	29	22
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34A、Alt01A、Alt06、Alt02	43	34	24
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34、Alt01A、Alt06、Alt02	43	34	24
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34A、Alt01A、Alt06、Alt14	43	29	24
Alt13A、Alt18、Alt28、Alt34、Alt01A、Alt06、Alt14	43	29	24

[0370] 可通过比较对不同组合应答的另外的受试者的数目观察添加不同多肽的效应。

[0371] 将两者缺乏表现最出色的肽 Alt13A 的两个三种多肽组合：(a)Alt01A、Alt28 和 Alt34A 和 (b)Alt18、Alt28 和 Alt34A 比较，以评价在 Alt13A 不存在下群体覆盖范围的差

异。(b) 的三种肽组合提供在对全部三种肽应答的受试者的数目方面增强的覆盖范围。

[0372] 四种多肽的组合，诸如 Alt18、Alt28、Alt34A 和 Alt13A 的组合中表现最出色的肽 Alt13A 的添加显著改进在对至少一种多肽应答方面的覆盖范围，如从实施例 10 中的结果预期的。

[0373] 多肽诸如 Alt01A、Alt06、Alt02 和 Alt14 的添加还改进了在对各种组合中的至少一种、两种和三种肽应答方面的受试者的群体覆盖范围。

[0374] 因此，Alt01A、Alt06、Alt02 和 Alt14 可优选地提供在与多肽 Alt18、Alt28、Alt34A 和 Alt13A 的组合中，作为有效覆盖多态霉菌过敏群体的应答的基础。

[0375] 实施例 12- 肽、盐和药物制剂的制备

[0376] 如下制备肽。在固相肽合成 (SPPS) 反应器中进行合成，并通过在 N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中悬浮取代的树脂来启动。在用 DMF 洗涤树脂后，在以下的存在下通过向前述氨基酸添加 N-α - 保护的氨基酸衍生物或 N-α - 保护的二肽进行各偶联步骤 :在 DMF 中的 N-[(1H- 苯并三唑 -1- 基)(二甲基氨基) 亚甲基]-N- 甲基甲铵四氟硼酸 N- 氧化物 (N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmethanamini um tetrafluoroborate N-oxide,TBTU) 和 N,N- 二异丙基乙胺 (DIPEA) 或在二氯甲烷 (DCM) 和 DMF 的混合物中的二异丙基碳二亚胺 (DIC) 和 1- 羟基苯并三唑 (HOBt)。对于各单一步骤，添加溶剂和 / 或试剂并搅拌反应混合物，且随后过滤以从树脂除去溶剂和 / 或试剂。

[0377] 在各成功偶联或加帽过程后，进行 Fmoc 脱保护过程。其由以下组成 :用 DMF 洗涤树脂，用 DMF 或 1- 甲基 -2- 吡咯烷酮 (NMP) 中的 20％ (V/V) 哌啶切割 Fmoc 基团，以及随后用 DMF 和异丙醇 (IPA) 洗涤。对于各单一步骤，添加溶剂和 / 或试剂并搅拌反应混合物，且然后过滤以从树脂除去溶剂和 / 或试剂。

[0378] 重复 Fmoc 脱保护和偶联过程直到树脂携带需要的肽的完整肽序列。通过最终 Fmoc 脱保护和在减压下肽树脂的干燥完成 SPPS。

[0379] 指定的肽的乙酸盐或盐酸盐通过以下方法来制备。肽树脂在 1,2- 乙二硫醇 (EDT)、三异丙基硅烷 (TIS) 和水的存在下用冷的三氟乙酸 (TFA) 在室温下处理 1.5 至 3 小时。滤出并用 TFA 洗涤树脂后，在冷的二异丙基醚 (IPE) 中沉淀产物。然后将其滤出，并用 IPE 洗涤，且在减压下干燥。然后重构产物并通过高效液相色谱 (HPLC) 来纯化。

[0380] 为制备乙酸盐，在 5％ (V/V) 含水乙酸中重构三氟乙酸盐并装载在离子交换树脂上。用 5％ (V/V) 含水乙酸进行洗脱。乙酸盐通过 0.2μm 膜滤器过滤，并冻干以生成作为白色至灰白色粉末的最终产物。

[0381] 为制备盐酸盐，三氟乙酸盐在纯化水中的 0.01M HCl 中重构，并当需要时过滤。将溶液装载在制备性 HPLC 柱上用于离子交换成盐酸盐。通过用 0.1M 氯化铵溶液随后是 0.01M HCl 洗涤柱进行离子交换。随后，盐酸盐通过 0.2μm 膜滤器过滤，并冻干以生成作为白色至灰白色粉末的最终产物。

[0382] 本发明的示例性药物制剂包含表 13 中列出的组分。肽盐是乙酸盐或盐酸盐。

[0383] 表 13

[0384]

原料	功能	标称浓度

Alt28 盐	活性成分	40 至 220μM
Alt34A 盐	活性成分	40 至 220μM
Alt18 盐	活性成分	40 至 220μM
Alt13A 盐	活性成分	40 至 220μM
Alt01A 盐（任选的）	活性成分	40 至 220μM
Alt06 盐（任选的）	活性成分	40 至 220μM
Alt02 盐（任选的）	活性成分	40 至 220μM
Alt14 盐（任选的）	活性成分	40 至 220μM
L- 甲硫氨酸	抗氧化剂	5mM
磷酸或盐酸	pH 调节	按要求
海藻糖二水合物	张力剂	260mM

[0385] 在溶液中制备制剂，然后进行冷冻干燥以生成冻干物。

[0001]

序列表

<110> 切尔卡西亚有限公司

<120> 用于疫苗的链格孢属肽类
<130> N116503 GCW
<150> GB 1209868.7
<151> 2012-06-01
<160> 118
<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 1
Met Gln Phe Thr Thr Ile Ala Ser Leu Phe Ala Ala Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15
Ala Ala Ala Pro Leu
20

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 2
Glu Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr Asn
1 5 10 15
Gly Gly Thr Leu Asp Phe Thr
20

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 3
Ser Asp Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Cys
1 5 10 15
Arg Ala Gly Gly Asn Gly Pro
20

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 合成肽
<400> 4
Ala Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr Leu Pro Lys Ser Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 5
Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 6
Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr Leu Pro Lys Ser Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 7
Trp Ala Gln Leu Leu Met Leu Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala Phe
1 5 10 15
Lys Leu Asp Ile Glu Lys Asp
20

<210> 8
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 8
Arg Asn Gly Phe Lys Arg Cys Leu Gln Phe Thr Leu Tyr Arg Pro Arg
1 5 10 15
Asp Leu Leu Ser Leu Leu Asn Glu
20

<210> 9

[0003]

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 9
Glu Asp Leu Trp Lys Glu Tyr Gln Lys Ile Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15
Ile Thr Ser

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 10
Gln Leu Leu Met Leu Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 11
Thr Leu Tyr Arg Pro Arg Asp Leu Leu Ser Leu Leu Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 12
Gly Ala Glu Val Tyr Gln Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys Thr Tyr
1 5 10 15
Gly Gln Ser

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 13
Glu Ala Gly Tyr Thr Gly Lys Ile Lys Ile Ala Met Asp Val Ala Ser

[0004]

1 5 10 15
Ser Glu Phe Tyr Lys
20

<210> 14
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 14
Ala Ile Glu Leu Lys Ser Cys Asn Ala Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln
1 5 10 15
Ile Gly Thr Ile Thr Glu Ala
20

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 15
Lys Asp Ala Phe Gly Ala Gly Trp Gly Val Met Val Ser His Arg Ser
1 5 10 15
Gly Glu Thr Glu Asp Val
20

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 16
Ile Ala Asp Ile Val Val Gly Leu Arg Ser Gly Gln Ile Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 17
Val Ser Met Ala Ile Ala Lys Ala Ala Ala Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT

[0005]

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 18
Gln Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Gln
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 19
Glu Phe Ile Lys Lys Ala Ile Glu Leu Lys Ser Cys Asn
1 5 10

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 20
Ile Glu Leu Lys Ser Cys Asn Ala Leu Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 21
Gly Tyr Thr Gly Lys Ile Lys Ile Ala Met Asp Val Ala Ser Ser Glu
1 5 10 15
Phe

<210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 22
Gly Tyr Thr Gly Lys Ile Lys Ile Ala Met Asp Val Ala Ser Ser Glu
1 5 10 15
Phe Tyr

[0006]

<210> 23
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 23
Ala Ile Val Tyr Tyr Ser Met Tyr Gly His Ile Lys Lys Met Ala Asp
1 5 10 15
Ala Glu Leu Lys Gly Ile
20

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 24
Gly Asp Ala Lys Leu Phe Gln Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Glu Val
1 5 10 15
Leu

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 25
Gly Ala Phe Trp Gly Lys Tyr Ala Gly Val Phe Val Ser Thr Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Gly Gly Gln Glu
20

<210> 26
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 26
Gly Phe Ile Tyr Val Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ala Phe Ser Met Leu
1 5 10 15
Ala Asn Leu Asp Glu Val His Gly
20

<210> 27
<211> 20
<212> PRT

[0007]

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 27
Pro Ser Glu Leu Glu Leu Asn Ile Ala Gln Ala Gln Gly Lys Ala Phe
1 5 10 15
Tyr Glu Ala Val
20

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 28
Asp Ala Lys Leu Phe Gln Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Glu Val Leu
1 5 10 15
Asp Lys

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 29
Ser Glu Leu Glu Leu Asn Ile Ala Gln Ala Gln Gly Lys Ala Phe Tyr
1 5 10 15
Glu

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 30
Cys Ala Glu Tyr Gly Ala Asp Leu Ala Ile Thr Tyr Asn Ser Arg Ala
1 5 10 15
Glu Gly Ala Glu Lys Asn Ala
20

<210> 31
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽

[0008]

<400> 31
Ala Val Gly Leu His Phe Arg Glu Arg Lys Thr Gly Ser Leu Val Ile
1 5 10 15
Thr Ser Ser Met Ser Gly His Ile Ala Asn Phe
20 25

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 32
Ala Asn Glu Trp Arg Asp Phe Ala Arg Val Asn Ser Ile Ser Pro
1 5 10 15

<210> 33
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 33
Gln Lys Leu Trp His Ser Met Ile Pro Met Gly Arg Asp Ala Lys Ala
1 5 10 15
Thr Glu Leu Lys Gly
20

<210> 34
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 34
Ala Thr Glu Leu Lys Gly Ala Tyr Val Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser
1 5 10 15
Ser Tyr Cys Thr Gly
20

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 35
Phe Val Pro Gln Asp Ile Gln Lys Leu
1 5

<210> 36

[0009]

<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 36
Pro Asp Ser Phe Asn Tyr Ile Arg Lys Ser Leu Leu Val Phe Ala Val
1 5 10 15
Arg Ser Ser Met Glu Leu Pro Ile Leu Met Trp
20 25

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 37
Met Trp Ser Trp Lys Ile Gly Pro Ala Ile Ala Thr Gly Asn Thr Val
1 5 10 15
Val Leu Lys Thr Ala
20

<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 38
Pro Pro Gly Val Ile Asn Val Ile Thr Gly Phe Gly Lys Ile Ala Gly
1 5 10 15
Ala Ala Met Ser Ala His Met
20

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 39
Ala Ile His Trp Val Asn Phe Gly Ile Tyr Phe Asn His Gly Gln Ala
1 5 10 15
Cys Cys Ala Gly
20

<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 合成肽
<400> 40
Tyr Asp Lys Phe Ile Gln Arg Phe Lys Glu Arg Ala Ala Gln Asn Ala
1 5 10 15
Val Gly Asp Pro Phe
20

<210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 41
Ala Asp Val Ile Lys Ile Gly Asn Asn Thr Thr Tyr Gly Leu Ser Ala
1 5 10 15
Ala Val His Thr Ser Asn Leu
20

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 42
Thr Thr Ala Ile Glu Val Ala Asn Ala Leu Arg Ala Gly Thr Val Trp
1 5 10 15
Val

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 43
Leu Asp Asn Tyr Ile Gln Thr Lys Thr Val Ser Ile Arg Leu Gly Asp
1 5 10 15
Val Leu Phe Gly
20

<210> 44
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 44

[0011]

Ala Asp Val Ile Lys Ile Gly Asn Asn Thr Thr Tyr Gly Leu Ala Ala
1 5 10 15
Ala Val His Thr Ser Asn Leu
20

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 45
Ser Leu Leu Val Phe Ala Val Arg Ser Ser Met Glu Leu
1 5 10

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 46
Ser Leu Leu Val Phe Ala Val Arg Ser Ser Met Glu Leu Pro Ile Leu
1 5 10 15

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 47
Trp Ser Trp Lys Ile Gly Pro Ala Ile Ala Thr Gly Asn
1 5 10

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 48
Asp Asn Tyr Ile Gln Thr Lys Thr Val Ser Ile Arg Leu
1 5 10

<210> 49
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽

[0012]

<400> 49
Lys Pro Ser Glu Leu Ala Val Gln Lys Leu Val Leu Phe Ala Val Lys
1 5 10 15
Gly Thr Ala Thr Ser Thr His Asn
20

<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 50
Pro His Glu Ile Tyr Val Val Asp Arg Val Ser Ala Pro Trp Phe Thr
1 5 10 15

<210> 51
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 51
Ser Ser Asp Ile Asn Asn Trp Leu Thr Leu His Thr Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15
Pro Thr Ala

<210> 52
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 52
Ala Lys Tyr Trp Leu Tyr Phe Tyr Lys Leu His Pro Glu Lys Leu Pro
1 5 10 15
Lys Thr

<210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 53
Pro Lys Thr Ile Glu Lys Leu Arg Ser Asn Ile Thr Val Gln Tyr Asp
1 5 10 15
Ile Leu

[0013]

<210> 54
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 54
Asn Ile Thr Val Gln Tyr Asp Ile Leu Glu Arg Arg Leu Asn Glu Pro
1 5 10 15
Gly Gln Gln Tyr Leu Ala
20

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 55
Asn Trp Leu Thr Leu His Thr Ala Ala Leu Gly Pro
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 56
Glu Lys Leu Arg Ser Asn Ile Thr Val Gln Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 57
Glu Lys Tyr Arg Arg Val Val Arg Ala Gly Val Lys Val
1 5 10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 58
Arg Val Val Arg Ala Gly Val Lys Val Ala Gln Thr Ala

[0014]

1 5 10

<210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 59
Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr Asn Gly Gly
1 5 10 15
Thr Leu

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 60
Ser Leu Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr Asn Gly Gly Thr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 61
Lys Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr
1 5 10

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 62
Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Ser Arg
1 5 10 15

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 63

[0015]

Lys Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 64
Lys Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr Leu Pro Lys Ser Ser
1 5 10

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 65
Lys Lys Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr Leu Pro Lys Ser Ser
1 5 10 15

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 66
Ile Phe Arg Ser Leu Ser Lys Glu Asp Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 67
Ile Phe Arg Ser Leu Ser Lys Glu Glu Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 68
Lys Gln Leu Leu Met Leu Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala Phe Lys

[0016]

1 5 10 15

<210> 69
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = Nle
<400> 69
Lys Gln Leu Leu Xaa Leu Ser Ala Lys Arg Xaa Lys Val Ala Phe Lys
1 5 10 15

<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<400> 70
Lys Gln Leu Leu Xaa Leu Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala Phe Lys
1 5 10 15

<210> 71
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = Nle
<400> 71
Lys Gln Leu Leu Met Leu Ser Ala Lys Arg Xaa Lys Val Ala Phe Lys
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT

[0017]

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 72
Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala Phe Lys Leu Asp Ile Glu Lys
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<400> 73
Ser Ala Lys Arg Xaa Lys Val Ala Phe Lys Leu Asp Ile Glu Lys
1 5 10 15

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 74
Leu Gln Phe Thr Leu Tyr Arg Pro Arg Asp Leu Leu Ser
1 5 10

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 75
Thr Leu Tyr Arg Pro Arg Asp Leu Leu Ser Leu Leu Asn Glu
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 76
Lys Glu Tyr Gln Lys Ile Phe Pro Ser Ile Gln Val Ile
1 5 10

[0018]

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 77
Ser Ala Phe Arg Ser Ile Glu Pro Glu Leu Thr Val Tyr
1 5 10

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 78
Lys Ser Ala Phe Arg Ser Ile Glu Pro Glu Leu Thr Val Tyr Lys
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 79
Lys Lys Val Ser Met Ala Ile Ala Lys Ala Ala Ala Ala Glu Lys
1 5 10 15

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<400> 80
Lys Lys Val Ser Xaa Ala Ile Ala Lys Ala Ala Ala Ala Glu Lys
1 5 10 15

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 81

[0019]

Ala Glu Val Tyr Gln Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys
1 5 10

<210> 82
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = 焦谷氨酸
<400> 82
Xaa Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Gln
1 5 10

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 83
Ala Glu Val Tyr Gln Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys Thr Tyr Gly
1 5 10 15
Gln

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 84
Gly Trp Gly Val Met Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr
1 5 10

<210> 85
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<400> 85
Gly Trp Gly Val Xaa Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr

[0020]

1 5 10

<210> 86
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 86
Gly Tyr Thr Gly Lys Ile Lys Ile Ala Met Asp Val Ala Ser Ser Glu
1 5 10 15

<210> 87
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = Nle
<400> 87
Gly Tyr Thr Gly Lys Ile Lys Ile Ala Xaa Asp Val Ala Ser Ser Glu
1 5 10 15

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 88
Lys Leu Phe Gln Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Glu Val Leu Asp Lys
1 5 10 15

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 89
Lys Lys Tyr Ala Gly Val Phe Val Ser Thr Gly Thr Leu Gly Gly Gly
1 5 10 15
Lys

<210> 90
<211> 14
<212> PRT

[0021]

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 90
Leu Ala Ile Thr Tyr Asn Ser Arg Ala Glu Gly Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 91
Gly Leu His Phe Arg Glu Arg Lys Thr Gly Ser Leu Val Ile Thr
1 5 10 15

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 92
Ser Tyr Asn Val Ala Lys Ala Gly Cys Ile His Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 93
Ser Tyr Asn Val Ala Lys Ala Gly Ser Ile His Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 94
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 94
Asn Glu Trp Arg Asp Phe Ala Arg Val Asn Ser Ile Ser Pro
1 5 10

<210> 95
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0022]

<220>
<223> 合成肽
<400> 95
Lys Leu Trp His Ser Met Ile Pro Met Gly Arg Asp Ala Lys
1 5 10

<210> 96
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Nle
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Nle
<400> 96
Lys Leu Trp His Ser Xaa Ile Pro Xaa Gly Arg Asp Ala Lys
1 5 10

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Nle
<400> 97
Lys Leu Trp His Ser Xaa Ile Pro Met Gly Arg Asp Ala Lys
1 5 10

<210> 98
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Nle
<400> 98
Lys Leu Trp His Ser Met Ile Pro Xaa Gly Arg Asp Ala Lys
1 5 10

[0023]

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 99
Lys Arg Ser Leu Leu Val Phe Ala Val Arg Ser Ser Met Glu Leu Arg
1 5 10 15
Lys

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Nle
<400> 100
Lys Arg Ser Leu Leu Val Phe Ala Val Arg Ser Ser Xaa Glu Leu Arg
1 5 10 15
Lys

<210> 101
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 101
Trp Ser Trp Lys Ile Gly Pro Ala Ile Ala Thr Gly Asn Thr
1 5 10

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 102
His Glu Ile Tyr Val Val Asp Arg Val Ser Ala Pro
1 5 10

<210> 103
<211> 15

[0024]

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 103
Asn Trp Leu Thr Leu His Thr Ala Ala Leu Gly Pro Thr Ala Lys
1 5 10 15

<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 104
Lys Tyr Trp Leu Tyr Phe Tyr Lys Leu His Pro Glu Lys
1 5 10

<210> 105
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 105
Ile Glu Lys Leu Arg Ser Asn Ile Thr Val Gln Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 106
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 106
Tyr Glu Lys Tyr Arg Arg Val Val Arg Ala Gly Val Lys Val
1 5 10

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 107
Lys Tyr Arg Arg Val Val Arg Ala Gly Val Lys Val Ala Gln Thr Ala
1 5 10 15
Arg

<210> 108

[0025]

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 108
Ala Glu Val Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Leu Thr Lys
1 5 10

<210> 109
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 109
Val Ala Ile Thr Tyr Ala Ser Arg Ala Gln Gly Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 110
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 110
Gly His His Phe Lys Glu Arg Gly Thr Gly Ser Leu Val Ile Thr
1 5 10 15

<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 111
Asp Ile Thr Tyr Val Ala Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Cys Arg
1 5 10 15

<210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 112
Lys Tyr Ala Gly Val Phe Val Ser Thr Gly Thr Leu Gly Gly Gly
1 5 10 15

<210> 113
<211> 10

[0026]

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Nle
<400> 113
Ser Ala Lys Arg Xaa Lys Val Ala Phe Lys
1 5 10

<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 114
Gly Val Phe Val Ser Thr Gly Thr Leu Gly Gly Gly Gln
1 5 10

<210> 115
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 115
Pro Lys Thr Ile Glu Lys Leu Arg Ser Asn Ile Thr Val Gln Tyr Asp
1 5 10 15
Ile Leu Glu Arg
20

<210> 116
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 116
Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
1 5 10 15

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 117

[0027]

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 118
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 118
Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg
1 5 10 15